TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

NEKROTİZAN ENTEROKOLİTTE MUKOZAL HASARLANMADA APOPTOZİSİN YERİ

Dr. Ufuk ATEŞ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüseyin DİNDAR

ANKARA
2012

KABUL ONAY

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın her aşamasında gösterdiği yardım ve destek için danışmanım Prof. Dr. Hüseyin DİNDAR'a, yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen Prof. Dr. E. Aydın YAĞMURLU, Prof. Dr. Meltem BİNGÖL-KOLOĞLU, Prof. Dr. Tanju AKTUĞ, Prof. Dr. A. Murat ÇAKMAK'a, tez kapsamında ortak çalıştığımız Yenidoğan bölümünden Prof. Dr. Saadet ARSAN'a, Zekai Tahir Burak Hastanesi Çocuk Cerrahisinden Uzm. Dr. Hülya ÖZKAN, Uzm. Dr. Yavuz YILMAZ'a, parçaların immünohistokimyasal incelemelerini gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'dan Prof. Dr. Esra ERDEMLİ ve Yrd. Doç. Dr. Deniz BİLLUR'a, RNA izolasyonu ve Real Time RT-PCR incelemelerindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. E. Ümit BAĞRIAÇIK'a, histopatoloji sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde ki katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD'dan Doç. Dr. S. Kenan KÖSE'ye, tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Çocuk Cerrahisi AD'dan Uzm. Dr. Gülnur GÖLLÜ, Dr. Coşkun KÖSE, Dr. Halise AKPINAR, Dr. Gönül KÜÇÜK, Dr Bilge TÜREDİ, Ferid HANMEMMEDOV, Dr. Fuad MEMMEDOV, Dr. Ergun ERGÜN'e, tüm Çocuk Cerrahisi AD hemşire ve personel ekibine, ayrıca eğitim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen anne ve babama ayrıca her zaman yanımda olan eşim Mehlika ATEŞ'e çok teşekkür ederim.

Dr.Ufuk ATEŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY i
ÖNSÖZ ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER ve KISALTMALAR v
GRAFİKLER ve TABLOLAR DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. TARİHÇE 3
2.2. SIKLIK 4
2.3. NEKROTİZAN ENTEROKOLİTİN PATOGENEZİ 5
2.3.1. PREMATÜRİTE 5
2.3.2. HİPOKSİK İSKEMİK HASAR 6
2.3.3. ENTERAL BESLENME 6
2.3.4. ENFEKSİYON AJANLARI 7
2.4. NEKROTİZAN ENTEROKOLİTİN APOPTOZİS İLE OLAN İLİŞKİSİ. ... 10
2.5. PATOLOJİ 11
2.6. RİSK FAKTÖRLERİ 12
2.7. KLİNİK BULGULAR 12
2.8. LABORATUVAR BULGULARI 13
2.9. RADYOLOJİK BULGULAR 14
2.10. EVRELEME 15
2.11. TEDAVİ 16
2.11.1. MEDİKAL TEDAVİ BASAMAKLARI 17
2.11.2. CERRAHİ TEDAVİ 17
2.12. PROGNOZ 18
3. GEREÇ YÖNTEM 19
3.1. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME 19
3.1.1. IŞIK MİKROSKOBU İNCELEMESİ 19

3.1.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME..... 20
3.2. RNA İZOLASYONU VE REAL TİME RT-PCR..... 21
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM 22
4. BULGULAR..... 23
5. TARTIŞMA 30
6. SONUÇLAR 33
ÖZET..... 34
SUMMARY 36
KAYNAKÇA..... 38

SİMGELER ve KISALTMALAR

%:	Yüzde
BAF:	8 boc aspartil florometil keton
BNIP:	Adenovirüs E1B protein interacting protein 3
CRP:	C-reaktif protein
ÇDDA:	Çok düşük doğum ağırlığı
DAB :	Diaminobenzidine
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
gr:	Gram
GİS:	Gastrointestinal sistem
HE:	Hematoksilen-Eozin
IL:	İnterlökin
mm^3:	Milimetreküp
NEK:	Nekrotizan enterokolit
NO:	Nitrik oksit
PAF:	Trombosit aktive edici faktör
PVG:	Portal ven gaz fenomeni
TNF-α:	Tümör nekrotizan faktör alfa
TLR:	Toll benzeri reseptör
TUNEL:	In situ uç işaretleme
dk:	Dakika
˚C:	Santigrat derece
µl:	Mikrolitre

GRAFİKLER ve TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1: Nekrotizan Enterokolite sebep olan etkenlerin şematik gösterimi.....9
Tablo 1: Nekrotizan Enterokolit için Risk Faktörleri.....12
Tablo 2: Nekrotizan Enterokolitte Bell evrelemesi 16
Tablo 3: Doku Hasar Derecelendirme Sistemi 20
Tablo 4: Apopitoz Skoru 21
Tablo 5: :Çalışma grubunda dokularda hasar derecelemesi 23
Resim 1: Kontrol Grubu. Grade 1 (H.E x200) 24
Resim 2: NEK grubu. Grade 2 (H.E x200) 24
Resim 3: NEK grubu. Grade 3 (H.E x200) 25
Resim 4: NEK grubu. Grade 4 (H.E x200) 25
Tablo 6 :Çalışma grubunda apopitoz skoru.....26
Resim 5: Kontrol Grubu. Skor1 (x400).....27
Resim 6: Kontrol Grubu. Skor2 (x400).....27
Resim 7: Kontrol Grubu. Skor 3 (x400).....28
Resim 8: NEK Grubu. Skor 4 (x400).....28
Tablo 7: Apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonundaki değişim.....29

1. GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit (NEK) intestinal iskemi sonucunda immatür barsağın, yaralanmaya karşı reaksiyon göstererek mukozal zedelenmenin geliştiği çok etkenli bir hastalıktır. Yenidoğanlarda karşılaşılan en sık intraabdominal acil patolojilerin başında gelir. Öncelikli olarak NEK'te barsak duvarı inflamasyonu ve nekrozu, daha sonra perforasyonu oluşur ve sonuçta acil cerrahi girişim gerektirir.[1,2,3]

NEK'in en önemli risk faktörlerinden birisi prematüritedir ve NEK riski doğum ağırlığı ve gestasyonel yaş ile ters orantılıdır. Bu nedenle, obstetri ve yenidoğan bakımındaki gelişmeler sayesinde çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin (ÇDDA<1500 gr) yaşatılmasıyla NEK için risk altındaki populasyon gittikçe büyümektedir. NEK yenidoğan yoğun bakım ünitelerine başvuran tüm hastaların %1-5'inde gelişmektedir. NEK sıklığı çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde (<1500 gr) artarak %15'ye ulaşmıştır.[2,3,4]

NEK'in patofizyolojisi çok etkenli olmakla birlikte halen tam olarak anlaşılamamıştır.[5,6]
İntestinal iskemi, patolojik bakteri kolonizasyonu ve intestinal lümende aşırı besin varlığı NEK'in risk faktörleri arasındadır. İntestinal nekroz barsak iskemisine ve daha sonra oluşan reperfüzyona bağlıdır.[4,5] NEK'in patogenezinde enterositlerde başlayan apoptozis ve barsak bariyer yetmezliği sonrasında oluşan bakteriyel invazyon ve intestinal duvar hasarlanması vardır. Çalışmalarda hastalığın başlangıcının apikal villuslardaki hücrelerde apoptoziste artış olduğu gösterilmiştir.[5]

Jilling ve ark.'nın[7] sıçanlarda yaptığı çalışmada NEK histolojik olarak gelişmeden önce apoptozisin daha önce geliştiği hipotezi öne sürülmüştür. Çalışmaları sırasında apoptozisin olduğu vakalarda NEK'in de varolduğu gösterilerek hipoteze tamamen

uyduğu gösterilmiştir. Ayrıca NEK'li olgularda pan-kaspaz inhibitörü vererek apoptozisin ve buna bağlı NEK'in daha az olduğu gösterilmiştir.[7]
NEK patogenezinin başlangıcında apoptozis artmış olup buna bağlı bakteriyel translokasyon ve bunun sonucunda lokal intestinal sitokinlerin üretimiyle inflamatuvar basamaklar etkinleşmektedir. İnflamatuvar mediatörlerin artması ile de epitelyal apoptozisin artıyor olabileceği ve bu kısır döngü ile de NEK'in ilerlediği öne sürülmüştür.[1,8,9,10]

Pek çok çalışmada apoptozisin doku düzeyinde olup olmadığı araştırılmış fakat apoptotik genler tam olarak ortaya konulamamıştır. Bazı hayvan deneylerinde Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bax, Bad gibi apoptotik ve anti-apoptotik genler araştırılmış ve NEK'te anti-apoptotik genlerin azaldığı, apoptotik genlerin ise arttığı gösterilmiştir.[5,11] Yapılan çalışmalarda Epidermal Growth Faktör (EGF) gibi ajanlar verilerek apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir ve EGF'nin apoptozisi engelleyerek apikal villusların şekillerini koruduğu gösterilmiştir.[5]
Zamora ve ark.'nın[11]yaptığı bir çalışmada apoptotik genlerden biri olan BNIP3'ün NEK ile olan ilişkisi araştırılmıştır. NEK'li olgularda BNIP3 düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir.[11]

Apoptozis ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı hasta gruplarında bazı apoptozis genleri gösterilmekle birlikte yenidoğan bebeklerde NEK ile ilişkili apoptotik ve anti-apoptotik genleri intestinal düzeyde gösteren geniş kapsamlı bir çalışmaya yapılan literatür taramasında rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın sonucunda NEK ile ilişkili apoptotik ve anti-apoptotik genlerin durumları gösterilmesine, NEK ile apoptozis arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılıp, ileriki çalışmalarda enterositlerdeki apoptozise neden olan gen ekspresyonunu engelleyen ajanların bulunmasına katkı sağlayacak bulguların ışığında çalışılmasının NEK'in ilerlemesinin durdurulmasında ve tedavisinin planmasında yardımcı olacağını umuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Nekrotizan enterokolit (NEK), barsakların kısmi veya tam iskemisi ile karakterize ciddi bir barsak hastalığıdır.

Tarihte gerçek anlamda ilk NEK olgusunu 1888'de Paltauf'un bildirdiği kabul edilir. Paltauf, ikisi doğum sonrası ilk 15 saatte, diğer üçü ilk 2 gün içinde ölen beş olguluk yenidoğan serisinin ortak özelliğinin kolon ve ince barsaklarda çok sayıda perforasyon ve buna bağlı gelişen peritonit olduğunu bildirmiştir. Yine bu olguların tümünde barsaktaki nekrozun oldukça geniş bir ince barsak segmentini tutmuş olduğunu belirtmiştir.[12] İlk başarılı tedavi ise 1943'te Agerty ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. 1953'e kadar "enfeksiyöz enterit" olarak tanımlanan NEK'e bugünkü adını ilk veren Schmid ve Quasier olmuştur.[13] 1964'de Berdon ve arkadaşları yayınladıkları 21 olguluk seride NEK'in klinik ve radyolojik ve özellikleri ile tedavi sonuçlarını yayınlamışlardır. Bu bildirideki belki de en önemli nokta 1954-1964 yıllarını içeren olgu serisindeki 21 olgudan 13'ünün 1963 yılının 6 aylık dönemine ait olmasıdır.[12] Gerçekten de 1960 öncesi yıllarda literatürde NEK olgularına pek rastlanmazken yenidoğan yoğun bakım koşullarındaki düzelmeyle birlikte zamanından önce doğmuş veya düşük doğum ağırlıklı yenidoğanların da yaşatılabilmesi sonucunda bildirilen NEK olgularında da belirgin artış olmuştur.[13] 1974 ve 1975'de Barlow ve Santulli'nin yaptığı deneysel ve klinik çalışmalar NEK'in patogenezine yönelik çok değerli bulgular ortaya çıkarmıştır.[14] Özellikle Santulli ve arkadaşları 1975'de 64 olguluk NEK serisinin değerlendirilmesi sonucunda intestinal mukoza hasarı, bakteri ve beslenmenin (mama) hastalığın meydana gelmesine neden olan 3 ana faktör olduğunu belirtmişlerdir.[14] 1960'lı

yıllarda hastalığın erken dönemde cerrahi müdahale ile tedavi edilebileceği düşünülürken, 1970'li yıllarda erken tanı konulursa cerrahi dışı yöntemlerle de hastalığın tedavi edilebileceği ortaya konmuştur.[15] Bell ve arkadaşları 1978'de NEK'in klinik evrelemesini yayınlamıştır.[16]

2.2. SIKLIK

NEK yenidoğanlarda karşılaşılan en ciddi barsak hastalığıdır. İnsidansı her ülke ve hastanede değişmektedir. Çok merkezli çalışmalarda 100 canlı doğumda 0.3 ile 2.4 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde izlenen bebeklerin yaklaşık %1-10'unda gelişmektedir. Esas olarak prematüre bebeklerde görülmekle birlikte, NEK gelişen bebeklerin %7-10'unu zamanında doğan bebekler oluşturmaktadır.[6,17-21]

NEK insidansı azalan doğum ağırlığı ve azalan gestasyonel yaş ile orantılı olarak artmaktadır.[15,22] Wilson ve arkadaşları 148 NEK'li hastayı değerlendirmişler ve en yüksek oranların 1000 gr altındaki bebeklerde olduğunu görmüşlerdir (%42). Doğum ağırlığı 1000-1500 gr arasındaki bebeklerde %39, 1501-2000 gr arasındaki grupta %3.8, 2500 gr üstündeki bebeklerde ise % 0.11 oranında NEK saptamışlardır.[12]

Ülkemizde ise çok fazla sayıda araştırma olmamakla birlikte yenidoğan ünitesinde takip edilen hastalardaki sıklık %0.19-7,2 iken prematüre yenidoğanlarda ise %7,2-8,2 olarak bilinmektedir.[23,24]

Cinsiyet ile NEK insidansı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Her iki cinste de eşit oranda görülmektedir. Bazı çalışmalarda siyah ırkta beyazlara göre daha fazla oranda görüldüğü bildirilmekle birlikte, ırksal farklılık olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Sosyoekonomik durum ve mevsimlerle de anlamlı bir ilişkisi saptanmamıştır. Mortalitesi %10-50 arasında değişmekle birlikte son yıllarda erken

tanı, ciddi takip ve tedavi ile bu rakamın %28'lere indirilebildiğini belirten merkezler de vardır.[4,6,21,22,25] Gebelik yaşı küçüldükçe mortalitenin arttığı bildirilmektedir.[6,26,27]

2.3. NEKROTİZAN ENTEROKOLİTİN PATOGENEZİ

2.3.1. Prematürite

Epidemiyolojik çalışmalar prematürite ile NEK arasında sıkı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Buna neden olarak ise barsağın işlevsel ve yapısal olarak gerekli olgunluğa ulaşamaması gösterilmiştir.[28] Gerçekten de prematüre bebeklerin gastrik asit ve pepsin üretimi düşüktür ve amilolitik, lipolitik ve proteolitik salgıları yeterli düzeyde değildir. Yutularak alınan mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma sistemi olan gastrik asit ve pepsin miktarları ancak 1. ay civarında erişkin düzeyine gelmektedir. Mide asidinin düşük düzeyde olması lümen içinde pH'nın yükselmesine neden olur ve sonuçta bakteriyel kolonizasyon için daha uygun bir ortam oluşur.[22] Ayrıca yaşamın erken dönemlerinde barsak, sindirilmemiş proteinlere karşı daha geçirgendir. Bunun sebebi olarak mikrovillüs membranındaki geçirgenliğin yüksek olması gösterilmiştir. Buna yol açan etkenlerin ise; müsin içeriğinin yetersiz ve içerdiği lipid/protein oranının normalden yüksek olması olabileceği düşünülmüştür. Bu da erken dönemde beslenmeyle alınan bakteri ve toksinlerin hidrolize edilememesiyle sonuçlanmaktadır.

Yenidoğan barsağında erken dönemde salgısal IgA düzeyi ve T lenfosit sayısı daha düşüktür. Bu da bakteriyel invazyonu kolaylaştıran başka bir faktördür.[28] Diğer bir faktör olarak NEK'li yenidoğan ve prematürelerde barsak mukozasındaki Paneth hücrelerinin lizozim içeriğinin azalmasıdır. Bu da bakteriyel canlılık, yapışma ve translokasyonun kolaylaşması ile sonuçlanmaktadır.

2.3.2. Hipoksik İskemik Hasar

Nekrotizan enterokolitin etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak yıllardır NEK patogenezindeki en önemli faktörün mezenter iskemisi olduğu ileri sürülmektedir. Dalma refleksi teorisine göre hipoksik durumlarda kan, yaşamsal açıdan öncelikli organların korunması için kalp, beyin ve böbreklere yönlendirilir ve selektif olarak splanknik iskemiye yol açar buna bağlı olarak periferik organlar ve sindirim sistemine giden kan miktarında azalma olur.[29-31]

İskemi süresi uzarsa oluşan hasar geri dönüşümsüz hale gelir. Fetusta yüksek olan bazal intestinal vasküler rezistansın doğumdan hemen sonra düşmesiyle intestinal kan akımı artmaktadır. Bazal intestinal vasküler yatakta erken yenidoğan döneminde görülen bu değişiklikler vazodilatatör nitrik oksit, vazokonstriktör endotelin ve myojenik yanıta bağlıdır. Fizyolojik sınırlar içindeki perfüzyon basıncında azalma kan akım hızını sürdürmek için vazodilatasyonla sonuçlanır. Bu durum basınç-akım otoregülasyonu olarak adlandırılır. Yenidoğanda hipotansiyon geliştiğinde basınç-akım otoregülasyonundaki yetersizlikten dolayı intestinal oksijenizasyon yetersiz kalır. Orta derecede hipokside intestinal vazodilatasyon gelişip kanlanma artarken, şiddetli hipokside vazokonstrüksiyon ve iskemi gelişir.

Prematüre bebekler, hipoksi, asidoz, hipotansiyon, hipotermi, umblikal kateterizasyon gibi yenidoğanın barsak hasarının patogenezinde rol oynayan önemli faktörlere maruz kalır.[6,32,33]

İskemi sonrası gelişen reperfüzyon evresinde, yapımı artan serbest oksijen radikalleri, tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF-alfa), trombosit aktive edici faktör gibi inflamatuvar mediatörlerin intestinal mukozal zedelenmeyi daha da arttırarak ülserasyon ve nekroz oluşturdukları düşünülmektedir. Deneysel çalışmalarla da TNF-alfa ve trombosit aktive edici faktörün (PAF) NEK patogenezindeki rolü gösterilmiştir.[6,34-38]

2.3.3. Enteral Beslenme

Enteral beslenmeye hızlı ve erken geçiş, enterik kan akımında ve mukozanın oksijen ihtiyacında artmaya neden olmaktadır. NEK gelişen bebeklerin %90-95'inde enteral beslenmenin major rol oynadığı görülmüştür. Tamamen sindirilemeyen mamalar, gastrointestinal sistemde bakteri proliferasyonu için substrat görevi yaparak NEK gelişimine zemin hazırlamaktadır. Besinlerin emilimi sırasında barsakları etkileyen metabolik ihtiyacın artması, hipoksik iskemik stres, immatür vasküler düzenleme kapasitesi, immatür immün sistem ve gastrointestinal dismotilite doku hipoksisine yol açar ve takiben bakteriyel invazyonun da eklenmesiyle nekrotizan enterokolit gelişir. Hiperosmolar mamalarla beslenmenin de NEK riskini arttırdığı saptanmıştır.
Anne sütü, içerdiği lenfosit, makrofaj, laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozim, kompleman komponentleri, anti-stafilokokal ajanlar ve sekretuar IgA başta olmak üzere immünoglobulinler gibi laktobasillerin üremesini arttıran faktörler sayesinde NEK'ten koruyucu etki yapmaktadır. Ayrıca anne sütü NEK patogenezinde önemli rol oynayan mediatörlerden biri olan platelet aktive edici faktörün metabolizmasında anahtar enzim olan PAF asetilhidrolaz enzimini içermektedir. Ancak inek sütünde bu enzim bulunmamaktadır. Beslenme PAF sentezini stimüle ederek de NEK gelişimine zemin hazırlar.[6,39-45]

Son birkaç yıldır prematüre infantlarda dikkatli beslenme rejimleri ile NEK insidansının önemli oranda azaldığı bildirilmiştir. Yenidoğan uzmanlarının çoğu, az miktarda ve dikkatli olarak beslenmeyi önerse de, bu teknik az sayıdaki çalışma ile desteklenmiştir.[41,42]

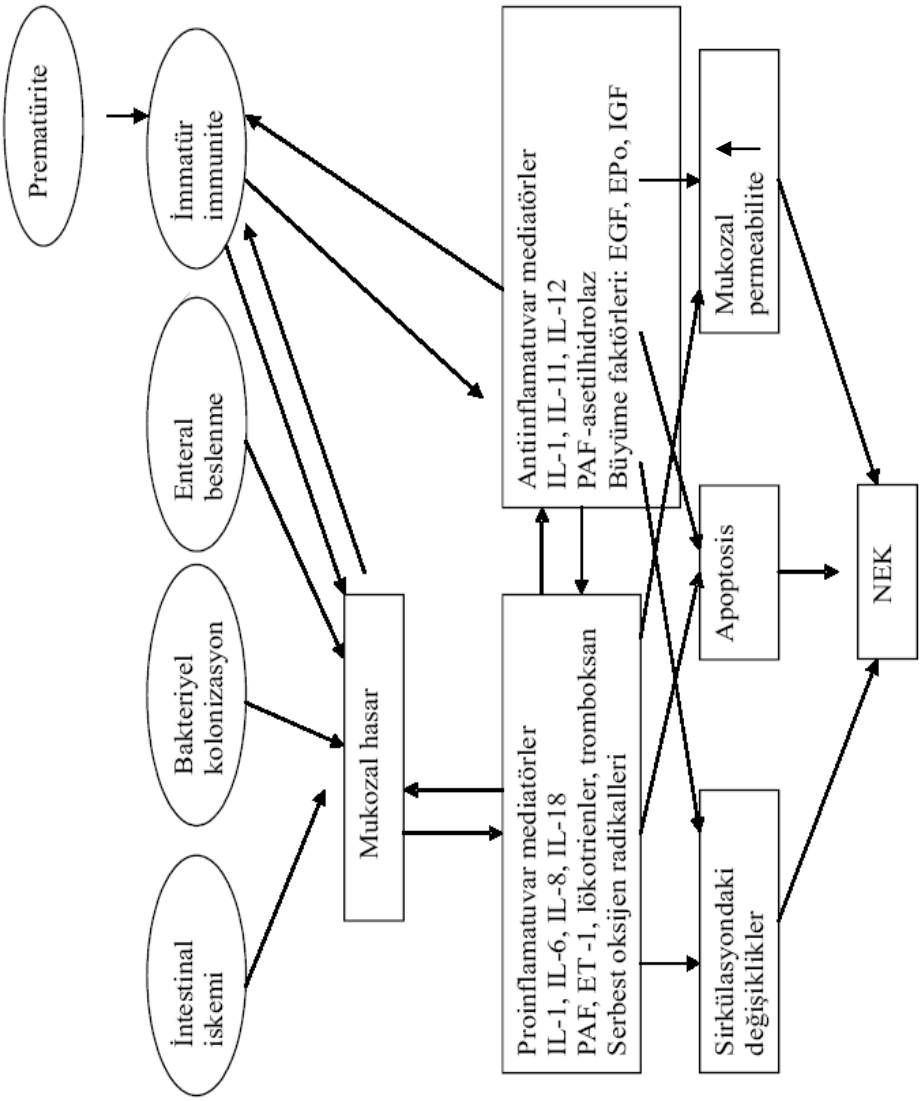
2.3.4. Enfeksiyon Ajanları

NEK patogenezinde yer alan bir diğer önemli faktör bakteri proliferasyonudur. Bakterilerin hastalığın primer başlatıcısı olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak prenatal dönemde steril olan intestinal sistemde in utero NEK olgusu tanımlanmamıştır ve inflamatuvar barsak nekrozunun başlangıcı için önceden barsak kolonizasyonunun olması gerekmektedir. Beslenmeye başlayan bebeklerde laktobasilus ve bifidusbakteria gibi anaerob bakteriler hızla intestinal sistemde kolonize olur. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen ve anne sütü ile beslenmeyen prematüre bebeklerin barsak florasının, sağlıklı term bebeklerden farklı olduğu tespit edilmiştir .[46]

NEK olguları çoğunlukla sporadiktir. Epidemiler esnasında etkilenen bebeklerin özellikleri sporadik vakalardan farklıdır. Bu bebeklerde sporadik olgulara göre daha yüksek apgar skoru ve doğum ağırlığı, daha az perinatal komplikasyon ve daha düşük ölüm oranları bildirilmiştir.[26] NEK epidemilerine rağmen etken olan spesifik bir mikroorganizma tespit edilememiştir. Bakteriler (Klebsiella pneumoniae, E. coli, Koagülaz negatif stafilokoklar), viruslar (Rotavirus, Corona virus ve diğerleri), Klostridumlar etken olabilmektedir.[21,25] Nonspesifik gastrointestinal rahatsızlıkların NEK salgınları esnasında arttığı, yenidoğan yoğun bakım personeli arasında epidemik periyottan önce, sonra ve epidemi sırasında da yine gastrointestinal rahatsızlıkların insidansının artmış olduğu bildirilmektedir. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin kalabalık olduğunda, NEK epidemi riskinin arttığıda gösterilmiştir.[12,35]

Beslenme , intestinal iskemi, bakteriyel kolonizasyon ve prematüriteden kaynaklanan yetersiz immün yanıt nedeni ile inflamatuvar yanıt gelişmekte bu da intestinal hasar ve NEK'e yol açmaktadır.[32] Mukozal hasar, serbest oksijen radikalleri, tümör nekroz edici faktör (TNF), PAF ve lökotrienleri içine alan inflamatuvar mediatörler aracılığıyla gerçekleştirilir. Özellikle PAF ve TNF-α, barsak hasarındaki ortak son yolda merkezi rol oynamaktadır.[47-51] Deneysel kanıtlar TNF-α'nın, akut iskemik barsak nekrozu ve NEK'in yenidoğan sıçan modelindeki rolünü kuvvetle

desteklemektedir. Barsaklardaki bu mediatörlerin salınımının ardından kemotaksis, transmigrasyon ve lökositlerin aktivasyonu olmaktadır. Epitelyal ve inflamatuvar hücrelerden IL-1, IL-3, IL-6, IL-8 IL-10, IL-18, araşidonik asit metabolitleri (tromboksan, lökotrienler, prostoglandinler), NO, endotelin ve oksijen radikalleri salınmaktadır. Eğer karşı düzenleyici yanıtlar (IL-1 reseptör antagonisti, IL-11, IL-12, PAF- asetil hidrolaz) yetersiz ise barsak mukozasında epitelyal hücrelerde apoptozis, mukozal permeabilitede artış, bakteriyel translokasyon, vaskuler tonusta değişiklikler ile nötrofil infiltrasyonu ve akümülasyonu ortaya çıkar. Sonuçta intestinal nekroz meydana gelir. Prematür bebeklerde proinflamatuvar ve antiinflamatuvar mediatörler arasında denge olmadığından NEK gelişiminin kolaylaştığıda bildirilmiştir.[4,51,52]



Şekil 1: NEK'e sebep olan etkenlerin şematik gösterimi[51]

2.4. NEKROTİZAN ENTEROKOLİTİN APOPTOZİS İLE OLAN İLİŞKİSİ

Hücrenin, programlanmış hücre ölümü yoluna girişi proapoptotik ve antiapoptotik sinyal yolakları arasındaki uygun dengeye bağlıdır. Memeli hücrelerinde, normalde hücrelerde inaktif prekursor enzimler olarak bulunan kaspazların aktivasyonu apopitoza gidiş yolunda kritik rol oynar. Kaspazlar ekstrensek ve intrensek yollarla aktive olabilir.[53] TNF-α, fas ligand ve TLR ligandlar ekstrensek yolun aktivatörleridir. İntrensek yolun aktivasyonu DNA hasarı ya da yüksek pH gibi toksik streslere yanıtla oluşabilir. Buna benzer bir uyarı, bcl-2 ailesine ait proapoptotik preoteinlerin aktivasyonuna yol açabilir.[53]

Prematür bebeklerde NEK oluşması için artmış riskin primer nedenlerinden bir tanesi mukozal bariyerin iyi gelişmemiş olması ve buna bağlı olarak bakterilerin lamina propriyaya translokasyonu ile inflamatuvar hücrelerin aktive olmasıdır. Mukozal bariyerin az gelişmiş olmasına ek olarak epitelyum tabakasının bütünlüğünün bozulması ile mukozal geçirgenlik daha da artmaktadır. Epitel hücrelerinde doğal olarak da bulunan apoptozis NEK'li hücrelerde aşırı derecede artmış bulunmuştur ve bahsedilen mukozal hasar başlangıcının artmış apoptozise bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bakteriyel translokasyonun sonucunda inflamatuvar kaskadın aktive olmasıyla artan inflamatuvar mediatörlerin epitelyal apoptozisi artırıyor olabileceği ve bir kısır döngüye girip NEK'in ilerlemesine neden olabileceği öne sürülmüştür.[1,8,9]

Jilling ve ark.'nın[7] deneysel olarak NEK oluşturdukları sıçanların barsaklarında TUNEL yöntemi kullanılarak bakılan kaspaz-3 aktivitesinin anne sütüyle beslenen sıçanların barsaklarındakinden çok daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma sırasında apoptozisin olduğu olgularda NEK'in de varolduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca NEK'i önlemek amacıyla pan-kaspaz inhibitörü olan BAF (8 boc-aspartil(OMe)-florometilketon)'ın eklendiği mamalar NEK'li olgularda denenmiş ve NEK'li sıçanlarda DNA fragmantasyonunun bu mama sayesinde azalmış olduğu ve hatta histolojik olarak da NEK'in daha az izlendiği gösterilmiştir. Böylece apoptotik genlerin inhibisyonuyla NEK'in önlenebileceği öne sürülmüştür.[7]

Pek çok çalışmada apoptozisin doku düzeyinde olup olmadığı araştırılmış fakat apoptotik genler ortaya tam olarak konulamamıştır. Bazı hayvan deneylerinde Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bax, Bad gibi apoptotik ve anti-apoptotik genler bakılmıştır. NEK'li sıçanların intestinal epitelyal hücrelerinde Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerin azaldığı, Bax gibi apoptotik genlerin ise arttığı gösterilerek NEK'in seyrinde apoptozisin bir basamak olduğu gösterilmiştir.[5,52]

Epidermal growth faktör (EGF) verilince NEK'in daha az olduğu fark edildiğinden Clark ve ark.[5] bunun EGF'nin apoptozisi azaltması ile olan ilişkisini araştırmışlardır. Bunu yaparken de deneysel olarak sıçanlarda NEK oluşturmuşlar ve EGF'nin enteral verilmesi ile intestinal morfoloji üzerindeki etkilerini, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bax ve Bad gibi apoptotik ve antiapoptotik genlerin, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin terminal ileumdaki ekpresyonundaki değişiklikleri araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda NEK'li sıçanların hasarlanmış ileumunda Bax/Bcl-2 mRNA oranının, Bax proteininin sağlıklı sıçanlarla karşılaştırıldığında belirgin derecede arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular ile ileal mukozada nekroz tamamen oluşmadan önce yaygın apoptozisin olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca EGF'nin apoptozisi engelleyerek apikal villusların şekillerini koruduğu gösterilmiştir.[5]

Zamora ve ark.'nın[11] yaptığı çalışmada BH3 içeren Bcl2 ailesinin bir üyesi ve apoptotik genlerden biri olan BNIP3'ün NEK ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Deneysel olarak NEK oluşturulan sıçanların barsak ve karaciğerinden alınan ve akut NEK nedeniyle barsak rezeksiyonu yapılan insan barsaklarından alınan doku örneklerinde BNIP3'ün düzeyi araştırılmış ve NEK'li olgularda BNIP3 düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir.[11]

Apoptozis ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı hasta gruplarında birçok apoptozis geni gösterilmiştir. Fakat yenidoğan bebeklerde NEK ile ilişkili apoptotik ve anti-apoptotik genleri intestinal düzeyde gösteren geniş kapsamlı bir çalışma yoktur.

2.5. PATOLOJİ

NEK, yenidoğanlarda barsağın bir veya birden çok bölümünü ya da tamamını tutabilen, koagülasyon nekrozu ve inflamasyonla karakterize bir hastalıktır. En sık ileum (%86), daha sonra kolon, daha sonra jejunum tutulur. Olguların %44'ünde hem ince barsaklar hem kolon etkilenir. Barsağın %75'inden fazlasında NEK tablosunun görülmesi ise "PAN-NEK", "fulminan NEK" ya da "NEK-totalis" olarak isimlendirilir. NEK'te perforasyonlar barsağın sıklıkla antimezenterik yüzündedir ve çoğunlukla terminal ileumda görülmektedir.[54]

Makroskopik olarak barsak şiş ve ödemli görünür. Serozal yüzey, fibrinöz eksuda nedeniyle kırmızı-gri ya da gangren oluşmuşsa siyah renktedir. Mikroskopik olarak ise en sık koagülasyon nekrozu ve inflamasyon, daha az olarak da ülserasyon, hemoraji ve pnömotozis intestinalis görülür. NEK perforasyona kadar ilerlemezse 3. günden sonra hızlı bir epitelizasyonla iyileşmeye başlar.[54]

2.6. RİSK FAKTÖRLERİ

NEK için risk faktörleri Tablo 1'de verilmiştir.[6,12,55,56]

Tablo 1: Nekrotizan enterokolit için risk faktörleri

Anemi	Kronik ishal
Perinatal asfiksi	Hipoksi
Kan değişimi	Patent Duktus Arteriozus
Respiratuvar Distres Sendromu	Fazla miktarlardaki mamanın kısa sürede
Konjenital GİS anomalileri	verilmesi
Umblikal kateterizasyon	Şok
Mama ile beslenme	Majör cerrahi girişim
Hipotermi	
Nazo-jejunal beslenme	

2.7. KLİNİK BULGULAR

NEK'li bebekler genellikle özgül gastrointestinal semptomlara sahiptir. Ancak NEK'in erken bulguları neonatal sepsisten ayırt edilemez. En sık bulgular abdominal distansiyon (%70-90), beslenme intoleransı ve gastrik rezidülerin artması, safralı kusma (>%70), kanlı gaita (%25-63), gastrointestinal gizli kanama (%22-59) ve ender olarak ishaldir (%4-26). Abdominal distansiyon, intestinal dilatasyon ve asite bağlı olarak gelişir. Başlangıç bulguları, sadece letarji ve ısı düzensizlikleri şeklinde olabilirken, daha sonra apne, bradikardi gibi ciddi kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi bulguları ortaya çıkabilir.[12,21,56]

Fizik incelemede, gerilmiş barsak ansları palpe edilebilir, bazen palpasyonda hassasiyet alınabilir. Bu dönemde dışkıda gizli kan pozitifliği tanıyı destekler. Hastalık ilerledikçe karın duvarı gri-mavi renk alır. Daha sonra hastalığın yaygınlaştığını ve peritonit geliştiğini gösteren endürasyon ve eritem ortaya çıkar. Sabit bağırsak ansları karında abdominal kitle olarak palpe edilebilir ve taze kanla bulaşık dışkılama görülebilir. Bazen perforasyon ve beraberinde şok, koagülopati ve multiorgan yetmezliği gelişebilir.[12,21]

NEK bulguları ani ve sinsi başlangıçlı olabilir. Ani başlayan formda sepsisten ayırt edilemeyen ani kötüleşme görülür. Bebekte gastrointestinal sistem ile ilgili bulgular ve fizik inceleme bulguları vardır. Ani başlangıçlı NEK hem preterm hem de term bebeklerde görülebilir. Solunum yetmezliği, şok, asidoz, belirgin abdominal distansiyon başlıca özellikleridir. Bu gruptaki hastalarda genellikle kan kültürü pozitifliği saptanır. Sinsi başlangıçlı NEK, 1-2 gün içinde gelişir. Beslenme intoleransı, gaita paterninde değişiklik, intermittan abdominal distansiyon ve gaitada gizli kan gibi bulgularla karakterizedir. Bu tablo preterm bebeklerde term bebeklere oranla daha sık görülür.[12]

2.8. LABORATUVAR BULGULARI

NEK'li hastalarda laboratuvar bulguları sepsisi destekler niteliktedir. Lökosit sayısında artma ve daha sıklıkla da lökopeni olabilir. Olguların yaklaşık %37'sinde beyaz küre sayısı 1500 mm3'ün altında bulunmuştur. Bazı çalışmalarda lökopeni gelişen NEK'li hastalarda, gram-negatif etkenlerin daha sıklıkta olduğu gösterilmiştir. Hastaların %87'sinde trombositopeni bulunmaktadır.[12] Koagülasyon bozuklukları, hipo-hiperglisemi, metabolik asidoz ve elektrolit bozuklukları olabilir. Metabolik asidoz sıklıkla şokun bir bulgusudur. Bazı hastalarda C-reaktif protein (CRP) düzeyinde artma görülür.[21,55,56] Tekrarlayan apneler ve abdominal distansiyona bağlı diafragmanın yukarı itilmesi sonucu hipoksi, hiperkarbi gelişebilir. Hastaların yaklaşık %10-30'unda kan veya peritoneal sıvıda pozitif kültür tespit edilir. Dışkı kültüründe üretilen mikroorganizma, kan veya periton sıvısı kültüründe üreyenle aynı olduğu zaman anlamlı kabul edilmelidir.[12] Sorumlu bakteriler yıllar ve merkezler arasında farklılık göstermesine rağmen, en sık saptanan etkenler, E. coli, Klebsiella spp, Enterobakter spp, koagülaz negatif stafilokok, Clostridium spp, Pseudomonas aeruginosa ve Candida albicanstır.[12,17,21,25]

2.9. RADYOLOJİK BULGULAR

NEK şüphesi olan olgularda mutlaka radyolojik değerlendirme yapılmalıdır. En sık erken bulgu ileustur. Diğer erken dönem bulguları, barsak anslarında dilatasyon ve hava-sıvı seviyesidir. Barsak duvarı içinde gaz görünümü (pnömotozis intestinalis) NEK'in patognomonik radyolojik bulgusudur. Gaz subseroza ile muskularis tabakası arasındadır ve patojen bakteriler tarafından üretilen hidrojene bağlı olarak oluşur. Pnömatozisin iki radyografik paterni tanımlanmıştır. Kistik patern, submukozadaki hava kabarcıklarından kaynaklanmakta olup, kalın barsaktaki fekal materyali taklit edebilir. Lineer patern ise hava kabarcıkları tarafından oluşturulup, barsak lümenine

paralel seyreder.[12] İntestinal nekrozis ve perforasyon NEK'in en ciddi komplikasyonudur ve hastaların üçte birinde görülür. Karın grafisinde serbest hava varlığı ile karakterizedir. NEK'li bazı hastalarda perforasyon ve nekrozisin radyolojik bulguları çok açık olmayabilir. Radyolojik olarak serbest hava varlığı sadece cerrahi girişim için endikasyondur, fakat diğer bulguların varlığında da cerrahi girişim düşünülebilir. İntramural hava mezenterik venöz dolaşım tarafından absorbe edildiği zaman, portal vende gaz (PVG) ile sonuçlanır. PVG karaciğer içinde hilustan perifere doğru ince, lineer hava dansitesi şeklinde görülür.[12,55]
Ultrasonografi, kontrast radyografi ve manyetik rezonans görüntüleme, kullanılabilen diğer tanı yöntemleridir. Abdominal ultrasonografi hasta başında uygulanabilmesi, invaziv girişim olmaması nedeniyle tercih edilir. Ultrasonografide barsaklardaki duvar kalınlaşması, asit ve portal vendeki gaz görülebilir.[55,57-60]

2.10. EVRELEME

NEK'in evrelemesi ilk defa 1973'de Bell tarafından yapılmıştır.[13] Bu evreleme tedavi şeklinin planlanması ve takip açısından önemlidir. Buna göre birinci evre şüpheli olguları, ikinci evre NEK bulgularının kesin olduğu olguları, üçüncü evre ise barsak nekrozunun oluştuğu olguları içerir.[16] Öykü, klinik ve radyolojik bulgulara dayanarak oluşturulmuş Bell evrelemesi Tablo 2'de gösterilmiştir.[16]

Tablo 2: NEK'te Bell evrelemesi.

EVRE 1 **(Şüpheli NEK)**	**EVRE 2** **(Kesin NEK)**	**EVRE 3** **(İlerlemiş NEK)**
□ Öyküde bir ya da birden çok perinatal stres faktörü □ Sistemik bulgular: apne, letarji, ısı düzensizlikleri ve bradikardi □Gastrointestinal bulgular: isteksiz beslenme, mide rezidüsü miktarında artış, kusma (safralı ya da gizli kan içerecek şekilde), hafif karın distansiyonu, fissür yokken gaitada gizli kan saptanması □ Radyolojik bulgular: ADKG'de genişlemiş barsak ansları ve subileus	□ Evre 1'e ek olarak □ Devam eden gizli ya da açık sindirim sistemi kanaması ve belirgin karın distansiyonu □ Karın grafisinde ciddi barsak genişlemesi ve ileus, barsak duvarında kalınlaşma, sebat eden barsak ansı, pnömotozis intestinalis ve portal vende gaz saptanması	□ İkinci evredekilere ek olarak □ Vital bulgularda bozulma, septik şok bulgularının gelişmesi ve ciddi sindirim sistemi kanaması □ ADKG'de diafragma altı serbest hava görülmesi

2.11. TEDAVİ

NEK'in sağaltımı medikal ve cerrahi tedavi olmak üzere iki şekilde yapılır. NEK şüphesinde veya varlığında tedaviye erken başlanılmalıdır. NEK olgularının çoğunda medikal tedavi yeterli olmaktadır. Tıbbi tedavinin temel amacı, barsakları dinlendirerek hastalığın ileri evrelere geçişini önlemek, enfeksiyonu kontrol etmek, metabolik dengeyi sağlamaktır.[12]

2.11.1. Medikal Tedavi Basamakları

• Enteral beslenme kesilir ve abdominal distansiyonu azaltmak için nazogastrik drenaj uygulanır.
• Umblikal kateter varsa çekilir.
• Isı, oksijen satürasyonu, solunum sayısı, aldığı çıkardığı ve karın çevresi yakından takip edilir.
• Semptomlar devam ettiği sürece 6-12 saat arayla radyolojik değerlendirme yapılır.
• Sıvı elektrolit dengesi sağlanır. Metabolik asidoz varsa tedavi edilir.
• Kan, trombosit, plazma desteği sağlanır.
• Ampirik olarak antibiyotik tedavisi başlanır ve 10-14 gün sürdürülmelidir. Önerilen genellikle ampisilin, aminoglikozit ve anaerobik bakterileri kapsayan metronidazol veya klindamisin şeklinde üçlü antibiyotik tedavisidir.[17,61]
• Bebek stabilize edildikten sonra total parenteral nütrisyon başlanmalıdır.
• Karın grafileri, karın bakısı ve gastrointestinal fonksiyonlar normale döndükten sonra, en az 5 gün geçmeden enteral beslenmeye başlanmamalıdır.[12,55]

2.11.2. Cerrahi Tedavi

Medikal tedaviye rağmen NEK olgularının %34-50' sinde cerrahi tedaviye ihtiyaç olmaktadır.[12] NEK ön tanısı almış ya da NEK tanısı ile medikal tedavi uygulanan bebeklerde klinik gidişin bozulması, karında serbest hava saptanması, karın ön duvarında ödem ve eritem, karında kitle ele gelmesi, karın ponksiyonunda barsak nekrozu işaretlerinin olması, radyolojik olarak portal vende gaz görülmesi cerrahi tedavi endikasyonudur.[12,55] Ancak bu cerrahi endikasyonlar herkes tarafından kabul edilmez. Hemen hemen tüm çocuk cerrahlarının üzerinde uzlaştıkları üç temel cerrahi endikasyon; diafragma altında serbest hava görülmesi, portal vende gaz görülmesi ve karın ponksiyonunda barsak nekrozu işaretlerinin olmasıdır.[62] Karın

ponksiyonunda barsak nekrozu işaretlerinin olması ya da başka bir deyişle pozitif parasentez diyebilmek için karından alınan sıvı 0.5 ml'den fazla, kahverenkli ve Gram boyasıyla boyandığında bakteri görülen özelliklerde olmalıdır**.**

Cerrahi tedavide nekrotik barsak bölgesi rezeke edilir ve ostomi açılır ve bebeğin genel durumu düzeldikten sonra ikinci ameliyatla reanastomoz yapılır.[12,63]

Çok düşük doğum ağırlıklı ya da genel durumu cerrahiye alınamayacak kadar kötü olan hastalarda, laparotomi öncesi bir süre peritoneal drenaj (PD) uygulanması ve izlemde gerekirse laparotomi yapılması da önerilmektedir.[64-68]

2.12. PROGNOZ

NEK'in mortalitesi %30-40 arasında değişmektedir.[4,6,21,22,25] Cerrahi tedavi gerektiren olgularda ise bu oran %60'lara yükselmektedir. Cerrahi veya medikal tedaviden sonra yaşayanların %25-35'inde barsaklarda darlık gelişmektedir. Bu perfore olmayan barsak bölgesindeki skar gelişimi nedeniyledir. Çoğunlukla akut dönemde semptomatik olmasına rağmen bazı darlıklar 6 ay gibi uzun bir süre semptom vermeyebilir. Bu hastalarda beslenme problemleri, diyare veya barsak obstrüksiyonu şeklinde bulgularda ortaya çıkabilmektedir.[12,21,69]

NEK'in en sık geç komplikasyonları darlık, fistül, abse, rekürren NEK, kısa barsak sendromu, malabsorbsiyon, kolestaz ve enterokist gelişimidir. [12,21,69]

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi AD ve Zekai Tahir Burak Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Cerrahisi Kliniğinde 01.01.2010 tarihinden 01.01.2012 tarihine kadar NEK nedeniyle cerrahi işlem uygulanan 6 bebekten çıkarılan intestinal segmentin hastalıklı bölgeden 1x0.5 cm boyutunda doku örnekleri alındı. Kontrol amacı ile 01.01.2010 tarihinden 01.01.2012 tarihine kadar 6 rezeksiyon anastomoz yapılan intestinal atrezili bebeklerden çıkarılan intestinal segmentten veya herhangi bir nedenle ileostomi açılmış hastaların iyileşme sonrası ileostomi kapatılması sırasında ostomi ağzından 1x0.5 cm boyutunda alınan normal (hastalıksız) doku örnekleri kullanıldı. Alınan doku örnekleri sonraki PCR çalışmaları için sıvı nitrojen içinde -80 derecede saklandı. Alınan bir doku parçası da formol içine alınarak histopatolojik inceleme için hazırlandı ve NEK açısından değerlendirildi. Doku hasarı ve apoptozis histopatolojik olarak ışık mikroskobu incelemesi ve TUNEL yöntemi ile belirlendi.[7] Apoptotik ve antiapoptotik gen düzeyleri PCR Array yöntemi ile belirlendi.[5]

3.1. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

3.1.1. Işık Mikroskobu İncelemesi

Doku örnekleri %10 nötral formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra histolojik takip işlemlerine başlandı. Dereceli alkollerden geçirilerek yapılan dehidratasyon işleminden sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular sıvı parafinle 60 C^0 de inkübe edildi. Parafin infiltrasyonundan sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklar +4 C^0 de buzdolabında bekletildi. Örneklerden Leica RM 2125RT model mikrotom kullanılarak 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitler 60 C^0 lik etüvde parafin erimesi için 1,5 saat bırakıldı. Histolojik boyamaya hazır

hale getirilen doku kesitlerine, Hematoksilen Eozin boyası uygulandı ve NEK bulguları açısından değerlendirme Tablo 3 ‘de verilen sisteme uygun olarak yapıldı.

Tablo 3: Doku Hasar Derecelendirme Sistemi

Grade	Açıklama
0	Normal histoloji
1	Hidropik dejenerasyon, minimal derecede yüzeyel epitel hücrelerinin lamina propriadan ayrılması ve/veya submukoza ayrılması
2	Orta derecede submukoza ve/veya lamina propriya ayrılma ve/veya submukoza ve muskularis tabakalarında ödem, yüzey epitelinde kısmi hücre nekrozu
3	Şiddetli submukoza ve/veya lamina propriya ayrılması ve/veya submukoza ve muskularis tabakalarında ödem
4	Transmural nekroz

3.1.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

Doku örneklerinde apopitozu gösterebilmek amacıyla TUNEL yöntemi kullanıldı. Parafine gömülü dokular 3-4 μm kalınlığında kesilerek polilizin kaplı lamlara alındı. Kesitler bir gece $37C^0$ de etüvde bekletildikten sonra ksilen, alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi. Oda sıcaklığında proteinlerin sindirilmesi amacıyla proteinaz K (20μg/ml) ile 10 dakika inkübe edildi. Distile su ile yıkanan doku örnekleri endojen peroksidazın baskılanması için %3 H_2O_2 ile 5 dakika muamele edildi. PBS ile yıkandı. Kurulanan kesitlerin üzerine 10 saniye süre ile dengeleyici tampon konuldu. TUNEL immunohistokimyasal boyama setine ait (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7100, Chemicon) Tdt enzimi her lama eklenip, nemli ortamda 1 saat 37 C^0 de inkübe edildi. Durdurma-Yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dakika yıkandı. Daha sonra PBS ile yıkamayı takiben anti-digoxigenin–peroksidaz ile 30 dakika oda sıcaklığında nemli ortamda tutuldu. PBS ile yıkamayı takiben kesitlerin üzerine DAB (diaminobenzidine) substrat solusyonu damlatıp, 3-6 dakika arasında pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında tesbit edildi. Renk reaksiyonunun oluşmasından hemen sonra kesitler distile su ile yıkandı. Nükleusların boyanması için kesitlere 10-15 dakika metil yeşili boyaması uygulandı.

Pozitif kontrol olarak boyama setinin referans kabul ettiği mesane doku kesiti kullanıldı. Kesitler ayrı iki araştırmacı tarafından grupları bilinmeksizin Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobuyla incelendi, apopitoz değerlendirmesi için Tablo 4'de verilen skorlama sistemine göre değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Tablo 4: Apopitoz Skoru

Skor	Açıklama
0	Yüzey epitelinde birbirinden ayrı duran TUNEL (+) nukleuslar
1	Yüzey epitelinde izlenen TUNEL (+) nukleus grupları
2	Yüzey epitelini tamamen kaplayan ancak kriptaya inmemiş TUNEL (+) nukleus grupları
3	Villus epiteli ve kriptalarda TUNEL (+) nukleus grupları
4	Transmural yayılım gösteren TUNEL (+) nukleus grupları

3.2. RNA İZOLASYONU VE REAL TİME RT-PCR

Apoptotik ve antiapoptotik gen düzeyleri PCR Array yöntemi ile belirlendi.
mRNA izolasyonu RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. RNA'nın kontrolü jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. RNA miktarı spektroskopik olarak saptandı. İzole edilen RNA örneklerinin kantitatif analizi "Real Time RT-PCR' olarak bilinen metodoloji ile "RT-PCR Array Kiti" kullanılarak sağlandı. Değerlendirme "karşılaştırmalı Ct metodu'' veya $2^{-\Delta\Delta C}{}_{T}$ metodu olarak adlandırılan istatistik metoduna göre yapılarak Ct değerleri hesaplandı. (Bkz. http://www.pcr-encyclopedia.com/statistics-nonparametrics-analysis-7464.html) veya (http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm). Beta-2-microglobulin (B2M), Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), Ribosomal protein L13a (RPL13A), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Beta Actin (ACTB) olarak adlandırılan "house keeping genleri" için elde edilen Ct değerlerinin ortalaması ile kontrol ve NEK hastaları için saptanan genlerin (gönderilen genler) Ct ortalamaları normalize edildi. Bu normalizasyon üzerinden gen ekspresyonundaki

değişim (fold change) olarak belirlendi. Gen ekspresyonundaki fold change (ekspresyondaki artış veya azalma) kontrol hastalar için elde edilen değerlerin ortalaması 1 (sabit değer) kabul edilerek, kontrol hastalara göre gen ekspresyonundaki değişim olarak saptanmıştır.

.

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Apopitotik skor ve dokulardaki hasar derecelendirilmesinin istatistiksel olarak değerlendirmesinde gruplar arası kıyaslamalar için Mann-Whitney U testi uygulandı. Gen transkripsiyon çalışmalarında Student's t-test istatistiksel yöntem ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark $p<0.01$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Hematoksilen-Eozin ile yapılan histolojik incelemede kontrol grubunda dört hastanın doku örneklerinde grade 1 olarak tanımlanan hafif derecede yüzey epitelinin lamina propriyadan ayrılmasına rastlandı (Resim 1). Bir hastada grade 2 ile uyumlu submukoza ayrılması izlendi. Bir hastada ise grade 3 olarak tanımlanan orta derecede submukoza ve lamina propriya ayrılmaları, yüzey epitelinde kayıplar mevcuttu.

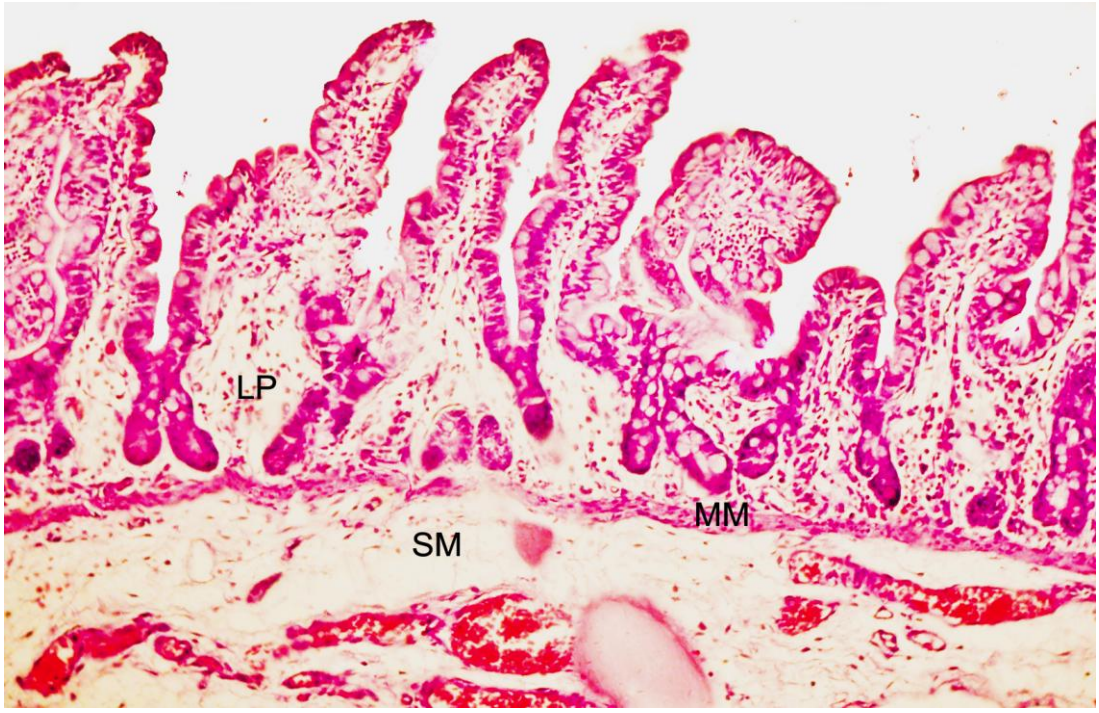
NEK grubunda ise bir hastada grade 2 ile uyumlu orta derecede yüzeyel epitel hücrelerinin lamina propriadan ayrıldığı, submukoza tabakasının ödemli ve yer yer ayrılmaların olduğu gözlendi (Resim 2). İki hastada grade 3 bulgularına ek olarak lamina propriyada kanama alanları ve kripta boy ve sayısında azalma tesbit edildi (Resim 3). Üç hastada ise yüzey epitelinin kaybolduğu, kript yapısının bozulduğu, lamina propriyanın konjesyona uğradığı, tabaka yapılarının ayırt edilemediği görüldü (Resim 4).

NEK'li grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında doku hasarının NEK'li bebeklerde belirgin olarak daha fazla olduğu izlenmiştir($p<0.01$).

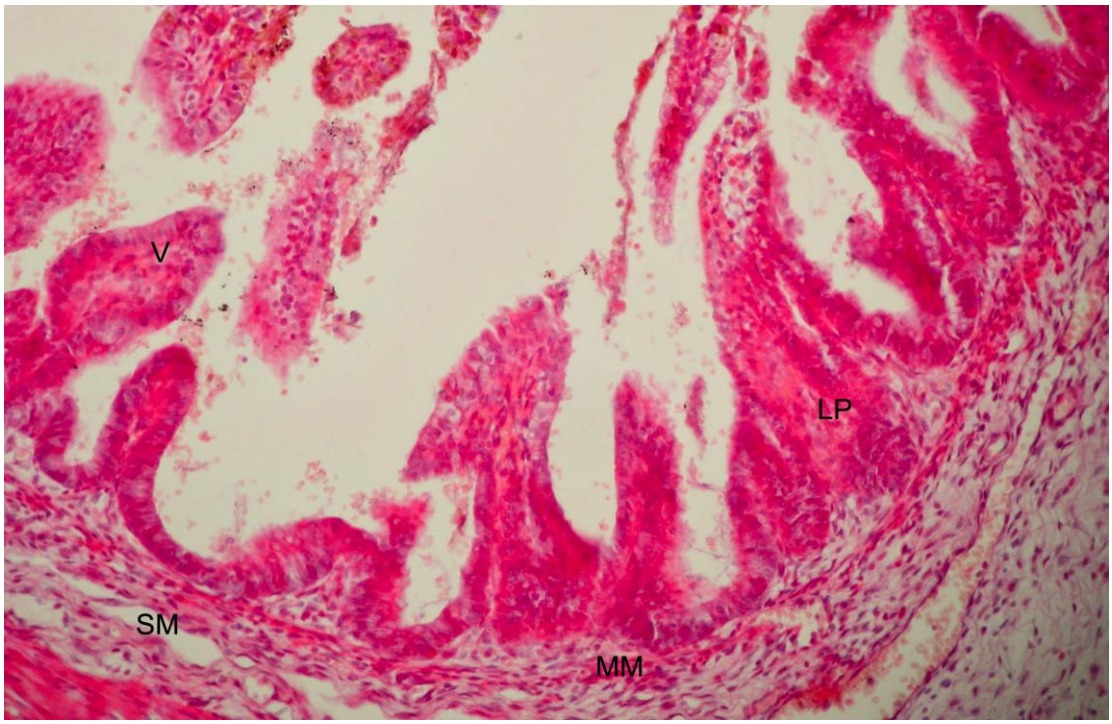
Tablo 5: Çalışma grubunda dokularda hasar derecelemesi

Gruplar	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
NEK Grubu (n=6)	-	-	1	2	3
Kontrol Grubu (n=6)	-	4	1	1	-

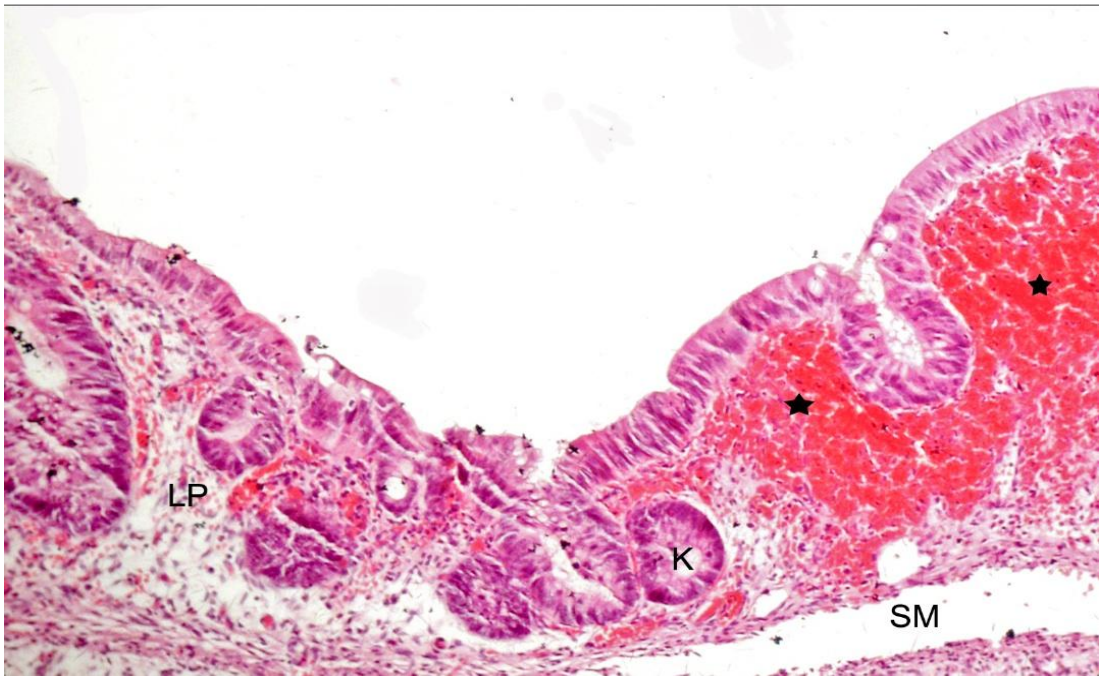
NEK grubunun kontrol grubundan farkı $p<0,01$



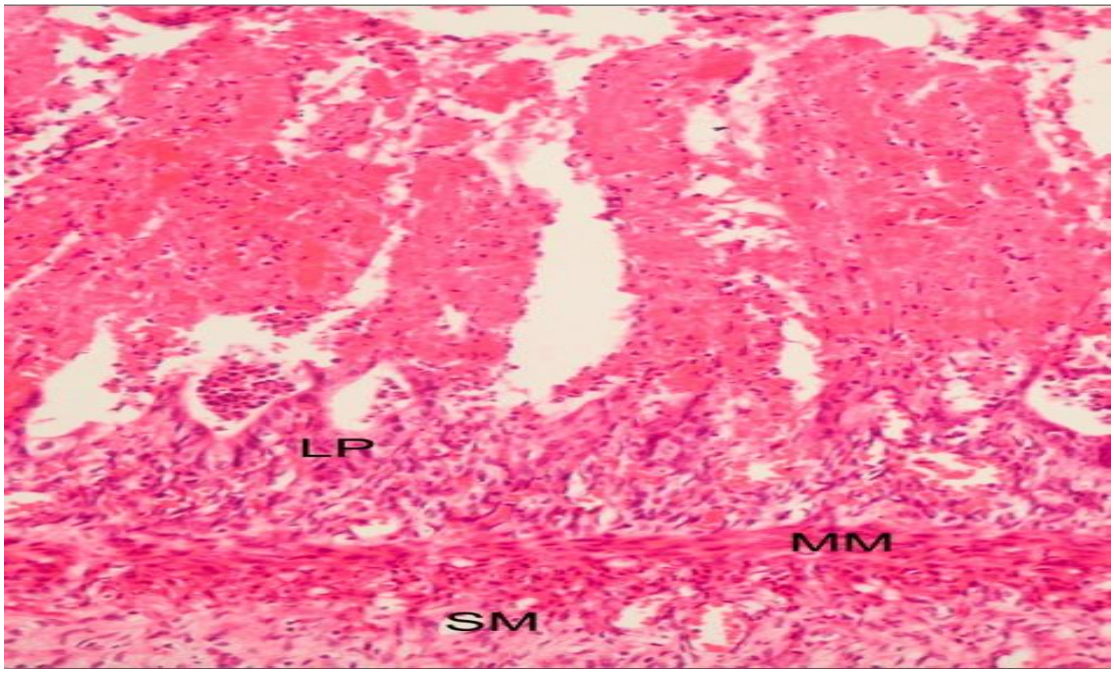
Resim 1: Kontrol Grubu. Grade 1. Lp:Lamina propriya, MM:Muskularis mukoza, SM: Submukoza. H.E x200



Resim 2: NEK grubu. Grade 2. V: Villus, LP:Lamina propriya, MM:Muskularis mukoza, SM: Submukoza H.Ex200



Resim 3: NEK grubu. Grade 3. K. Kripta, LP:Lamina propriya, SM: Submukoza Yıldız: Lamina propriyada kanama alanları .H.Ex200



Resim 4: NEK grubu. Grade 4. LP:Lamina propriya, MM: Muskularis mukoza, SM: Submukoza.H.Ex200

TUNEL yöntemiyle değerlendirilen örneklerde kontrol grubuna ait üç hastada skor 1 ile uyumlu olarak yalnızca yüzey epitelinde TUNEL (+) nukleuslar (Resim 5) izlenirken, iki hastada skor 2 ile uyumlu, yüzey epitelini tamamen kaplayan ancak kriptaya inmemiş TUNEL (+) nukleus grupları görüldü (Resim 6). Bir hastada ise kriptalarda da yer yer TUNEL (+) hücre nükleusları izlendi ve skor 3 olarak değerlendirildi (Resim 7).

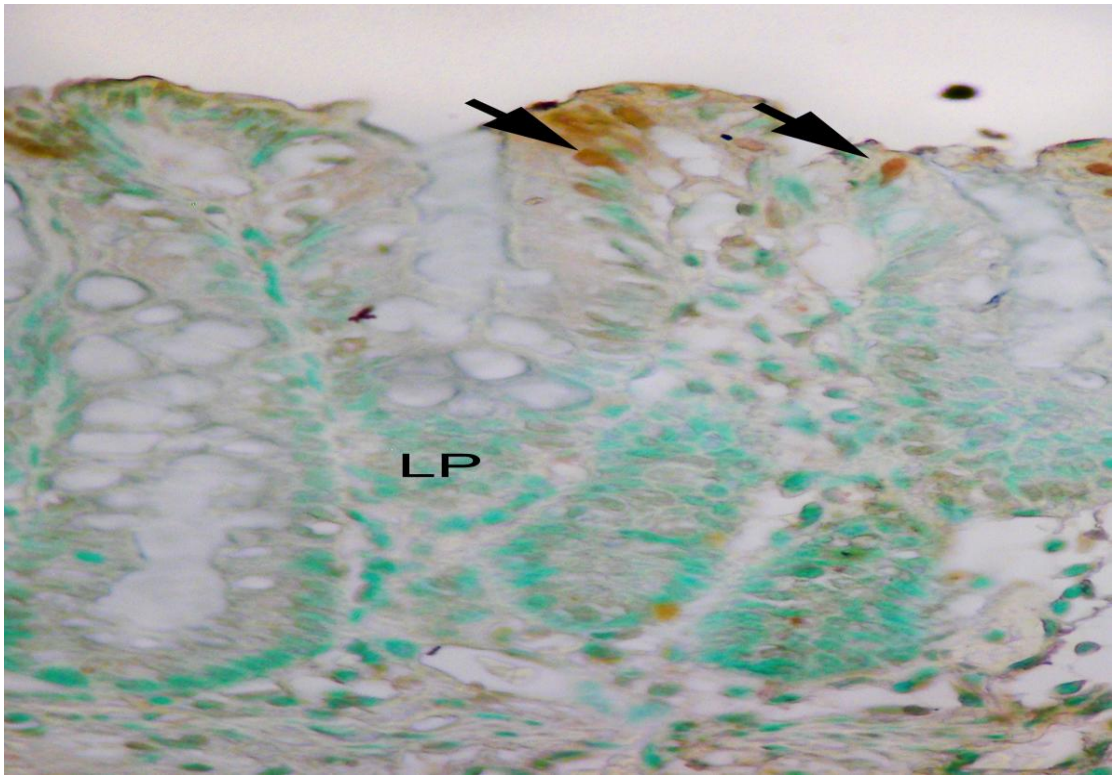
NEK grubunda üç hasta skor 3 olarak değerlendirilirken diğer üç hastanın örneklerinde tüm barsak duvarında yayılım gösteren TUNEL (+) nukleus gruplarının varlığı skor 4 olarak değerlendirildi (Resim 8).

Bu skorlamaya göre NEK'li grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında apoptozisin NEK'li bebeklerde belirgin olarak daha fazla olduğu izlenmiştir ($p<0.01$).

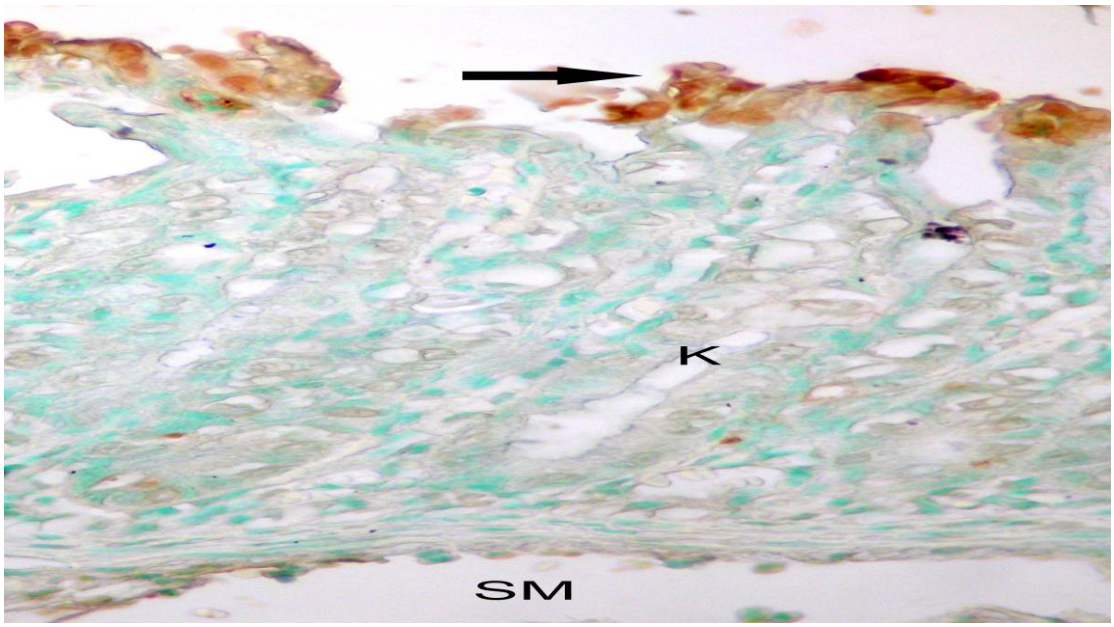
Tablo 6: Çalışma grubunda apopitoz skoru

Gruplar	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3	Skor 4
NEK Grubu (n=6)	-	-		3	3
Kontrol Grubu (n=6)	-	3	2	1	-

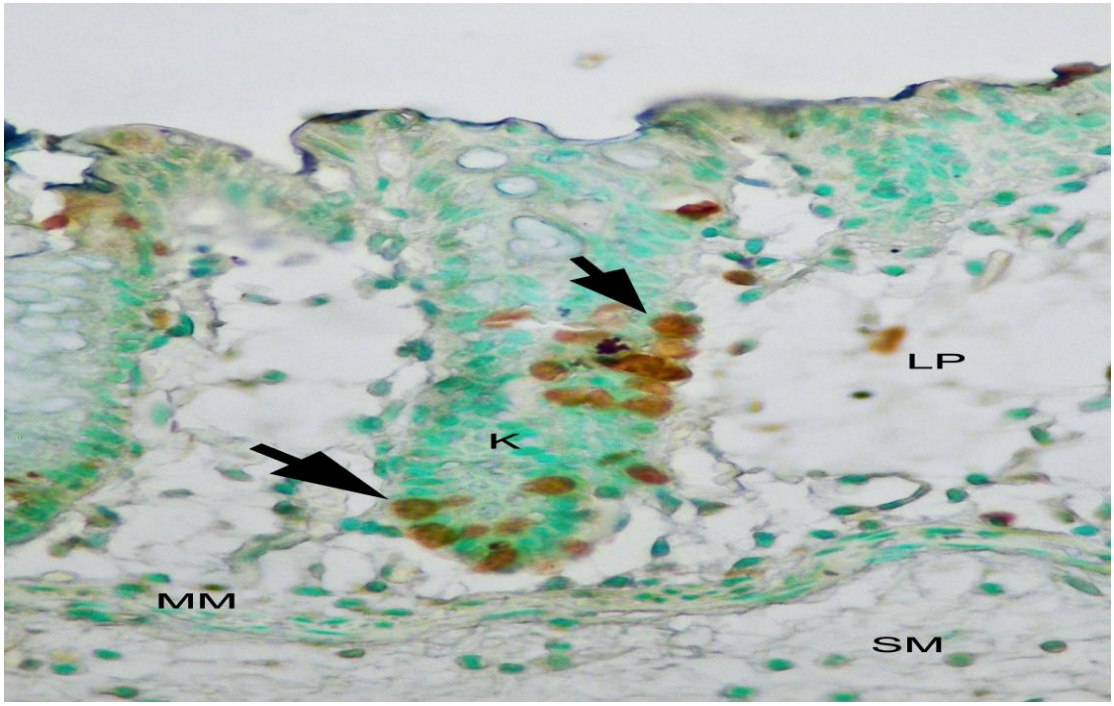
NEK grubunun kontrol grubundan farkı $p<0,01$



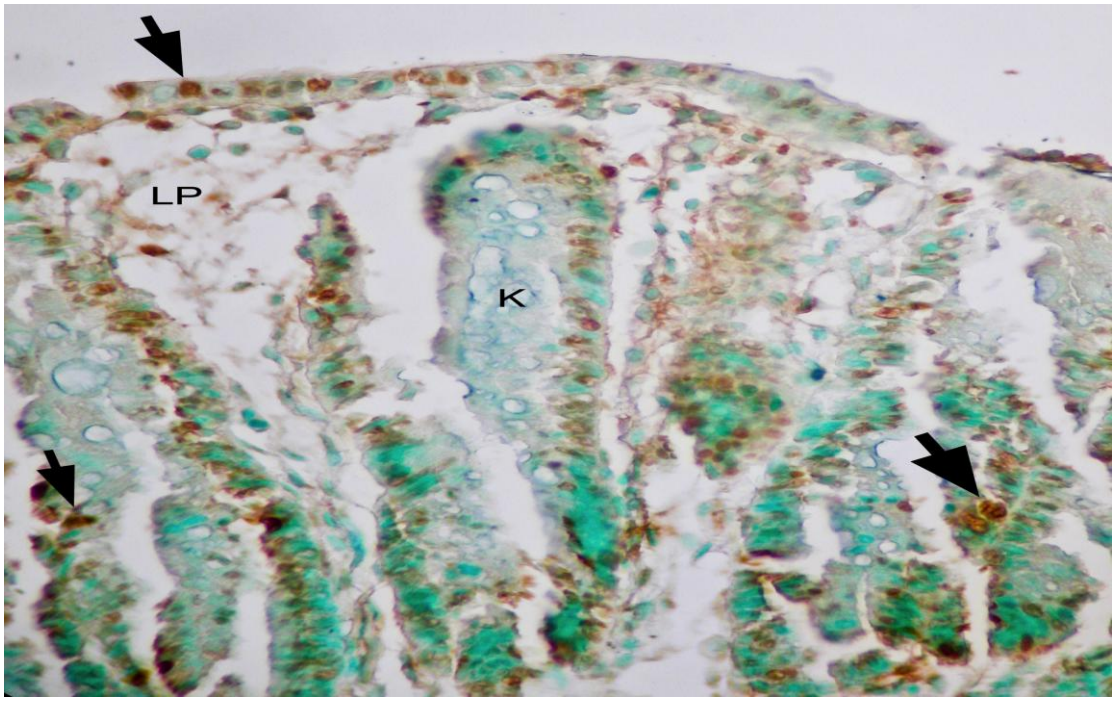
Resim 5: Kontrol Grubu. Skor 1. TUNEL(+) hücreler (ok)yüzey epitelinde tek tek izlenmekte. x400



Resim 6: Kontrol Grubu. Skor 2. TUNEL(+) hücre nükleusları (ok) yüzey epitelinde gruplar şeklinde izlenmekte. x400



Resim 7: Kontrol Grubu. Skor 3. TUNEL(+) hücreler (ok) yüzey epitelinde ve kript tabanında izlenmekte. K: Kripta, LP:Lamina propriya, MM:Muskularis mukoza, SM: Submukoza x400



Resim 8: NEK Grubu. Skor 4. Transmural yayılım gösteren TUNEL (+) nukleus grupları (ok) K: Kripta, LP:Lamina propriya, x400

RT Real Time PCR kullanılarak barsaklardaki apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonları değerlendirildi. Apoptotik genlerden kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7, BIRC2, Bax genlerinin mRNA düzeyleri NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).

Anti-apoptotik Bcl-2A1 geninin mRNA düzeyi ise NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulunmuşltur ($p<0.01$).

Kaspaz-1, kaspaz-3, kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde ise iki grup arasında istatistiksel olarak anamlı fark bulunamadı.

Tablo 7: Apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonundaki değişim

Genler	Fonksiyon	Gen ekspresyonundaki değişim
Kaspaz-1	Apoptoz, sistein peptidaz	+ 0.68 ± 0.10
Kaspaz-2	Apoptoz, sistein peptidaz	+ 6.70 ± 1.06*
Kaspaz-3	Apoptoz, sistein peptidaz	+ 1.15 ± 0.07
Kaspaz-6	Apoptoz, sistein peptidaz	+ 5.33 ± 1.60*
Kaspaz-7	Apoptoz, sistein peptidaz	+ 10.52 ± 2.12*
Kaspaz-9	Apoptoz, sistein peptidaz	+ 1.21 ± 0.02
BCL2A1	Bcl-2 related protein A1, Anti-apoptotik	- 5.42 ± 1.32*
BIRC2	Baculoviral IAP tekrar içeren 2, apoptotik	+ 5.20 ± 1.16*
BAX	Bcl-2 Asosiye X protein, apoptotik	+ 27.24± 5.16*

n = 12, Mean ± SDV, *p<0.01

5. TARTIŞMA

NEK patogenezinin başlangıcında apoptozis artmış olduğu, apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarındaki değişiklikler meydana geldiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir.[7] Bu çalışmada NEK'li yenidoğan bebeklerden alınan NEK tutulumlu doku örneklerinde çalışılan apoptotik genlerden kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7, BIRC2, Bax genlerinin arttığı, anti-apoptotik genlerden Bcl-2A1 geninin mRNA düzeyinin azaldığı görülmüştür.

Nekrotizan enterokolit intestinal iskemi sonucunda immatür barsağın, yaralanmaya karşı reaksiyon göstererek mukozal zedelenmenin geliştiği çok etkenli bir hastalıktır. Yenidoğanlarda karşılaşılan en sık intraabdominal acil durumların başında gelir.
NEK'in en önemli risk faktörlerinden birisi prematüritedir ve NEK riski doğum ağırlığı ve gestasyonel yaş ile ters orantılıdır. Böylece, obstetri ve yenidoğan bakımındaki gelişmeler sayesinde çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin (ÇDDA<1500 gr) yaşatılmasıyla NEK için risk altındaki populasyon gittikçe büyümektedir. NEK yenidoğan yoğun bakım ünitelerine başvuran tüm hastaların %1-5'inde gelişmektedir. NEK sıklığı çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde (<1500 gr) artarak %15'ye ulaşmıştır.[2-4]

İntestinal iskemi, patolojik bakteri kolonizasyonu ve intestinal lümende aşırı besin varlığı NEK'in risk faktörleri arasındadır. İntestinal nekroz barsak iskemisine ve daha sonra oluşan reperfüzyona bağlıdır.
Hücrenin programlanmış hücre ölümü yoluna girişi proapoptotik ve antiapoptotik sinyal yolakları arasındaki uygun dengeye bağlıdır. Memeli hücrelerinde, normalde hücrelerde inaktif prekursor enzimler olarak bulunan kaspazların aktivasyonu apopitoza gidiş yolunda kritik rol oynar. Kaspazlar ekstrensek ve intrensek yollarla aktive olabilir.[53] TNF-α, fas ligand ve TLR ligandlar ekstrensek yolun aktivatörleridir. İntrensek yolun aktivasyonu DNA hasarı ya da yüksek pH gibi

toksik streslere yanıtla oluşabilir. Buna benzer bir uyarı , bcl-2 ailesine ait proapoptotik preoteinlerin aktivasyonuna yol açabilir.[53]

NEK'in patogenezinde enterositlerde hipoksi sonrası başlayan apoptozis ve barsak bariyer yetmezliği sonrasında oluşan bakteriyel invazyon ve intestinal duvar hasarlanması vardır. Çalışmalarda hastalığın başlangıcının apikal villuslardaki hücrelerdeki apoptoziste artış olduğu gösterilmiştir.[5] Jilling ve ark.'nın[7] sıçanlarda yaptığı çalışmada NEK histolojik olarak gelişmeden önce apoptozisin daha önce geliştiği hipotezi öne sürülmüştür. Çalışmaları sırasında apoptozisin olduğu vakalarda NEK'in de varolduğu gösterilerek hipoteze tamamen uyduğu gösterilmiştir. NEK'li bebeklerin barsaklarından alınan örneklerde DNA parçalanmasının artmış olduğu TUNEL boyama ile gösterilmiştir.[7]

Bu çalışmada da histopatolojik olarak dokulardaki hasar derecesi H&E boyası sonrası direkt mikroskopi ile ve apoptozisde ki artış TUNEL testi ile değerlendirildi. TUNEL yöntemiyle değerlendirilen örneklerde kontrol grubuna ait üç hastada skor 1 ile uyumlu TUNEL (+) nukleuslar izlenirken, iki hastada skor 2 ile uyumlu TUNEL (+) nukleus grupları görüldü. Bir hastada ise skor 3 TUNEL (+) hücre nükleusları izlendi. NEK grubunda üç hasta skor 3 ile uyumlu TUNEL (+) nukleuslar izlenirken, diğer üç hastanın örneklerinde skor 4 TUNEL (+) nukleus gruplarının varlığı izlendi. Kontrol grubunda skor 0'ın olmamasının nedeni bu grubun tamamen normal yenidoğanlar olmayıp altta yatan NEK dışında (intestinal atrezi, mekonyum ileusu, vb.) patolojiler nedeniyle ameliyat edilmiş olmalarına bağlı olduğu düşünüldü. Altta yatan hiçbir patolojisi olmayan yenidoğanlar ameliyata alınamayacağından dolayı böyle bir sonucun çıkması kaçınılmazdır.

NEK'li grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında apoptozisin NEK'li bebeklerde belirgin olarak daha fazla olduğu izlenmiştir ($p<0.01$).

NEK patogenezinin başlangıcında apoptozis artmış olup buna bağlı bakteriyel translokasyon ve bunun sonucunda lokal intestinal sitokinlerin üretimiyle inflamatuvar kaskad aktive olmaktadır. İnflamatuvar mediatörlerin artması ile de epitelyal apoptozisin artıyor olabileceği ve bu kısır döngü ile de NEK'in ilerlediği öne sürülmüştür.[1,8,9] Beslenme , intestinal iskemi, bakteriyel kolonizasyon ve

prematüriteden kaynaklanan yetersiz immün yanıt nedeni ile inflamatuvar yanıt gelişmekte bu da intestinal hasar ve NEK'e yol açmaktadır.[32] Mukozal hasar, serbest oksijen radikalleri, TNF-α, PAF ve lökotrienleri içine alan inflamatuvar mediatörler aracılığıyla gerçekleştirilir. Özellikle PAF ve TNF-α, barsak hasarındaki ortak son yolda merkezi rol oynamaktadır.[47-51] Deneysel kanıtlar TNF-α'nın, akut iskemik barsak nekrozu ve NEK'in yenidoğan sıçan modelindeki rolünü kuvvetle desteklemektedir. Barsaklardaki bu mediatörlerin salınımının ardından kemotaksis, transmigrasyon ve lökositlerin aktivasyonu olur. Epitelyal ve inflamatuvar hücrelerden IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, araşidonik asit metabolitleri (tromboksan, lökotrienler, prostoglandinler), NO , endotelin ve oksijen radikalleri salınır. Eğer karşı düzenleyici yanıtlar (IL-1 reseptör antagonisti, IL-11, IL-12, PAF-asetil hidrolaz) yetersiz ise barsak mukozasında epitelyal hücrelerde apoptozis, mukoza permeabilitesinde artış, bakteriyel translokasyon, vasküler tonusta değişiklikler ile nötrofil infiltrasyonu ortaya çıkar. Sonuçta intestinal nekroz meydana gelir. Prematür bebeklerde proinflamatuvar ve antiinflamatuvar mediatörler arasında denge olmadığından NEK gelişimi kolaylaşır.[4,51,52]

NEK'in hayvan modellerinde mukozal geçirgenliğin artmış olduğu gösterilmiş ve bununla birlikte submukozaya bakteriyel translokasyon ile sekonder inflamatuvar kaskadın aktive olması mukoza bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. NEK'te mukozal geçirgenliğin artması, mukoza hücrelerinin kaybına bağlıdır. Bu çalışma ile patolojik olarak artmış epitel apoptozisine bağlı hücre kayıplarının belirgin olarak mukoza geçirgenliğinin artmasına ve doku hasarına neden olduğu gösterilmiştir.[7]

Bu çalışmada Hematoksilen-Eozin ile yapılan histolojik incelemede kontrol grubunda dört hastada grade 1 doku hasarı varken, bir hastada grade 2, bir hastada grade 3 doku hasarı mevcuttu. NEK grubunda ise üç hastada grade 4 doku hasarı varken, iki hastada grade 3 ve bir hastada grade 2 doku hasarı mevcuttu. NEK'li grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında doku hasarının NEK'li bebeklerde belirgin olarak daha fazla olduğu izlenmiştir ($p<0.01$).

Bazı hayvan deneylerinde Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bax, Bad gibi apoptotik ve anti-apoptotik genler bakılmış ve NEK'te anti-apoptotik genlerin azaldığı, apoptotik genlerin ise arttığı gösterilmiştir.[5]

Zamora ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada apoptotik genlerden biri olan BNIP3'ün NEK ile olan ilişkisi araştırılmıştır. NEK'li olgularda BNIP3 düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir.[11] Bu çalışmada da TUNEL boyama ile gösterilen artmış DNA parçalanması olan olgularda çalışılan apoptotik genlerden kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7, BIRC2, Bax genlerinin mRNA düzeyleri NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Anti-apoptotik Bcl-2A1 geninin mRNA düzeyi ise NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p<0.01$). Kaspaz-1, kaspaz-3, kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. NEK bir çeşit apoptotik mekanizmayı içermektedir. Bu mekanizmada kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7 nin etkisi belirgindir.. Yapılan literatür taramasında NEK'li yenidoğan intestinal dokularında apoptotik genlerden kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7, BIRC2 genlerini gösteren herhangibir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde apoptotik genlerden Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bax, Bad ve BNIP3 deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada gross olarak nekroz olmadan önce apoptozisin oluştuğunu göstermek amaçlı pan-kaspaz inhibitörü verilerek apoptozis inhibe edilmiş ve bunun sonucunda hem nekrozun hem de NEK'in gelişmediği gösterilmiştir.[7] Böylece apoptotik genlerden hangilerinin NEK'te arttığı, anti-apoptotik genlerden hangilerinin azaldığı gösterilerek, yenidoğan intestinal epitelindeki apopitoz mekanizmasının nasıl düzenlendiği daha iyi anlaşılabilir ve bu genler üzerinden apoptozisin moleküler düzeyde inhibisyonunu sağlayacak yöntemler bulunarak NEK'in oluşmaması ya da ilerlemesi önlenebilir.

SONUÇLAR

1. Nekrotizan enterokolitin başlamasında apoptozis temel basamaklardan birisidir.

2. Nekrotizan enterokolitli hastalarda apoptotik genlerden kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7, BIRC2, Bax genlerinin mRNA düzeyleri NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).

3. Nekrotizan enterokolitli hastalarda anti-apoptotik Bcl-2A1 geninin mRNA düzeyi ise NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulunmuşltur ($p<0.01$).

4. Kaspaz-1, kaspaz-3, kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde ise iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.01$).

5. NEK bir çeşit apoptotik mekanizmayı içermektedir. Bu mekanizma kaspaz 2, 6 ve 7 üzerinden gerçekleşmektedir. Klasik kaspaz 3 ve 9 üzerinden olduğuna dair bu çalışmada veri oluşmamıştır.

ÖZET

Çalışmanın Amacı: Nekrotizan enterokolit ile ilişkili apoptotik ve anti-apoptotik genleri ortaya koyarak NEK ile apoptozis arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamak.

Gereç ve Yöntem: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi AD'da ve Zekai Tahir Burak Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Cerrahisi kliniğinde 01.01.2010 tarihinden 01.01.2012 tarihine kadar NEK nedeniyle cerrahi işlem uygulanan 6 hastadan çıkarılan ince barsak segmentinden hastalıklı doku örneklerinden 1x0.5 cm boyutunda alındı. Kontrol amacı ile 01.01.2010 tarihinden 01.01.2012 tarihine kadar 6 rezeksiyon anastomoz yapılan intestinal atrezili bebeklerden çıkarılan intestinal segmentten veya herhangi bir nedenle ileostomi açılmış hastaların iyileştikten sonrası ileostomi kapatılması sırasında ostomi ağzından 1x0.5 cm boyutunda alınan normal (hastalıksız) doku örnekleri alındı. Alınan doku örneklerinin yarısı çalışmalar için sıvı nitrojen içinde -80 derecede ve diğer yarısı formol içinde muhafaza edildi. Hastadan alınan bir doku parçası da histopatolojik olarak NEK açısından değerlendirildi. Apoptozis histopatolojik olarak TUNEL yöntemi ile belirlendi. Apoptotik ve anti-apoptotik gen düzeyleri PCR Array yöntemi ile belirlendi.

Bulgular: Hematoksilen-Eozin ile yapılan histolojik incelemede kontrol grubunda dört hastada grade 1 doku hasarı varken, bir hastada grade 2, bir hastada grade 3 doku hasarı mevcuttu. NEK grubunda ise üç hastada grade 4 doku hasarı varken, iki hastada grade 3 ve bir hastada grade 2 doku hasarı mevcuttu. NEK'li grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında doku hasarının NEK'li bebeklerde belirgin olarak daha fazla olduğu izlenmiştir ($p<0.01$).

TUNEL yöntemiyle değerlendirilen örneklerde kontrol grubuna ait üç hastada skor 1 ile uyumlu TUNEL (+) nukleuslar izlenirken, iki hastada skor 2 ile uyumlu TUNEL (+) nukleus grupları görüldü. Bir hastada ise skor 3 TUNEL (+) hücre nükleusları

izlendi. NEK grubunda üç hasta skor 3 ile uyumlu TUNEL (+) nukleuslar izlenirken, diğer üç hastanın örneklerinde skor 4 TUNEL (+) nukleus gruplarının varlığı izlendi. NEK'li grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında apoptozisin NEK'li bebeklerde belirgin olarak daha fazla olduğu izlenmiştir ($p<0.01$).

RT Real Time PCR kullanılarak barsaklardaki apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonları değerlendirildi. Apoptotik genlerden kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7, BIRC2, Bax genlerinin mRNA düzeyleri NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Anti-apoptotik Bcl-2A1 geninin mRNA düzeyi ise NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p<0.01$). Kaspaz-1, kaspaz-3, kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde ise iki grup arasında istatistiksel olarak anamlı fark bulunamadı.

Sonuç: NEK patofizyolojisinde apoptozisin önemli rol oynadığı bilinmekte olup apoptotik genlerden Bax, kaspaz-2, kaspaz-6, kaspaz-7, BIRC2 genlerinin mRNA düzeyleri artmış olup, anti-apototik genlerden Bcl-2A1 geninin mRNA düzeyi azalmış ve kaspaz-1, kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Böylece apoptotik genlerden hangilerinin NEK'te arttığı, anti-apoptotik genlerden hangilerinin azaldığı gösterilerek daha sonraki çalışmalarda bu genler üzerinden apoptozisin moleküler düzeyde inhibisyonunu saylayacak yöntemler bulunarak NEK'in oluşmaması sağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Nekrotizan enterokolit, apoptozis, mukozal hasarlanma, apoptotik gen, anti-apoptotik gen

SUMMARY

Aim: The aim of this study is to better understand the relationship between necrotising enterocolitis (NEC) and apoptosis by measuring the expressions of apoptotic and anti-apoptotic genes.

Material and methods: Six neonates were undergone surgical treatment having a diagnosis of NEC between 01.01.2010 and 01.01.2012 in University of Ankara Department of Pediatric Surgery and Zekai Tahir Burak Research Hospital Department of Pediatric Surgery. Pathological intestinal segments were removed and tissue samples of 1cm were obtained. The control group consisted of 6 neonates who were undergone resection and anastomosis because of intestinal atresia and closure of stoma which was performed for any reason. 1cm tissue samples were obtained from normal (disease free) stoma tissue. The samples were kept in liquid nitrogen in -80˚C and formaldehyde. Apoptosis was histopathologically evaluated by using TUNEL procedure. Apoptotic and anti-apoptotic gene levels were evaluated by using PCR array.

Results: The histological examination with Hematoxylen-Eosin revealed grade 1 tissue damage in four patients, grade 2 in one patient and grade 3 in one patient in the control group, whereas in NEC group grade 4 tissue damage was present in three patients, grade 3 in two patients and grade 2 in one patient. Tissue damage was significantly more in NEC group when compared with control group ($p<0.01$). TUNEL examination revealed score 1 TUNEL (+) nuclei in three patients, score 2 in two patients and score 3 in one patient in the control group, whereas it revealed score 3 in three patients and score 4 in the remaining three patients in NEC group. Apoptosis was significantly more in NEC group when compared with control group ($p<0.01$).

.

The expression of apoptotic and anti-apoptotic genes in intestines had been estimated by using RT Real Time PCR. mRNA levels of Bax, CASP2, CASP6, CASP7, BIRC2 genes, which are the apoptotic genes were significantly increased in NEC group when compared to control group ($p<0.01$). Anti-apoptotic Bcl-2A1 mRNA levels were significantly decreased in NEC group when compared to control group ($p<0.01$) however there was no statistically significant difference in mRNA levels of CASP1, CASP3, CASP9 genes between two groups.

Conclusion: Apoptosis plays a significant role in the pathophysiology of NEC. The apoptotic Bax, CASP2, CASP6, CASP7, BIRC2 genes levels have increased and anti-apoptotic Bcl-2A1 gene levels have decreased and there are no significant difference in CASP1, CASP3 and CASP9 genes. Therefore, by providing information about which apoptotic genes increase and which anti-apoptotic genes decrease, NEC would be prevented by inhibiting apoptosis in the molecular level.

Keywords: Necrotizing enterocolitis, apoptosis, mucosal injury, apoptotic gene, anti-apoptotic gene

KAYNAKLAR

1. Troy A. Markel, Paul R. Crisostomo, George M. Wairiuko, Jeffrey Pitcher,Ben M. Tsai, and Daniel R. Meldrum. (2006). Cytokines In Necrotizing Enterocolitis. *Shock,* Vol.25, No. 4, pp. 329-337
2. Rose M. Viscardi, Nancy H. Lyon, Chen-Chih J. Sun, J. Richard Hebel, Jeffrey D. Hasday. (1997). Inflammatory Cytokine mRNAs in Surgical Spesmens of Necrotizing Enterocolitis and Normal Newborn Intestine. *Fetal and Pediatric Pathology*, 17:4, 547-559.
3. Kareena L Schnabl, John E Van Aerde, Alan BR Thomson, Michael T Clandinin. (2008). Necrotizing enterocolitis: A multfactorial diseae with no cure. *World J Gastroenterol*., 14;14(14): 2142-2161.
4. Cynthia D. Downard, Stephanie N. Grant, Paul J. Matheson, Alia W. Guillaume, Robert Debski, Mary E. Fallat, Richard N. Garrison. (2011). Altered intestinal microcirculation is the critical event in the development of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*, 46:1023–1028
5. Jessica A. Clark, Robert H. Lane, Nicole K. MacLennan, Hana Holubec, Katerina, Dvorakova, Melissa D. Halpern, Catherine S. Williams, Claire M. Payne and Bohuslav Dvorak. (2005). Epidermal growth factor reduced intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.,* 288:755-762.
6. Jang Hoon Lee. (2011). An update on necrotizing enterocolitis: pathogenesis and preventive strategies. *Korean J Pediatr,* 54(9):368-372
7. Tamas Jilling, Jıng Lu, Michele Jackson,and Michael S. Caplan. (2004). Intestinal Epithelial Apoptosis Initiates Gross Bowel Necrosis in an Experimental Rat Model of Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Pediatric Research,* Vol. 55, No. 4,622-9.
8. Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. (1997) The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg,* Feb;32(2):275-82
9. Michael S. Caplan,MD, and Tamas Jilling. (2001) The Pathophysiology of Necrotizing Enterocolitis. *Gastroenterology ,NeoReviews,* Vol. 2 No.5,103-109.
10. Claudia N. Emami, Nikunj Chokshi, Jin Wang, Catherine HunterYigit Guner, Kerstin Goth, Larry Wang, Anatoly Grishin, Henri R. Ford. (2012). Role of interleukin-10 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *The American Journal of Surgery*, 203: 428–435
11. Ruben Zamora, Yoram Vodovotz, Binnie Betten, Catarina Wong, Brian Zuckerbraun, Kevin F. Gibson and Henri R. Ford. (2005) Intestinal and hepatic expression of BNIP3 in necrotizing enterocolitis:regulation by nitric oxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289: 822-830.
12. Merih Çetinkaya, Nilgün Köksal. (2004). Nekrotizan Enterokolit. *Güncel Pediatri.,* 2 :146-151.
13. Resmiye ORAL. (1995) Nekrotizan Enterokolit. *T Klin Tıp Bilimleri*, 15: 219-224.
14. By Barbara Barlow, Thomas V. Santulli, et al. (1974). An Experimental Study of Acute Neonatal Enterocolitis-The Importance of Breast Milk, *Journal of Pediatric Surgery*, Vol. 9, No.5: 587-595.
15. Albanese CT, Rowe MI. (1998). Necrotizing enterocolitis. In: O'Neill JA, et al. (eds): *Pediatric Surgery*. 5th ed., St. Louis, Mosby-Year Book Inc.; 1297-320.

16. Martin J.Bell, Jessie L. Ternberg. (1978). Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Annals Of Surgery*, 187(1):1-7.
17. Jane S Lee, Richard A Polin. (2003). Treatment and prevention of necrotizing enteocolitis. *Seminars in Neonatology*, 8:449-59.
18. The Canadian Neonatal Network. (2004) Variations in Incidence of Necrotizing Enterocolitis in Canadian Neonatal Intensive Care Units. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 39:366-72.
19. Henry MC, Moss RL. (2004) Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol*, 28:221-33.
20. Maayan-Metzger A, Itzchak A, Mazkereth R, Kuint J. (2004) Necrotizing enterocolitis in full-term infants: case-control study and review of the literature. *J Perinatol*, 24:494-9
21. Hilal Özkan, Merih Çetinkaya,Nilgün Köksal, Evren Özboyacı, Ali Özboyacı, Şenay Yapıcı. (2010). Nekrotizan Enterokolitli Prematüre Bebeklerin Değerlendirilmesi. *Güncel Pediatri Dergisi*, 8: 56-62
22. Jessie A. Morgan, Lauren Young and William McGuire. (2011). Pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis. *Paediatric and Neonatal Infections*, 24:183–189
23. Aslan Y, Ayvaz A, Yıldıran A, Orhan F, Saruhan H, Peru H, Şen Y, Mutlu M. (2001). Nekrotizan enterokolit: 62 olgunun değerlendirilmesi. *Pediatrik Cerrahi Dergisi*, 15: 20-27.
24. Günşar C, Çün S, Etensel B, Ceylan H, Şencan A, Mir E. (2003). Nekrotizan enterokolit:35 olguda insidans, tanı kriterleri, risk faktörleri, tedavi ve m ortalite değerleri. *Ege Pediatri Bülteni*, 10 (1): 1-6.
25. Brian T. Bucher , Lucas A. McDuffie, Nurmohammad Shaikh , Phillip I. Tarr, Barbara B. Warner, Aaron Hamvas, Frances V. White, Christopher R. Erwin, Brad W. Warner. (2011). Bacterial DNA content in the intestinal wall from infants with necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*, 46, 1029–1033
26. Lanos AR, Moss ME, Pinzon MC, Dye T, Sinkin RA, Kendig JW. (2002). Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study. *Pediatr Perinat Epidemiol*, 16:342-9.
27. Rowe MI, Reblock KK, Kurkchubasche AG, Healey PJ. (1994) Necrotizing enterocolitis in the extremely low birth weight infant. *J Pediatr Surg*, 29:987-90.
28. Chan SY, Chan KL. (2001) Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Ann.Coll. Surg. H.K*, 5: 52–54.
29. Kazez A, Kucukaydin N, Kucukaydin M, Kontas O, Okur H, Dogan P. (1997). A model of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis: the role of distension. J Pediatr Surg, 32(10):1466-9.
30. Okur H, Kucukaydin M, Kose K, Kontas O, Dogam P, Kazez A. (1995). Hypoxiainduced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. J Pediatr Surg, 30(10):1416-9.
31. Powell RW, Dyess DL, Collins JN, Roberts WS, Tacchi EJ, Swafford AN Jr, Ferrara JJ, Ardell JL. (1999). Regional blood flow response to hypothermia in premature, newborn, and neonatal piglets. *J Pediatr Surg*, 34(1):193-8.
32. Josef Neu. (1996). Necrotizing enterocolitis:the search fora unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am.* 43(2):409-32.
33. Ledbetter DJ, Juul SE. (2000). Necrotizing enterocolitis and hematopoietic cytokines. *Clin Perinatol.* 27(3):697-716.
34. Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. (1983). Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin. *Am J Pathol*, 112:127-35.

35. Claud EC, Walker WA. (2001). Hypotehesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *Faseb J*, 15:1398-1403.
36. Hsueh W, Caplan MS, Tan X, Mackendrich W, Gonzales-Crussi Fl. (1998). Necrotizing enterocolitis of the newborn: pathogenetic concepts in perspective. *Pediatr Dev Pathol*, 1:2-16.
37. Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. (1999). Circulating pro and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*, 103:766-71.
38. Ng PC, Li K, Wong RP, Chui K, Wong K, Li G, Fok T F. (2003). Proinflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 88:209-13.
39. Updegrove K. (2004). Necrotizing enterocolitis: the evidence for use of human milk in prevention and treatment. *J Hum Lact*, 20:335-9.
40. Minekawa R, Takeda T, Sakata M, Hayashi M, Isobe A, Yamamoto T, Tasaka K, Murata Y. (2004). Human breast milk suppresses the transcriptional regulation of IL-1beta-induced NF-kappaB signaling in human intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287:1404-11.
41. Reber KM, Nankervis CA. (2004). Necrotizing enterocolitis: preventative strategies. *Clin Perinatol*, 3:157-67.
42. Lee JS, Polin RA. (2003). Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol*, 8:449-59.
43. Claud EC, Savidge T, Walker WA. (2003). Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res*, 53:419-25.
44. McGuire W, Anthony MY. (2003). Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 88:11-4.
45. Raghuveer TS, McGuire EM, Martin SM, Wagner BA, Rebouche CJ, Buettner GR, Widness JA. (2002). Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatr Res*, 52:964-72.
46. Carrion V, Egan EA. (1990). Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 11:317-23.
47. Ledbetter DJ, Juul SE. (2000). Necrotizing enterocolitis and hematopoietic cytokines: *Clin Perinatol*, 27(3):697-716.
48. Lloyd JR. (1969) The etiology of gastrointestinal perforations in the newborn. *J Pediatr Surg*, 4(1):77-84.
49. Reber KM, NankervisCA, NowickiPT.(2002). Newborn intestinal circulation. Physiology and pathophysiology. *Clin Perinatol*, 29(1):23-39.
50. Mehall JR, Kite CA, et al. (2002). Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. *J Pediatr Surg*, 37(8):1177-82.
51. Nermin Tansuğ. (2006). Nekrotizan Enterokolit ve Tedavisi. *Sağlıkta Birikim,* Cilt:1 3:22-31.
52. Christine F. Coursodon and Bohuslav Dvorak. (2012). Epidermal growth factor and necrotizing
53. Richard H. Siggers, David J. Hackam. (2011). The role of innate immune-stimulated epithelial apoptosis during gastrointestinal inflammatory diseases. *Cell. Mol. Life Sci*, 68:3623–3634
54. Başaklar AC.(2006). Yenidoğanlarda gastrointestinal kanama. Başaklar AC (editör): *Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları.* Palme Yayıncılık, 757-82.
55. Josef Neu, Walter Mihatsch. (2012). Recent Developments in Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(1):30-35

56. Merih Çetinkaya, Hilal Özkan, Nilgün Köksal, Okan Akacı, Taner Özgür. (2011). Comparison of the efficacy of serum amyloid A, C-reactive protein, and procalcitonin in the diagnosis and follow-up of necrotizing enterocolitis in premature infants. *Journal of Pediatric Surgery*, 46:1482–1489.
57. Morrison SC, Reid JR, Harrison M, Golz S. (2004). Systemic arterial pneumatosis in a neonate with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Radiol*, 34:337-9.
58. Pickworth FE, Franklin K. (1994). Case report: ultrasound diagnosis of unsuspected necrotizing enterocolitis. *Clin Radiol*, 49:649-51.
59. Barr LL. (1994). Sonography in the infant with acute abdominal symptoms. *Semin Ultrasound CT MR*, 15:275-89.
60. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T. (1978). Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg*, 187:1-7.
61. Foglia RP. (1995). Necrotizing enterocolitis. *Curr Probl Surg*, 32:757-823.
62. Henry MC, Lawrence Moss R. (2005). Surgical therapy for necrotizing enterocolitis: bringing evidence to the bedside. *Semin Pediatr Surg*, 14(3):181-90.
63. Pierro A, Hall N. (2003). Surgical treatments of infants with necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol*, 8:223-32.
64. Michel JL, Harper L, Alessandri JL, Jacquemot L, De Napoli-Cocci S, Pilorget H, Samperiz S. (2004). Peritoneal needle suction for intestinal perforation in the preterm neonate. Peritoneal needle suction for intestinal perforation in the preterm neonate. *Eur J Pediatr Surg*, 14:85-8.
65. Sharma R, Tepas JJ 3rd, Mollitt DL, Pieper P, Wludyka P. (2004). Surgical management of bowel perforations and outcome in very low-birth-weight infants (< or =1,200 g). *J Pediatr Surg*, 39:190-4.
66. Gollin G, Abarbanell A, Baerg JE. (2003). Peritoneal drainage as definitive management of intestinal perforation in extremely low-birth-weight infants. *Pediatr Surg*, 38:1814-7.
67. Demestre X, Ginovart G, Figueras-Aloy J, Porta R, Krauel X, Garcia-Alix A, Raspall F. (2002). Peritoneal drainage as primary management in necrotizing enterocolitis: a prospective study. *Pediatr Surg*, 37:1534-9.
68. Noble HG, Driessnack M. (2001). Bedside peritoneal drainage in very low birth weight infants. *Am J Surg*, 181:416-9.
69. Dimmit RA, Lawrance R. (2001). Clinical management of necrotizing enterocolitis. *American Academy of Pediatrics*, 2:110-7