

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİ OLUŞTURULAN**  
**YENİDOĞAN RATLARDA KAFEİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. SAVAŞ SALDIRAY**

**DANIŞMAN**  
**PROF. DR. ÖZMERT M.A. ÖZDEMİR**

**DENİZLİ – 2018**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİ OLUŞTURULAN**  
**YENİDOĞAN RATLARDA KAFEİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. SAVAŞ SALDIRAY**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. ÖZMERT M.A. ÖZDEMİR**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 02.08.2017 tarih ve 2017TPF011 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ – 2018**

Prof. Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR danışmanlığında Dr. Savaş SALDIRAY tarafından yapılan “Nekrotizan enterokolit modeli oluşturulan yenidoğan ratlarda kafeinin etkisi” başlıklı tez çalışması 25/06/2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. Hacer ERGİN

ÜYE: Prof. Dr. Hasan ÇETİN

ÜYE: Prof. Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 25.06.2018

Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ  
Prof. Dr. Dekan.....  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde klinik bilgi ve deneyimleriyle çalışmayı yönlendiren, uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile katkı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Dolunay GÜRSES ve değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Hacer ERGİN, Prof. Dr. Selçuk YÜKSEL, Doç. Dr. Bayram ÖZHAN, Doç. Dr. Yılmaz AY, Doç. Dr. Selda Ayça ALTINCIK, Yrd. Doç. Dr. Meltem POLAT, Yrd. Doç. Dr. Halil KOCAMAZ, Yrd. Doç. Dr. İlknur GİRİŞGEN, Yrd. Doç. Dr. Ebru Arık YILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Münevver YILMAZ'a,

Tez hazırlık aşamasında desteğini gördüğüm PAÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yaşar ENLİ, PAÜ Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. NİLAY ŞEN TÜRK'e,

Bu zorlu eğitim sürecinde dostluklarıyla yanımda olan birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, eğitim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım ve yan dal uzmanlarımıza,

Hayatımın her döneminde sevgi ve sabırlarıyla yanımda olan ve varlıklarından güç aldığım sevgili eşim Esra ve oğlum Ali Kerem başta olmak üzere aileme içtenlikle TEŞEKKÜR EDERİM.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ .....	X
ÖZET .....	XI
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
NEKROTİZAN ENTEROKOLİT.....	3
EPİDEMİYOLOJİ .....	3
PATOGENEZ .....	4
TANI .....	13
Klinik Bulgular.....	13
Laboratuvar Bulguları .....	15
Radyoloji.....	16
Tedavi.....	17
Cerrahi Tedavi .....	17
Komplikasyonlar .....	18
KAFEİN ve ETKİLERİ.....	19
GEREÇ VE YÖNTEM .....	23
Çalışma Grupları: .....	23
Hipoksi/Reoksijenizasyon Yöntemi ile NEK Modeli Oluşturma Metodu .....	23
Histopatolojik Değerlendirme.....	24
İmmunohistokimyasal Analiz .....	24
Biyokimyasal Değerlendirme .....	25
İstatistiksel Analizler .....	27
BULGULAR .....	28
TARTIŞMA .....	37
SONUÇLAR .....	46

**KAYNAKLAR..... 48**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>A</b>	: Adenozin
<b>BPD</b>	: Bronkopulmoner displazi
<b>CAP</b>	: <i>Caffein for apnea of prematurity</i>
<b>CRP</b>	: C-reaktif protein
<b>EGF</b>	: Epitelyal büyüme faktörü
<b>GİS</b>	: Gastrointestinal sistem
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen-Eosin
<b>H/R</b>	: Hipoksi/Reoksijenizasyon
<b>IgA</b>	: İmmunglobulin A
<b>IL-1</b>	: İnterlökin-1
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6
<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8
<b>IL-10</b>	: İnterlökin-10
<b>IL-11</b>	: İnterlökin-11
<b>IL-12</b>	: İnterlökin-12
<b>IL-18</b>	: İnterlökin-18
<b>İHK</b>	: İmmunohistokimyasal
<b>İP</b>	: İntraperitoneal
<b>İ-κB</b>	: İnhibitör kappa B
<b>MAMPs</b>	: <i>Microbial-associated molecular patterns</i>
<b>NEK</b>	: Nekrotizan enterokolit
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>OSİ</b>	: Oksidatif stres indeksi
<b>P</b>	: Pürin
<b>PAF</b>	: Platelet aktive edici faktör
<b>PDA</b>	: Patent duktus arteriozus
<b>PGE2</b>	: Prostaglandin E2
<b>PRRs</b>	: <i>Pattern recognition receptors</i>
<b>RDS</b>	: Respiratuar distres sendromu

<b>SİP</b>	: Spontan intestinal perforasyon
<b>SPSS</b>	: <i>Statistical package for the social sciences</i>
<b>TAS</b>	: Total antioksidan kapasite
<b>TLR2</b>	: <i>Toll-like</i> reseptör-2
<b>TLR4</b>	: <i>Toll-like</i> reseptör-4
<b>TLR9</b>	: <i>Toll-like</i> reseptör-9
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör-alfa
<b>TOS</b>	: Total oksidan kapasite



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Nekrotizan enterokolit gelişiminde rol oynadığı düşünülen etiyolojik faktörler	.5
Şekil 2 NEK’de prematüre bebeklerin duyarlılığı	.....6
Şekil 3 Hava geçirmez kapalı bir ortamda H/R yöntemi uygulanişı	.....24
Şekil 4 Hava geçirmez kapalı bir ortamda H/R yöntemi uygulanişı	.....24
Şekil 5 H/R modeli oluşturulan rat yavrusu bağırsaklarının makroskopik görünümü	...27
Şekil 6 H/R modeli oluşturulan rat yavrusu bağırsaklarının makroskopik görünümü	...27
Şekil 7 Kontrol grubu (Rat no: 8). Normal histoloji, grade 1 (H&E, X1/200)	.....30
Şekil 8 Kafein grubu (Rat no: 3). Yüzeyel epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, grade 2 (H&E, X1/200)	.....30
Şekil 9 H/R grubu (Rat no: 4). Hafif villus epitel hücre nekrozu, grade 3 (H&E, X1/200)	.....30
Şekil 10 Kafein+H/R grubu (Rat no: 1). Tam villus epitel hücre nekrozu, grade 4 (H&E, X1/200)	.....30
Şekil 11 Kontrol grubu (Rat no: 1). TLR ekspresyonu (X1/100)	.....32
Şekil 12 H/R grubu (Rat no: 8). TLR ekspresyonu ( X1/100)	.....32
Şekil 13 Kafein grubu (Rat no: 8). TLR ekspresyonu ( X1/100)	.....32
Şekil 14 Kafein+H/R (Rat no: 8). TLR ekspresyonu (X1/100)	.....32
Şekil 15 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak TNF- $\alpha$ düzeyleri	.....33
Şekil 16 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak IL-6 düzeyleri	.....33
Şekil 17 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak OSİ düzeyleri	.....34
Şekil 18 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak TOS düzeyleri	.....34
Şekil 19 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak TAS düzeyleri	.....35

## TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Tablo 1</b> Nekrotizan enterokolitte Modifiye Bell Evrelemesi .....	15
<b>Tablo 2</b> Gruplardaki rat yavrularının 1., 2. ve 3. gün vücut ağırlıkları (gr) ve dağılımı	28
<b>Tablo 3</b> Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak histopatolojik değerlendirme skorları .....	29
<b>Tablo 4</b> Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak immünohistokimyasal olarak TLR4 boyaması yoğunluğu, yüzdeleri ve final skor sonuçları .....	31
<b>Tablo 5</b> Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak TNF- $\alpha$ , IL-6, TOS, TAS, OSİ düzeyleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmesi .....	36

## ÖZET

### **Nekrotizan enterokolit modeli oluşturulan yenidoğan ratlarda kafeinin etkisi**

Dr. Savaş SALDIRAY

Kafein, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde gebelik yaşı 28 haftanın altında ve bronkopulmoner displazi riski taşıyan prematürelde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda kafeinin gastrointestinal sistemle ilgili olumsuz yan etkileri bildirilmeye başlanmıştır. Bu hayvan çalışmasında hipoksi-reoksijenizasyon (H/R) modeliyle intestinal hasar [nekrotizan enterokolit (NEK) modeli] oluşturulan ratlarda kafeinin intestinal hasara histopatolojik ve biyokimyasal etkileri araştırıldı.

Bir günlük 32 adet *Wistar*-albino cinsi ratlar randomize olarak: Kontrol (hiçbir işlem uygulanmayan), Kafein [Sadece intraperitoneal (ip) kafein verilen], H/R (ip salin + H/R uygulanan) ve Kafein+H/R (ip kafein + H/R uygulanan) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kafein ve Kafein+H/R gruplarına kafein ilk gün 20 mg/kg yükleme, üç gün 5 mg/kg, tek dozda ip idame uygulandı. Dördüncü gün, H/R ve Kafein+H/R grubundaki ratlar, hava geçirmez kapalı bir ortamda, önce 5 dk %100 CO<sub>2</sub>, hemen ardından 5 dk %100 O<sub>2</sub> solutularak H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturuldu. H/R'den en az 4 saat sonra tüm ratlar dekapite edildi. Histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal incelemeler için bağırsak doku örnekleri alındı. Bağırsak doku örneklerinde, biyokimyasal olarak tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6), total oksidan status (TOS), total antioksidan status (TAS) ve TOS/TAS oranı olarak oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri, immunohistokimyasal olarak *toll-like* reseptör-4 (TLR4) ve histopatolojik inceleme yapıldı.

Histopatolojik olarak en ağır hasarlanma sırasıyla Kafein+H/R ve H/R gruplarında görüldü. Kafein grubunda histopatolojik hasarlanma skorunun kontrol grubuna göre arttığı, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. TNF- $\alpha$ , IL-6 ve OSİ bağırsak doku düzeyleri kontrol grubuna göre diğer üç grupta belirgin yüksekti ( $p<0.05$ ). Bu parametreler, H/R ve Kafein+H/R gruplarında kafein grubuna göre de belirgin yüksekti ( $p<0.05$ ). Bağırsak doku TLR4 incelemesinde kontrol grubuna göre diğer üç grupta yükseklik görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Sonuç olarak, bu deneysel çalışmada kafeinin TNF- $\alpha$ , IL-6 ve OSİ bağırsak doku düzeylerini belirgin arttırdığı gösterilmiş olup, intestinal hasarlanmada bir rolünün olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kafein, intestinal hasar, rat.

## SUMMARY

### The effects of caffeine on newborn rats with hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury

Dr. Savaş SALDIRAY

Caffeine is widely used in neonatal intensive care units in premature infants with a gestational age below 28 weeks and at risk of bronchopulmonary dysplasia. Recently, the adverse effects of caffeine on the gastrointestinal system have begun to be reported. In this animal study, histopathological and biochemical effects of caffeine on intestinal injury were investigated in rats with intestinal damage induced by hypoxia-reoxygenation (H/R) model [necrotizing enterocolitis (NEC) model].

One day 32 Wistar-albino rats were randomly divided into 4 groups: Control (untreated and un-exposed to H/R), Caffeine [given intraperitoneal (ip) caffeine and un-exposed to H/R], H/R (given ip saline and exposed to H/R) and Caffeine+H/R (given ip caffeine and exposed to H/R). Caffeine and Caffeine+H/R groups were treated with caffeine, 20 mg/kg for loading dose on the first day and afterward 5 mg/kg per day ip administration on a single dose for 3 days. On the fourth day, the rats in the H/R and Caffeine+H/R groups were exposed to H/R procedure for NEC model in an airtight closed environment with 5 minutes 100% CO<sub>2</sub> followed by 5 minutes 100% O<sub>2</sub>. All rats were decapitated at least 4 hours after H/R procedure. Intestinal tissue samples were taken for histopathologic, immunohistochemically and biochemical examinations. In the intestinal tissue samples biochemically, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS) and oxidative stress index (OSI ) levels; immunohistochemically toll-like receptor-4 (TLR4) and histopathological examination were performed.

Histopathological, the most severe damage was seen in Caffeine+H/R and H/R groups, respectively. The histopathological damage score in the caffeine group was found to be higher than the control group, but it was not statistically significant. The intestinal tissue levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and OSI were significantly higher in the other three groups than the control group ( $p < 0.05$ ). These parameters were also significantly higher in the H/R and Caffeine+H/R groups compared to the caffeine group ( $p < 0.05$ ). While the intestinal tissue TLR4 was seen to be higher in the other three groups compared to the Control group, there was no statistically significance.

In conclusion, this experimental study showed that caffeine increased intestinal tissue levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and OSI significantly. So, it is thought that caffeine may play a role in intestinal injury.

**Keywords:** Caffeine, intestinal injury, rats.

## GİRİŞ

İlk olarak 1964 yılında tanımlanan nekrotizan enterokolit (NEK), bağırsakların kısmi veya tam iskemisi ile karakterize, tüm gastrointestinal sistemi (GİS) tutabilen sıklıkla prematürelere görülen acil bir GİS hastalığıdır. Günümüzde prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşama şanslarındaki artışa paralel olarak NEK görülme sıklığı da artmaktadır. Etiyopatogenezi net olmamakla birlikte multifaktöriyel olup, spesifik tedavi stratejilerinin net olmaması nedeniyle morbidite ve mortalitesi halen yüksek bir hastalıktır. NEK olan bebeklerin %90-95'i prematüre bebeklerdir. Term bebeklerde de asfiksi, umbilikal kateterizasyon, konjenital kalp hastalıkları gibi predispozan faktörler nedeniyle görülebilmektedir (1,2).

Patofizyolojisi net olarak belirlenemese de prematüre doğum, mikrobiyal çoğalma, enteral beslenme, immatür mukozal defans, bağırsak dolaşım instabilitesi, mukozal hasar ve mikrobiyal aşırı çoğalma önemli risk faktörleridir (3). Bakteriyel aşırı çoğalma term bebeklere göre prematüre bebeklerde farklıdır. Prematürelere enteral beslenmenin çeşitli sebeplerle gecikmesi sonucu intestinal flora geç oluşmakta ve daha çok patojenik olan gram negatif bakterilerden meydana gelmektedir (4). Gram negatif bakteriler lipopolisakkarit yapıları ile bağırsak duvarı epitel yüzeyinde bulunan *Toll-like* reseptör-4'e (TLR4) bağlanarak inflamatuvar sürece katkı sağlamaktadır. NEK çalışmalarında intestinal floranın gram negatif bakteri ağırlıklı oluşuyla TLR4 geni ve protein ekspresyonunun ince bağırsakta sağlıklı kontrol gruplara göre arttığı gösterilmiştir (5). İnflamatuvar bir hastalık olması nedeni ile artan sitokin ve oksidatif stres sonucu mukozal hasar artmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda tümör nekrosis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin de NEK'te arttığı gösterilmiştir (6). Oksidatif stresin, NEK patogenezinde önemli bir rol oynadığı, NEK şiddeti ile oksidatif stres arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmektedir (7).

Kafein ise non-spesifik adenosin reseptör antagonistidir (8). Prematüre apnesi tedavisinde kullanılan kafeinin, bronkopulmoner displazi (BPD) riskini, mekanik ventilatörde kalış süresini, reentübasyon sıklığını, prematüre retinopatisi şiddetini ve patent duktus arteriozus (PDA) tedavi ihtiyacını azalttığı ve nöroprotektif olduğu bildirilmektedir. Doğum ağırlığı 1250 gr, gebelik yaşı 28 haftanın altında doğan ve

BPD riskini taşıyan prematürelere, doğumdan sonraki ilk gün başlanarak 36. haftaya kadar rutin olarak kafein sitrat kullanımını önerilmektedir (9-11).

Adenozin reseptörleri  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  ve  $A_3$  olmak üzere dört tanedir.  $A_{2b}$  reseptörü ve mRNA ekspresyonu en fazla kolon, mesane, retina, endotel, düz kas hücresi ve fibroblastta bulunup, doku tamirinde görev alır. Ayrıca T hücre ve doğal killer hücre üzerinden antiinflamatuar etki göstererek ve endoplazmik retikulumda bulunan ryanodin reseptörlerine etki ederek, hücre içine kalsiyum salınımında ve dolayısıyla kontraksiyonda görev alır (12-14).

Prematüre apnesi tedavisinde rutin kullanılması önerilen adenozin reseptör antagonisti kafeinin pek çok olumlu etkileri yanında gastrointestinal sistemle, özellikle de NEK gelişimi ile ilgili yan etkileri bazı kaygılara neden olmuştur.

Her ne kadar 2015 (15) tarihli bir metaanalizde kafein ile NEK gelişimi arasında bir ilişki olmadığı bildirilse de hemen ardından aynı tarihli bir başka geniş kapsamlı çalışmada NEK ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (16).

Yapılan hayvan çalışmalarında kafeinin alt özefagus sfinkter tonusu ile gastrointestinal sistem motilitesini azalttığı, bu etkinin yaştan bağımsız ve ryanodin reseptörleri aracılığıyla olduğu belirtilmektedir (14). Prematüre bebeklerde kafein sitrat kullanımının, özellikle yükleme dozu sonrası süperiyor mezenterik arter kan akımını belirgin azalttığı bildirilmektedir (17).

Prematüre bebeklerde (<32 gestasyonel hafta veya <1250 gr) apne ve diğer potansiyel yararları için rutin kullanılması önerilen kafeinin, şu ana kadar NEK üzerine etkisini gösteren bir hayvan çalışmasına literatürde rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda hipoksi-reoksijenizasyon yöntemiyle NEK modeli oluşturulan yenidoğan rat yavrularında kafein sitratın NEK üzerine etkisinin araştırılması planlanmıştır.

## **GENEL BİLGİLER**

### **NEKROTİZAN ENTEROKOLİT**

Nekrotizan enterokolit tüm GİS'i tutabilen özellikle terminal ileum ve kolonun fokal ülserasyonu ve nekrozuyla karakterize sıklıkla prematürelde görülen önemli bir GİS hastalığıdır. Etiyopatogenezi multifaktöriyel olup, özellikle prematüre bebeklerin hastalığı olarak bilinse de asfiktik, polisitemik, kan değişimi uygulanan ve siyanotik konjenital kalp hastalığı sonucu bağırsak perfüzyonu bozulan term bebeklerde de görülebilmektedir (2).

### **EPİDEMİYOLOJİ**

NEK sıklığı coğrafi farklılıklar göstermekle birlikte, aynı bölgede yenidoğan yoğun bakım üniteleri arasında bile farklılık göstermektedir. Prematüre bebeklerde NEK sıklığı %2.6-28'dir (18). Prematürite nedeni ile yoğun bakım ünitelerine yatırılıp izlenenlerin %1-7.7'sinde NEK geliştiği ve tanı konularının %90'ının prematüre olduğu gösterilmiştir (18).

Yapılan bir çalışmada doğum ağırlığı 1500 gram altında olan prematüre bebeklerin %10'unda NEK geliştiği saptanmıştır (19). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise NEK sıklığını Erdem ve arkadaşları %6 (20), Gülcan ve arkadaşları %3 (21), Kavuncuoğlu ve arkadaşları (2013) ise %3.8 olarak rapor etmişlerdir (22). NEK prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hastalığı olarak bilinir. Obstetri ve yenidoğan yoğun bakım alanındaki teknolojik ilerlemeler ve yeni tedavi stratejileri çok küçük prematüre ve çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin sağ kalımını arttırmış, bu da NEK sıklığında artışa yol açmıştır (23). Prematürelde mortalite %20-30'dur (24). Term ve prematüre bebeklerde klinik ve patolojik bulgular benzer olsa da term bebeklerde, genellikle konjenital kalp hastakları, solunum sistemi hastalıkları ya da hipoksik durumlar gibi predispozan faktörler vardır (25). Çok merkezli 2001-2006 yıllarında yapılan bir çalışmada termlerin %0.5'inde evre 2 ve üzerinde NEK geliştiği bildirilmiştir (25).

NEK prematürelde jejunum ve ileumu tutarken, termlerde tipik olarak kolon tutulumu ile seyreder (26). Nekrotizan enterokolit ilk üç ay içerisinde gelişebilmekle birlikte en sık postnatal 3-10. günlerde görülmektedir. NEK term ya da sınırda term bebeklerde ilk haftada gelişirken, gestasyonel yaşı daha küçük olanlarda ise sıklıkla 7-14 gün ve sonrasında ortaya çıkmaktadır (26).

NEK’li vakaların çoğunun tedavisi medikal olsa da %20-40 oranında cerrahi tedavi gerekir (27). Cerrahi uygulananlarda mortalite oranı %50’ye kadar yükselmektedir. Doğum ağırlığı ve gestasyonel yaş azaldıkça mortalite oranı artmaktadır (28). Cerrahi tedavi gereksinimi olan hastaların %25’inde yara iyileşmesinin uzaması, anastomoz yeri ile ilgili sorunlar, intraabdominal apse ve bağırsaklarda adezyon gibi komplikasyonlar gelişebilmekle birlikte, bunlar arasında en önemli ve uzun dönem komplikasyonu “kısa bağırsak sendromu” dur (28).

NEK olan çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin uzun dönem takibinde nörogelişimsel ve fonksiyonel bozuklukların gelişme riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir (29).

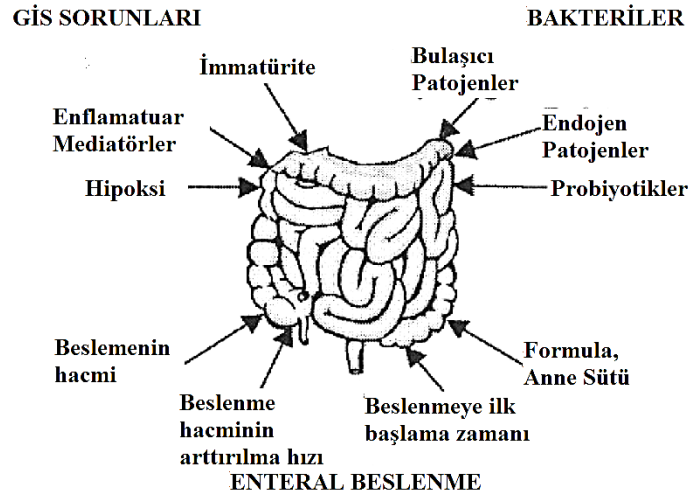
## **PATOGENEZ**

NEK’in patogenezi net bilinmemekle birlikte multifaktöriyel olup, mukozal hasarlanma ile başlamaktadır (2). NEK patogenezinde prematürite, bağırsakta aşırı bakteri çoğalması, hiperozmolar beslenme, mukozal defansın bozulması, bağırsak dolaşımının instabilitesi ve bağırsak mukoza hasarı sorumlu tutulmakla birlikte proinflamatuvar sitokin salınımı ile oluşan bağırsak inflamasyonu oldukça önemlidir (2). NEK’li hastaların %90’ı prematüre bebekler olsa da %10’u term bebeklerdir. Term bebeklerde NEK gelişmesinin doğum afiksisi, polisitemi, kan değişimi, intrauterin gelişme geriliği veya siyanotik konjenital kalp hastalığı gibi bağırsak perfüzyonunu olumsuz etkileyen durumlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Term bebeklerde NEK kliniği sıklıkla prematürelere farklı olarak ilk günlerde ortaya çıkmaktadır (19). Ayrıca pretermelerde en sık tutulum yeri jejunum ve ileum olarak bildirilirken, termelerde ise en sık kolonun etkilendiği ileri sürülmektedir (26). İleoçekal bölgenin sık etkilenmesinin nedeni proksimal bağırsağın dolaşımını sağlayan süperiyor mezenterik arterin ileokolik dallarının bu bölgeye olan uzaklığına bağlanmıştır (30).

Hipoksi ve hipotansiyon durumlarında, kanın kalp ve beyin gibi hayati organlara yönlendirilmesi “dalış refleksi” olarak adlandırılır. NEK patogenezinde sorumlu olabileceği düşünülen bu durumun, hayvanlarda birçok deneysel çalışmayla rolü olduğu gösterilmesine rağmen, bilgiler yeterli değildir (30). Hipoksi veya enfeksiyona sekonder oluşan hasarın NEK oluşumunu başlatıp, bağırsakların



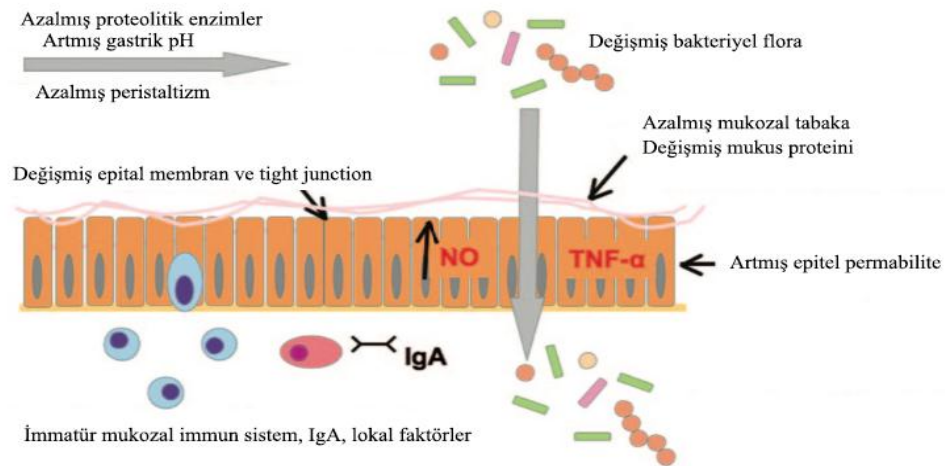
mikroorganizmalar ile kolonizasyonundan sonra bakterilerin hasarlı mukozaya yapışarak bir inflamatuvar reaksiyon oluşturduğu düşünülmektedir. Savunma sistemlerinin yetersiz, mukoza hücrelerinin geçirgenliğinin artmış olması nedeniyle de bakteriyel translokasyonun kolay olduğu ve inflamasyonun ilerlediği düşünülmektedir. Bölgeye gelen nötrofiller, ikincil haberciler ve salınan serbest oksijen radikalleri hasarı daha da artırırlar, sonuçta bağırsağın kısmi veya tam nekrozu ve perforasyonuna kadar giden klinik durumlar görülebilmektedir (Şekil 1, 31).



**Şekil 1.** Nekrotizan enterokolit gelişiminde rol oynadığı düşünülen etiyolojik faktörler (32).

**1. Prematürite:** NEK gelişen bebeklerin büyük çoğunluğunu prematüre bebekler oluşturur. Sindirim sistemi immatür olan bu bebeklerde gestasyonel hafta ve doğum ağırlığı azaldıkça NEK gelişme riski artmaktadır. NEK gelişme riski gestasyonel yaş 35-36 hafta olana kadar yüksek kalır. Gebelik yaşı 28 haftadan daha küçük bebeklerde, NEK riski diğerlerine göre daha sık ve geç dönemde görülmektedir. NEK gelişmesinde gestasyonel yaşı doğum ağırlığına kıyasla daha önemli olduğunu savunan görüşler de mevcuttur. Gestasyonel yaşı 30-32 hafta ve altında olanlarda bu risk en fazla iken, 35-36 haftayı geçenlerde NEK sıklığında önemli bir azalma olduğu rapor edilmiştir (31). Bu da işlevsel ve yapısal olarak bağırsağın matürasyonunun NEK gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir.

Lümen içindeki patojenlerin atılmasında çok önemli olan bağırsak hareketleri, termlere göre prematüre bebeklerde tam gelişmemiştir. Çalışmalarda ikinci trimesterde gelişmeye başlayan GİS motilitesinin, ancak üçüncü trimesterde olgunlaşabildiği gösterilmiştir (33). Bağırsak peristaltizminin gelişiminde, fetal hipoksi ya da perinatal asfiksünün peristaltizmi azalttığı, enteral beslenmenin ise artırdığı gösterilmiştir. Motilin ve pankreatik polipeptidler prokinetik faktörlerdir. Enteral beslenmeyle motilin düzeyinin önemli derecede arttığı ve prematüre bebeklerde ilk günlerden itibaren az da olsa enteral beslemeyle NEK riskinin azaldığı bildirilmiştir (23). Özellikle prematürelere sık görülen apne gibi sorunlar, zaten azalmış olan peristaltizmi daha da azaltıp, stazı arttıracığından daha çok bakteri üremesi ve dolayısıyla bakteriyel translokasyonuna neden olmaktadır. Bu da NEK gelişimine katkı sağlamaktadır (Şekil 2) (34).



**Şekil 2.** NEK'de prematüre bebeklerin duyarlılığı (34).

Yapılan hayvan çalışmalarında immatür sindirim sisteminin hipoksiye cevabı uzamış vazokonstüksiyon olarak bildirilmektedir. Prematürelere sıklıkla hipotansiyon ve tromboz olması, bağırsak kan akımını azaltıp mukozanın hasar görme olasılığını arttırmaktadır (35). Uygulanan göbek arter kateterizasyonunun damar çapını azalttığı, arteriyel spazm veya mikroemboli riskini arttırdığı ve böylece mezenter kan akımını azaltarak intestinal iskemiye yol açabildiği bunun da yine NEK riskini arttırdığı belirtilmektedir (36).

Prematürelere gastrik asit miktarı ve mukus üretimi de azdır. Gastrik asidite ve GİS peristaltizminin azalması bakteri yükünü arttırmakta, azalmış mukus tabakası

nedeniyle bağırsak epiteline geçiş daha kolay olmaktadır (4). Prematürelerin immünitesi de immatürdür. Antibakteriyel ürünler (salgısal immunglobulin A ve defensin), mukozal enzimler (pepsin, proteaz), laktoferrin gibi koruyucu diğer faktörler prematürelerde daha düşüktür (37).

Bağırsak epitelinin, yapısal ya da biyokimyasal içeriklerinin yeterince olgunlaşmaması nedeniyle, mikroorganizmalar daha derin dokulara invaze olarak enfeksiyona yol açmaktadır. Bağırsak epitelindeki sıkı bağlantı kompleksleri 10. gebelik haftasında oluşmaya başlamaktadır (38). Zamanla bağırsak epitelinin küçük iyonlara karşı seçici geçirgenlik özelliği artmakta, besinlerin emilimi başlamakta ve sıvı geçişi çift yönlü hal almaktadır. Seçici geçirgenlik özelliği kazanan enterositler, patojenlerin ve toksinlerin uzaklaştırılmasında  $Cl^-$  iyonunu ve suyu kullanmaktadırlar. Enterositlerin bu işlevi 26. gebelik haftasında başlamakta ve doğuma kadar olgunlaşma devam etmektedir (39). Özelleşmiş enterositler olan goblet hücrelerinden salgılanan müsin, bağırsak mukozasını kaplayarak; mikroorganizmaların epitele bağlanmasını, adhesyonu ve agregasyonunu engellemekte ve mikroorganizmaların temizlenmesinde rol oynamaktadır. Müsin gen ekspresyonununun 23-27. gebelik haftaları arasında başladığı bilinmektedir (40).

İnce bağırsak kripleri tabanında yerleşen Paneth hücreleri, özelleşmiş sekretuar enterositler olup, lizozim, fosfolipaz  $A_2$  ve antimikrobiyal peptidler salgılayarak bakteriyel flora üzerinde etki göstermektedir. Enterositler tarafından üretilen, “Defensin” ve “Kathelisin” adlı iki ana antimikrobiyal peptid bulunmaktadır (41). Enterositler genelde “ $\beta$ -defensin” salgılamakta, Paneth hücreleri “ $\alpha$ -defensin” salgılamaktadır. Antimikrobiyal peptidler bakteri, virüs, fungus, protozoa ve spiroketlere karşı etkilidir (42). Antimikrobiyal peptidlerin,  $Cl^-$  iyon sekresyonuyla birlikte istenmeyen patojen ve toksinlerin lümeninden atılmasında rol oynadığı ve proinflatuar yeteneklerinin olduğu bildirilmiştir (43). Paneth hücre sayısı ve  $\alpha$ -defensin ekspresyonu, prematürelerde erişkinlere göre daha düşük saptanmıştır (44).

Prostaglandinlerin, bağırsak epiteli sıkı bağlantılarında parasellüler direnci artırdığını ve bariyerin yeniden yapılandırılmasında rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu özellik sayesinde, bir prostaglandin inhibitörü olan

indometazin kullanımına bağılı spontan bağırsak perforasyonları kısmen açıklanabilmiştir (45).

Bağırsakların bariyer, sindirim ve anjiogenez genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde kommensal mikroorganizmalar ile etkileşim içinde olduğu bilinmektedir. Kommensal mikroorganizmalar inflamatuvar yolakları inhibe edebilir ve homeostazın devamlılığında rol oynayabilir (46). Kommensal bakterilerin, bağırsak epitelinde nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyal yolağının inhibisyonu ile iltihap önleyici bir etkisi olduğunu gösteren invitro çalışmalar mevcuttur (47). NF-κB yolağında patojenik bakteri uyarısını “microbial-associated molecular patterns” (MAMPs)’lardan alan “pattern recognition receptors”(PRRs)’ler, bu sinyalin iletimini sağlamaktadır. Sinyali aldıktan sonra NF-κB, inhibitöründen (İ-κB) ayrılır ve sitoplazmadan çekirdek içine girer. Proinflamatuvar ve antiapoptotik genlerin transkripsiyonunu indükler. Yenidoğanların bağırsağındaki MAMPs’lar, ancak doğumla birlikte normal flora yerleşmeye başladıkça gelişmektedir. İntrauterin dönemde NEK gelişmemesi, özellikle anormal bakteriyel kolonizasyonun NEK patogeneğinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Rat modelinde, stres kaynaklı “platelet aktive edici faktör” (PAF) üretimine cevaben oluşan TLR4 diye adlandırılan bir PRRs’in ekspresyonunda yeniden düzenlenme olduğu gösterilmiş ve deneysel modelde NEK gelişiminden, bu yeniden düzenlenmenin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (48).

**2. Term infantlar:** Termlerde NEK genellikle konjenital kalp hastalığı, perinatal asfiksi, polisitemi, sepsis ve solunum hastalıkları gibi altta yatan bir hastalığa veya predispozan nedenlere bağılıdır (2,25).

**3. Bakteriyel kolonizasyon:** İntrauterin dönemde NEK gelişmemesi nedeni ile patogeneğinde temel rol oynadığı düşünülmektedir. Doğumla birlikte annenin rektovajinal florasında bulunan bağırsakta hızlıca kolonize olan kommensal bakteriler, postnatal matürasyon ve bağırsak fonksiyonunu (mukozal bariyer, sindirim, anjiogenezis, IgA üretimi) içeren genlerin ekspresyonunu düzenleyen toll-like reseptörleri ile aynı ortamdadırlar ve patojen bakterilere karşı koruyucudurlar (23,34,49). Patojen mikroorganizmalar, bağırsak hücrelerindeki proinflamatuvar ve proapoptotik yanıtları (NF-κB yolu gibi sinyal yolağı) uyarırlar (50). Prenatal ve postnatal bağırsak gelişiminde bu mikroorganizmaların rollerine bakıldığında,

bağırsak nonkommensal bakterilerin aşırı çoğalması ve özellikle de koagülaz negatif stafilokokların NEK ile ilişkili olduğu görülmektedir (51). Patogen bakterilerin çoğalması, mukozayı hasarlandırıp bağırsak maturasyonunu etkiler, inflamasyon ve apoptozisin artmasına neden olur. NEK'li vakaların çoğunda enfeksiyöz mikroorganizmalar, hastalığın ilerlemesinde sekonder rol oynarlar (34).

NEK gelişmiş hastaların feçes, kan ve periton sıvısından *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, Koagülaz negatif stafilokok gibi birçok bakteri izole edilmiştir (52). Diğer izole edilen mikroorganizmalar streptokok ve laktobasillustur. Formüla ile beslenenlerde ise enterokok, koliform bakteriler ve klostridyum gibi anaerop mikroorganizmalar saptanmaktadır (53). NEK'ten korunmada probiyotik profilaksisinin etkili olduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Caplan ve arkadaşları, oral yoldan probiyotik (*Bifidobacterium infantis* ve *Lactobacillus* gibi fakültatif anaerop bakterilerden oluşan) verdikleri yenidoğan farelerde NEK sıklığının azaldığını göstermişlerdir (54). Akisu ve arkadaşlarının deneysel çalışmasında, yavru farelere oral olarak probiyotik bir ajan olan *Saccharomyces boulardii* verilmiş, kontrol grubuna göre bu farelerde intestinal hasarın daha az olduğu ve hasarda önemli rolü olan PAF düzeylerinin daha düşük olduğu gösterilmiş, ancak halen uygun kombinasyon ve doz belli değildir (55).

Probiyotik kullanımı, invaziv bakteriler yerine kommensal bakterileri arttırdığı için önerilmektedir; bu da inflamatuvar yolağı inhibe eder ve böylece NEK riski azalır. Enteral probiyotik kullanımı prematürelere ağır NEK ( $\geq$  grade II) gelişimini ve mortaliteyi azaltmaktadır, ancak başlama zamanı, süresi ve uygun kullanımıyla ilgili veriler net değildir (56). Beş günden fazla kullanılan ampirik antibiyotik tedavisi, NEK riskini ve ölüm riskini artırmaktadır. Ampirik olarak başlanan antibiyoterapinin uzun süre kullanılması, gastrointestinal sistemin bakteriyel kolonizasyonunda değişikliğe neden olmaktadır (34,57).

**4. Primer enfeksiyon:** NEK patogeneğinde bakteriyel translokasyon ve invazyon önemli yer tutmaktadır. NEK hastalarının kültürlerinde üreyen bakteriler, distal gastrointestinal kanalda da bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* ve *Clostridium difficile*'dir (58). Sporadik NEK vakalarının bir kısmında diğer bakteriyel ajanlar, viral ve fungal patojenler de izole edilmektedir. NEK'li bebeklerin ve bu bebeklere bakan anne, hemşire ve

bakıcıların dışkılarında viral ajanlar izole edilmiştir. Bakteriyel ajanların neden olduğu hasar, inflamatuvar mediyatörlerin salınımını arttırabilir (59). Prospektif bir çalışmada 34 haftadan küçük 12 bebekten yaşamının ilk 2 haftası boyunca alınan gaita örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu ve jel elektroforez ile analiz edilmiş; *Clostridium perfringes* saptanan 12 bebeğin üçünde sonradan NEK gelişmiş, dokuzunda ise NEK gelişmemiştir (60).

**5. Beslenme:** İntrauterin dönemde bağırsakları steril olan prematürelerin doğumla vajinal kanaldan geçinceye kadar veya enteral beslenme başlayıncaya kadar bağırsakları steril kalır. Anne sütü, bağırsak matürasyonunu ve lokal koruyucu mekanizmaları arttırır. Aynı zamanda anne sütü, immunglobulinlerin ana kaynağıdır. Anne sütündeki lizozimler, prematürenin immünitesini olgunlaştırır (61). Anne sütü, epitelyal büyüme faktörü (EGF) gibi bağırsak matürasyonunda rol alan trofik faktörleri ve IL-10 gibi NEK gelişimine engel olan antiinflamatuvar sitokinleri de içerir (62). Anne sütünde kommensal probiyotik mikroorganizmalar fazla, gram negatif patojen bakteriler az miktarda bulunur (63). Prematüre bebeklerin büyük bir kısmı anne sütü yerine formüla ile beslenmekte ve bu nedenle yoğun bakım ünitesinin florasına maruz kalmaktadır. NEK'li 125 hastasının incelendiği çalışmada, *enterobacter* en sık izole edilen bakteri olup kür sağlananların %29'unda izole edilmiştir (64). Anne sütü ile beslenme arttıkça NEK sıklığı da azalır (65-66). NEK hiç enteral beslenmeyenlerde de görülmekle birlikte, hastalarının %90'nından fazlası enteral beslenen bebeklerdir (67). Enteral beslenmenin bağırsakta bakteriyel proliferasyona katkısı olabilir. Özellikle prematürelerde tam bir sindirim ve emilim olmadığından, sindirilmemiş ya da emilememiş besin ürünleri bakterilerce fermente edilerek oluşan ürünler mukozal hasara neden olabilmektedir (68). Yetersiz motilite nedeni ile transit zamanının artması, sindirilmemiş besinlerin hasarlandırıcı etkisini daha da arttırabilir. Hayvan çalışmalarında kazein, organik asitler ve düşük pH'ın, vazoaktif bileşenlerin infiltrasyonu ile mukozal hasara neden olduğu gösterilmiştir. NEK'in enteral beslenme ile ilişkisi bilinmesine rağmen bu kesin değildir; ancak beslenme ile ilişkili faktörler NEK gelişmesinde katkı sağlayabilmektedir.

Bunlar:

*-Beslenmenin artış hızı:* Yakın tarihli bir derlemede beslenmenin yavaş arttırılması ile NEK riskinin azalması arasında ilişki bulunmamıştır. Beslenmenin

yavaş arttırılması, total enteral beslenmeye geçişte gecikme ile ilişkili bulunmuştur (69).

*-Beslenmeye başlanma zamanı:* Enteral beslenmeye başlamada gecikme (4 günden sonra), azalmış NEK riski ile ilişkili bulunmamıştır, ancak total enteral beslenmeye ulaşma süresini uzattığı belirlenmiştir (70).

*-Minimal enteral beslenme veya trofik beslenme:* NEK insidansında artışa neden olmaz (71).

Anne sütündeki koruyucu faktörler PAF asetilhidrolaz, sekretuar IgA, sitokinler (IL-10, IL-11), EGF, nükleotidler, glutamin ve antioksidanlardır (vitamin E, karoten, glutatyon). Anne sütündeki bu yararlı faktörler, formüla ile karşılaştırıldığında anne sütü prematüre bebeklerde NEK riskini azaltmaktadır (72).

**6. İnflamasyon:** İskemi, enfeksiyon ve toksik durumlar ile inflamatuvar süreç oluşturularak mukozal hasara neden olabilmektedir (23). TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 gibi interlökinler, PAF gibi çözünebilen inflamatuvar sitokinler damar geçirgenliğini artırır ve inflamasyonu şekillendirir. NEK'li prematüre bebeklerde bu sitokinlerin değerleri yüksektir ve hastalığın şiddeti ile ilişkili olarak artarlar (6,23). TNF- $\alpha$  aktive olmuş makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücreler tarafından salgılanan ve TNF reseptörlerine bağlandıktan sonra birçok etkileri olan proinflamatuvar bir sitokindir. TNF- $\alpha$  apoptoz indüksiyonu, nötrofil aktivasyonu, endotel adezyon moleküllerinin ekspresyonu, ateş ve akut faz proteinlerinin, proinflamatuvar sitokinlerin, NO'nun, prostoglandin E2'nin (PGE2), matriks metalloproteazlarının, PAF'ın ve tromboksan A2'nin sentez ve salınımında rol almaktadır. Hayvan modellerindeki TNF- $\alpha$  infüzyonu ile ilgili ilk raporlar, yenidoğan NEK'ine benzer olan şok ve doku hasarının oluştuğunu göstermiştir. TNF- $\alpha$  düzeylerinin NEK'li yenidoğanlarda kontrollerle karşılaştırıldığında belirgin arttığı saptanmıştır. Erişkin sıçanlardaki bağırsak hasarının iskemi-reperfüzyon modelinde TNF- $\alpha$  üretimini baskılayan pentoksifilin, bağırsak nekrozunu azalttığı gösterilmiştir (73).

TLR4 ile indüklenen enflamasyon ve apoptozun NEK patogenezindeki kritik rolü düşünülerek, TLR4 inhibisyonu yapılan farelerde, NEK morbidite ve mortalitesinin anlamlı ölçüde azaldığının gösterilmesi, TLR4 inhibisyonunun NEK için potansiyel etkili bir tedavi yöntemi olarak düşünülebileceğini göstermiştir (74).

Umblikal korddan alınan kan örneklerinde, yüksek IL-6 düzeyleri, NEK ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ile ilişkilendirilmiştir. NEK tanılıların gaita ve plazmasında arttığı gösterilen IL-6, inflamasyonda iki görevi olması nedeni ile NEK hastalarında artmış morbidite ve mortalite ile ilişkili olmanın yanı sıra antiinflamatuvar medyatör gibi de davranabilmektedir (5). Benzer şekilde NEK hastalarının plazmasında IL-8 düzeyleri de kliniğin ağırlığı ile orantılı olarak artmıştır (73). Sitokinler, serbest oksijen radikallerini arttıran medikal tedaviler ve durumlar, NEK'in gelişmesine katkıda bulunabilirler (75). Antioksidan vitamin E ile tedavi edilen ve serum tokoferol düzeyi düşük olan bebeklerde NEK sıklığının çok daha az olması, serbest oksijen radikallerinin NEK patofizyolojisindeki önemini göstermektedir (76).

**7. Eritrosit transfüzyonu:** Postnatal ilk 7 günden sonra yapılan kan transfüzyonunun, artmış NEK riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (77). NEK'in oluşumunda transfüzyonunun rolü tam olarak açık olmasa da NEK için tehlike oluşturabileceği düşünülmektedir (77,78). Geniş kapsamlı bir derlemede transfüzyon ile NEK arasındaki ilişki net olarak açıklanmasa da geçici bir ilişkinin olduğu, NEK gelişenlerin daha prematüre, daha düşük doğum ağırlıklı, PDA'lı ve daha uzun süre mekanik ventilatör desteği alanlarda daha geç dönemde görüldüğü ve mortalitenin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (79).

Kanada'da NEK olan 927 prematüre bebek ve NEK olmayan 2781 bebeği içeren geniş vaka-kontrollü çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NEK tanısı alanların iki gün öncesine kadar daha fazla kan transfüzyonu yapıldığı saptanmıştır. Ancak transfüzyon ile ilişkili NEK'li olguların doğum ağırlığı, doğum haftası daha düşük ve hastalıkları daha ciddi bulunmuştur (80).

*NEK ile kan transfüzyonu ilişkisinin fizyopatolojisi:* Kan transfüzyonu ile ilişkili akut akciğer hasarlanmasına benzer şekilde bağırsakta immünolojik bir hasar olabileceği bildirilmektedir. Transfüzyon sonrası tromboz ve vazokonstrüksiyondan dolayı kan dolaşımında bozulma olabilmekte ve bu da bağırsak hasarına neden olabilmektedir. Bazı çalışmalarda ise NEK'li hastalarda ağır anemi olduğu ve bu bebeklerin klinik olarak stabil olmadığı yani hipoksik olduğu, oksijen sunumunu arttırması nedeniyle bağırsak hasarına neden olabileceği yönündedir. Transfüzyon



gerektirecek anemi de oksijen sunumunu bozması nedeniyle bağırsak hasarına neden olur. NEK ve kan transfüzyonu arasındaki ilişki için prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır (81).

**8. Medikal tedaviler:** Hiperosmolar medikasyon veya mamalar direkt olarak bağırsak mukoza hasarına neden olup, NEK gelişimine katkı sağlayabilir (82). Teofilin, multivitamin, fenobarbital gibi oral uygulamalar, hipertonic olup bağırsak mukozasını irrite edebilir. Hiperosmolar kontrast madde uygulamaları, mukozal hasara neden olabilmektedir. Bağırsaklara sıvı geçişine, bağırsak distansiyonuna ve bağırsakta iskemiye neden olarak mukoza hasarına neden olabilmektedir. Doğumdan sonraki ilk bir hafta içinde hiperosmolar uygulamalardan kaçınılmalıdır.

Simetidin, ranitidin, famotidin gibi histamin-2 reseptör antagonistleri, NEK açısından yüksek risklidir (83). 1998-2001 yılları arasında yapılan ve 11072 yenidoğanın alındığı çalışmada NEK sıklığı 7,1 kat fazla bulunmuştur. NEK olan bebeklerin daha fazla histamin-2 reseptör antagonisti aldığı saptanmıştır. Mide asiditesi, NEK'i başlatan bakterilerin proliferasyon ve gelişimini azaltabilmektedir. Bu çalışmada NEK sıklığındaki artış, histamin-2 reseptör antagonistine bağlı ile mide asiditesinin azalması ile açıklanmıştır (84). Caffein for Apnea of Prematurity (CAP) çalışmasından sonra rutin kullanımı ve sıklığı artan kafein sitrat için 2015 meta-analizinde NEK'le ilişkisi yok denilse de hemen ardından yapılan çalışmalarda kafein ile NEK arasında bir ilişki olabileceği belirtilmektedir (15-17,85).

## **TANI**

### **Klinik Bulgular**

Nekrotizan enterokolitin belirti ve bulguları patognomik olmayıp, tanı klinik olarak konulmaktadır. NEK hematokezya, kusma, gastrik rezidü artışı, abdominal distansiyon, hipotoni, apne, bradikardi, nötropeni, trombositopeni, metabolik asidoz, taşikardi, abdominal hassasiyet, batın cilt renginde değişiklik, solunum yetmezliği gibi çeşitli belirtiler ve bulgularla ortaya çıkabilir. Gaitada gizli kan ise nazogastrik tüp ile beslenen preterm yenidoğanlarda yanlış pozitif (%60-75) sonuçlanabilmesi nedeniyle önem arz eden bir bulgu değildir. Beslenme intoleransı, preterm yenidoğan popülasyonunda sıklıkla görülmekle birlikte, çalışmalar intoleransın bağırsak hasarının gelişimi için güvenilir bir belirteç olmadığını ortaya koymaktadır (2).

NEK'te gastrointestinal bulgular yanında sistemik bulgular da görülür. Başlangıcı sinsi veya çok gürültülü olabilir. Erken bulgular tüm prematüre bebeklerde görülebilecek ısı düzensizliği, beslenme intoleransı, karın distansiyonu ve/veya hassasiyeti, yavaşlamış bağırsak hareketleri, apne, letarji ya da hipotansiyon gibi spesifik olmayan bulgular olabilir (86).

NEK'in en erken belirtisi beslenme intoleransı ve gastrik retansiyon gelişmesidir. NEK semptomlarının başlangıcı gestasyonel yaşa bağlıdır. Hastaların %25'inde semptomlar postnatal 30 gün sonra başlar. Gebelik yaşı 26 haftadan küçük prematüre bebeklerde semptomların başlangıç yaşı ortalama 23 gün; 31 haftadan büyük prematüre bebeklerde semptomların başlangıç yaşı ise ortalama 11 gündür (87).

NEK'in klinik bulguları spesifik değildir. NEK, sepsis, ileus, intestinal perforasyon, tıkanmış mekonyum sendromu, enterokolit ile seyreden Hirschprung hastalığı, viral gastroenterit, volvulus, beslenme intoleransı, inek sütü protein alerjisi ve metabolik hastalıklardan ayırt edilmelidir (88). Herhangi bir nedenle intestinal perforasyon olanlar da NEK çalışmalarına alınmaktadır. Bu hastaların klinik bulgusu pnömoperitonyum olduğundan Evre 3 NEK'ten ayırt edilmesi zordur. Spontan intestinal perforasyon (SİP) denen bir tablo da aynı kliniği oluşturmakla birlikte NEK'ten farklı bir hastalıktır. NEK ile SİP ayırıcı tanısı histopatolojik incelemeyle yapılabilir. NEK'li bebeklerle karşılaştırıldığında SİP'li bebeklerin daha prematüre ve ilk günlerde indometazin, postnatal steroid veya her iki ilacın birlikte kullanılmış olduğu görülür. SİP'in ortaya çıkışı anidir, pnömotosis bulgusu olmaksızın pnömoperitonyum ilk radyolojik bulgu olabilir. SİP olan bebeklerin prognozu daha iyidir ve ameliyata giden NEK olgularına göre mortalite daha düşüktür (87,88).

Bell ve ark. 1978'de NEK kliniği için evreleme sistemi önermişler ve bu evreleme sistemi 1986 yılında Walsh ve Kleigman tarafından yeniden düzenlenmiştir (89). Bu sisteme göre yenidoğanlar Evre IA-IB (şüpheli), Evre IIA-IIB (kesin), Evre IIIA-IIIB (ilerlemiş) NEK olarak ayrılmışlardır (Tablo 1) (90).

Evre I, şüpheli NEK olup bulguları özgün değildir. Klinik olarak abdominal distansiyon, kusma, gastrik rezidü, apne, letarji ve gaitada gizli kan varlığı, radyolojik olarak ise normal grafi bulguları yanında bağırsak dilatasyonu ve hafif ileus saptanabilir. Evre II, kesin NEK'dir, evre I'e ek olarak abdominal hassasiyet,

metabolik asidoz, trombositopeni saptanırken, radyolojik olarak pnömotosis intestinalis ve/veya portal vende gaz saptanabilir. Evre III, ağır NEK’te evre II’ye ek olarak hipotansiyon, belirgin asidoz, nötropeni ve dissemine intravasküler koagülasyon görülür. Radyolojik olarak ise evre II’ye ek olarak bağırsak perforasyonu gelişirse pnömoperitoneum saptanabilir (2,89,90).

**Tablo 1:** Nekrotizan enterokolitte Modifiye Bell Evrelemesi (90).

<b>Evre</b>	<b>Klinik Bulgular</b>	<b>Radyolojik Bulgular</b>
<b>I (Şüpheli NEK)</b>	Abdominal distansiyon Gaitada gizli kan + Kusma/Gastrik rezidü Apne/letarji	İleus/dilatasyon
<b>II (Kesin NEK)</b>	Evre I’e ek olarak Abdominal hassasiyet Metabolik asidoz Trombositopeni	Pnömotosis intestinalis ve/veya Portal vende gaz
<b>III (Ağır NEK)</b>	Evre II’ye ek olarak Hipotansiyon Belirgin asidoz DİK Nötropeni	Evre II’ye ek olarak Pnömoperitoneum

NEK: Nekrotizan enterokolit, DİK: Dissemine intravasküler koagülasyon

### **Laboratuvar Bulguları**

NEK düşünülen bebeklerde yapılması gereken ilk laboratuvar tahlilleri hemogram, periferik yayma, C-reaktif protein (CRP), kan gazı, elektrolitler, ayakta direkt karın grafisidir. Kan tablosunda sıklıkla nötropeni, bazen lökositoz, trombositopeni, hiponatremi ve metabolik asidoz görülür. NEK’li olguların %37’sinde lökosit sayısı  $15000/\text{mm}^3$ ’ün altındadır. Bazı çalışmalarda lökopeni gelişen NEK’li hastalarda, gram negatif etkenlerin daha sık olduğu gösterilmiştir (91,92). Trombositopeni; NEK ya da bağırsaklardaki dolaşım bozukluğuyla ilgili olmaktan çok gram negatif etkenlere ve lipopolisakkarid, PAF, TNF- $\alpha$ , ve IL-6 gibi inflamasyona sekonder sitokinlere bağlıdır (93). Koagülasyon bozuklukları,

hipoglisemi, hiperglisemi, metabolik asidoz ve elektrolit bozuklukları da görülebilir. Metabolik asidoz sıklıkla şokun bir bulgusudur. Bazı hastalarda CRP düzeyinde artma görülür. Tekrarlayan apnelar ve karın distansiyonuna bağlı diyafragmanın yukarı doğru itilmesi sonucu hipoksi ve hiperkarbi gelişebilir (94).

NEK düşünülen bebeklerden kan, dışkı, idrar ve BOS kültürü alınmalıdır. Bebeklerin %35'inin kan kültüründe üreme olur (93). Dışkı kültüründeki mikroorganizma, kan veya periton sıvısı kültüründe üreyenle aynı olduğu zaman anlamlı kabul edilmelidir (94). En sık sorumlu etkenler *E. Coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, Koagülaz negatif stafilokok, *Clostridium spp*, *Pseudomonas aeroginoza* ve *Candida albicans*'tır (95,96).

### **Radyoloji**

Tamamda radyolojik bulgular güvenilir yöntemlerden olup izlemde ve tedaviyi belirlemede seri batın görüntülemelerinden yararlanır (97,98). Radyolojik olarak en fazla kullanılan ayakta düz batın ve sol lateral dekübitis grafileridir (88). NEK'in radyolojik bulguları genellikle hastalığa spesifik değildir ve görecelidir. Batın grafilerinde ileus, sabit dilate bağırsak ansı, lineer veya kistik "pnömatis intestinalis" (intramüral gaz), portal vande gaz, pnömoperitoneum ve intraperitoneal sıvı NEK ile ilişkili radyolojik bulgulardır. NEK'e spesifik olmayıp ancak şüphe duyulan bulgular, dilate bağırsak ansları, bağırsak duvarının kalınlaşması ve artmış peritoneal sıvıdır (3,98). NEK'i ayırt ettiren en önemli bulgu ve radyolojik gösterge "pnömatis intestinalis"tir. Pnömatis intestinalis bakteriyel fermentasyonda ortaya çıkan gaz yapısındaki yan ürünlerin intramüral birikimini gösteren tablodur. "Pnömatis intestinalis" geçicidir, klinik bulgulardan önce ortaya çıkabilir ve sıklıkla erken bulgudur. Pnömatis intestinalis NEK'e spesifik değildir, Hirschsprung hastalığının enterokoliti, pilor stenozu, şiddetli ishal, süt tıkaç sendromu ve karbonhidrat intoleransında görülebilir (97). Bakteriyel fermentasyonla ortaya çıkan gazın venöz sisteme açılması, intramural hava sayesinde portal venöz toplayıcı sistemin dağılımının ana hatlarının belirginleşmesi, radyolojik olarak karaciğer lojunda lineer dansiteler olarak açığa çıkar ve bu portal venöz hava olarak adlandırılır. Yapılan çalışmalarda portal vande gaz varlığının kötü prognoz göstergesi olduğu tespit edilmiştir (3,10). Pnömoperitoneum, periton boşluğunda serbest hava bulunmasıdır ve bağırsakların perforasyonunu gösterir. En iyi sol yan

karın grafileri ve sol lateral dekübitis grafilerinde görünür (10). Klinik ve radyolojik bulguların sonucunda hastanın cerrahi tedaviye gereksinimi olup olmadığına karar verilir. Pnömoeritonyum ve peritonit varlığı sıklıkla cerrahi tedavi gerektirir (99). Ultrasonografi ve manyetik rezonans görüntüleme, kullanılabilen diğer tanı yöntemleridir. Abdominal ultrasonografi hasta başında uygulanabilmesi, noninvazif olması nedeniyle tercih edilir. Abdominal ve portal hava, kitle ve asit varlığını değerlendirir (88).

## **TEDAVİ**

Nekrotizan enterokolitte tanının erken dönemde konulması ve tedavinin erken başlanması yaşam şansını etkileyen en önemli faktördür. Bu nedenle NEK'ten şüphelenilir şüphelenilmez enteral beslenme kesilmeli, nazogastrik dekompresyona başlanmalıdır. Sıvı resüsitasyonu vital bulguların stabilizasyonu ile muhtemel enterik patojenlere yönelik antibiyotikler başlanarak 7-10 gün devam edilmelidir (2). Tedavi süresi ile ilgili çelişkiler bulunmakla birlikte, portal vende havası bulunan hastaların bile radyolojik bulguları giderildikten sonra beslenmesi önerilmiştir (100). Kullanılan antibiyotik kombinasyonu, bir penisilin türevi, bir aminoglikozid ve anaerobik mikroorganizmalara karşı etkili bir preparattan oluşmalıdır. Bebeğin kalori gereksiniminin karşılanabilmesi için parenteral beslenmeye başlanmalıdır. Trombositopeni ve anemi NEK'in değişmez bulguları olduğundan trombosit ve eritrosit süspansiyonlarının transfüzyonuna sıklıkla gereksinim duyulur. Kan biyokimyası, koagülasyon testleri, kan gazı ve direkt karın grafileri hastanın durumuna göre sık aralıklarla tekrarlanmalıdır.

### **Cerrahi Tedavi**

Vakaların %30-50'sine cerrahi müdahale gerekmektedir. Ancak yaklaşım ve zamanlaması tartışmalıdır. NEK'te evrensel olarak kabul edilmiş kesin cerrahi endikasyon bağırsak perforasyonu olmakla birlikte, perfore olup pernöz dren ile tedavi edilen ağır prematüre hastaların, ölüm oranları ve kısa dönem bağırsak fonksiyonları laparotomi uygulananlarla benzer olduğu rapor edilmiştir (28,101). Bağırsak nekrozu ile gangren oluşumunu gösteren ve cerrahi girişim endikasyonu olarak değerlendirilen kriterler arasında 1) klinik bozulma 2) peritonit 3) karında eritem 4) karında kitle 5) portal vende gaz 6) pnömoeritonyum 7) direk grafide sabit

dilate bağırsak ansı 8) radyolojik olarak asit varlığı 9) şiddetli trombositopeni 10) pozitif parasentez 11) şiddetli pnömatozis intestinalis sayılabilmektedir (102,103).

### **Komplikasyonlar**

Cerrahi ya da medikal tedavi yapılan NEK'li hastalar uzun dönemdeki olası komplikasyonlar açısından dikkatle izlenmelidir. Doğrudan NEK'in kendisine veya cerrahi işleme bağlı komplikasyonlar görülebilir. Stoma stenozu, bağırsak striktürü, enterik fistüller, total parenteral nütrisyona bağlı kolestaz veya sepsis, intraabdominal apse, laparotomi ile ilgili sorunlar (apse, evantrasyon), kısa bağırsak sendromu ve pulmoner komplikasyon görülebilir. Uzun dönemde en sık bağırsak striktürü görülür. Bağırsaktaki iskemik nekroz alanlarının fibrozisle iyileşmesi sonucu oluşur. Görülme sıklığı %9-36 arasındadır (104). İlk NEK epizodundan ortalama 37 gün sonra bebeklerin %4-6'sında ikinci bir NEK atağı olabileceği rapor edilmiştir (105). Bu ataklar beslenmeye, tedavinin medikal veya cerrahi olmasına ve tutulan bağırsağın tipine bağlı değildir ve çoğu (%70) medikal tedaviye yanıt verir. Cerrahi geçiren NEK olgularının %23'ünde, geç dönem komplikasyonlarının en önemli ve en ağır olan kısa bağırsak sendromu görülebilmektedir.

## KAFEİN ve ETKİLERİ

Neonataloji pratiğinde sık kullanımı olması nedeni ile popüler araştırma konularından biri olan kafein besinlerle sık alınmaktadır. Birçok etkisi olan kafein doğal olarak pek çok bitkinin meyvesinde, tohumunda ve yaprağında bulunur. Bununla beraber en bilinen kaynakları çay yaprakları, kahve ve kakao çekirdekleri ile kola tohumlarıdır. Kafein tüketimine ilişkin ilk verilere milattan önce 2700'lü yıllarda rastlanmaktadır. Çinde yaprakları kaynatılarak içilen çay bu dönemde kullanılan kafein kaynağıdır. Ancak, kafeinin yaygın kullanıma girişi Etiyopya'lı bir çoban olan Kaldi'nin kahve bitkisini keşfetmesi ile olmuştur.

Medikal kullanımı olarak kafein özellikle prematüre apnesi ve preekstübasyon döneminde kullanılmaktadır. Prematüre apnesinde 40 yıldır kullanılmakla birlikte aktif maddesi kafein bazı olup, kafein sitrat ürünlerinin yarısı kafein bazıdır. İntravenöz ve oral alındıktan iki saat sonra kanda pik düzeye erişen kafeinin, asıl eliminasyonu çoğunlukla böbreklerden olmakla birlikte, karaciğerde de metabolize edilir. Bu nedenle kolestaz, karaciğer yetmezliği ve böbrek yetmezliğinde ilacın yarı ömrü uzar (106).

Nonspesifik adenozin antagonisti olan kafein, prematüre apnesinin tedavisinde kullanılmakta, ayrıca potansiyel yarar olarak BPD riskini, ventilatörde kalış süresini, reentübasyon ve kranial kanama sıklığını azalttığı bildirilmektedir. Doğum ağırlığı 1250 gr, gebelik yaşı 28 haftanın altında doğan ve BPD riski taşıyan prematürelere doğumdan sonraki ilk günde başlanarak, 36. haftaya kadar rutin kafein sitrat kullanımı önerilmektedir (9-11). Ksantinler solunum merkezini uyararak dakikadaki solunum sayısını, CO<sub>2</sub> sensivitesini ve diyafragmanın işlevliğini arttırlar, hipoksi ve periyodik solunum nedeni ile oluşan solunum depresyonunu azaltırlar (107).

Respiratuvar distres sendromu (RDS) yönetiminde Avrupa Konsensus Rehberi - 2016 güncellemesinde mekanik ventilatörden ayrılmanın kolaylaştırılması için kafein kullanımı güçlü kanıt düzeyi ile önerilmektedir. Non-invaziv solunum desteği alanlarda kafein kullanılması ise düşük kanıt düzeyi ile önerilmektedir. Mekanik ventilasyon destek tedavisi alan tüm <1250 gr doğum ağırlığı olan yenidoğan bebeklere erken kafein tedavisi düşünülmelidir (11).

Adenozin riboz ve adenin grubunun birleşiminden oluşur. Tüm hücrelerde bulunan adenozin, nükleik asitler ve enerji taşıyan moleküllerin bir bileşenidir. İki mekanizma ile dokulardan uzaklaştırılır: Pürinerjik sinir ucundan re-uptake ve enzimatik yıkımlardır. Yıkım hücre içinde adenozin kinaz, hücre içi ve dışında adenozin deaminaz ile olur (108). Adenozin seviyeleri iskemi, hipoksi ve inflamasyon ile artar. En önemli adenozin kaynağı hücre içinde devamlı kullanılan ATP ve siklik adenozin monofosfattır. Diğer önemli bir adenozin kaynağı S-adenozil homosisteindir. Adenozin reseptörleri P<sub>1</sub> pürin reseptörü ailesinden olup A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> ve A<sub>3</sub> olmak üzere dört adet reseptör tanımlanmıştır. A<sub>1</sub> ve A<sub>3</sub> reseptörlerle adenilat siklaz inhibisyonu yaparken, A<sub>2</sub> reseptörleri ise adenilat siklaz aktivasyonuna neden olur. A<sub>2b</sub> adenozin reseptörlerinin mRNA ekspresyonu en fazla başta kolon olmak üzere mesane, retina, endotel, düz kas hücresi ve fibroblastta bulunup doku tamirinde görev alır (12). T hücre ve natural killer hücre üzerinden antiinflamatuvar etkilidir (13). Ayrıca endoplazmik retikulumda bulunan ryanodin reseptörlerine etki ederek hücre içine kalsiyum salınımına ve dolayısıyla kontraksiyona neden olur (14).

Yapılan çalışmalarda kafeinin alt özefagus sfinkter tonusu ile gastrointestinal sistem motilitesini azalttığı gösterilmiştir. Kafein kaynaklı bu miyorelaksan etkinin yaştan bağımsız ve ryanodin reseptörleri aracılığıyla olduğu belirtilmektedir (14). A<sub>2b</sub> adenozin reseptörü endotelial ve düz kas hücreleri üzerinde bulunup vaskülarizasyon ve vazodilatasyondan sorumludur (109). Çalışmalarda kafeinin adenozin reseptör antagonisti etkisiyle gastrointestinal sistem kanlanmasını azalttığı belirtilmektedir (110). Yapılan başka bir deneysel çalışmada da özellikle süperiyor mezenterik arterde kan akımını azaltarak intestinal iskemiye yol açabildiği rapor edilmiştir (17).

Hipoksi-reoksijenizasyon modeliyle BPD oluşturulan fare çalışmasında, kafeinin alveolar hipoplazi, apoptozis ve inflamasyonu arttırıp tip 2 pnömosit sayısını da azalttığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada kafein kesilince pulmoner histolojik düzelmenin olduğu, kafein kullanımı ile A<sub>2b</sub> adenozin reseptör ekspresyonunun azaldığı ifade edilmektedir (8). Kafeinin antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada gebelere uygulanan kafeinin yenidoğan bebeklerin kord kanı monositlerinde TNF- $\alpha$ 'yı azalttığı gösterilmiştir (108).



Kafeinin terapötik plazma konsantrasyonu 8-20 µg/ml'dir. Terapötik etkiyi elde edebilmek için yapılan yükleme dozu 20-40 mg/kg, idame dozu ise 5 mg/kg'dır. Eğer 5 mg/kg dozunda yeterli yanıt alınamazsa, idame dozu 20 mg/kg'a kadar yükseltilebilir (111). Kafeinin yarı ömrü 100 saat olması nedeni ile günlük plazma konsantrasyonunda değişiklik olmaz. Dolayısı ile kan düzeyine bakmak gerekmez (112). Bebeğin ağırlığı değiştikçe doz da ayarlanmalıdır. Kafein kesildikten sonra apne olabileceğinden ilaç kesildikten sonra yarı ömrü kadar bir sürede apne açısından takip edilmelidir. Diğer yan etkileri nadir olmakla birlikte bunların arasında taşikardi, takipne, tremor, opistotonus, tonik-klonik konvülsiyonlar, kusma, beslenme intoleransı, gastrik boşalmada gecikme, hiperglisemi, hipokalemi ve sarılık gibi yan etkiler gözlenebilir. Bu tür yan etkiler ilaç dozu kanda 50-100 microgram/ml'i aştığında gözlenir (111).

Prematüre bebeklerde gebelik yaşı azaldıkça apne sıklığı artar. Prematüre apnesi 1000 gr'dan düşük doğan bebeklerin neredeyse tamamında gözlenir. Genellikle 36-40. gebelik haftasından sonra görülmez; ancak çok prematüre bebeklerde postkonsepsiyonel 43-44. haftaya dek semptomlar gözlenebilir. Kafeinin bir diğer kullanım alanı da preekstübasyon dönemidir. Preterm bebeklerde yapılan bir çalışmada, planlı ekstübasyondan 24 saat önce kafein sitratın 20 mg/kg'lık yüksek doz ve 5 mg/kg'lık düşük doz rejimleri incelenmiş ve yüksek doz rejiminin bebeklerde mortalite ve morbiditeyi etkilemeden ekstübasyon başarısızlığını azalttığı gösterilmiştir (113). Prematüre bebeklerde kullanılan kafein sitratın yüksek doz rejiminin (40 mg/kg/doz yükleme, 20 mg/kg/doz idame), düşük doz rejimine (20 mg/kg/doz yükleme, 10 mg/kg/doz idame) kıyasla preterm bebeklerde ekstübasyon başarısızlığında önemli azalma sağladığı ve bebeklerin daha az apne epizodlarına girdiği gösterilmiştir (111).

Kafeinin antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, prematüre apnesinde kullanılan kafeinin, yenidoğan rat akciğerinde TLR2, TLR4 ve TLR9 düzeylerine etkisi incelenmiş. Kafein alan grupta, TLR2 ve TLR4 düzeyleri azalırken, TLR9 düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (114). Deliktaş ve arkadaşlarının yaptığı yakın tarihli çalışmada yenidoğan rat astrosit kültüründe, kafeinin TLR4'ü azaltıp TLR9'u arttırdığı gösterilmiştir (115). Kafeinin yenidoğan

intestinal sistemdeki TLR düzeylerini gösteren bir çalışmaya ise literatürde rastlanılmamıştır.

Adenozin reseptör antagonisti olan kafeinin, adenozinin antiinflamatuvar ve prokinetik etkilerini engelleyerek, süperiyor mezenterik arter kan akımını azaltarak intestinal hasara neden olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak prematüre bebeklerde apne tedavisi için rutin kullanılması önerilen kafeinin, şu ana kadar NEK üzerine etkisini gösteren bir hayvan çalışmasına literatürde rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda hipoksi-reoksijenizasyon (H/R) yöntemiyle NEK modeli oluşturulan yenidoğan ratlarda kafein sitratın intestinal hasarlanmada histopatolojik ve biyokimyasal etkilerini incelemek istedik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminde yapıldı, Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu [07/06/2017 tarih ve 2017/07 sayılı toplantı] tarafından onaylandı ve üniversitemiz Bilimsel Araştırmalar Projesi Birimi (02/08/2017 tarih ve 2017/12 sayılı toplantı) tarafınca desteklendi. Bir günlük *Wistar*-albino rat yavrusu insanda 22-24. gebelik haftasına, üç günlük olduğunda ise 28-32. gebelik haftasına denk geldiğinden, bir günlük ve ağırlıkları 6-8 gr olan rat yavruları kullanıldı (116). Toplam 32 adet olan bir günlük rat yavruları randomize olarak her bir grupta 8 rat olacak şekilde toplam dört gruba ayrıldı. Her bir grup parmaklıklı kafeslerde annelerinin yanına yerleştirildi. Oda sıcaklığı 23-24°C'de tutularak hayvanların normotermik olmaları sağlandı. Tüm rat yavruları annelerini emerek beslenirken, anne ratlar %21 protein içeren standart fare yemi olan Pellet yem ile beslendi.

### **Çalışma Grupları:**

*Kontrol grubu (Grup I, n:8):* Herhangi bir girişim veya ilaç uygulanmadı.

*Kafein grubu (Grup II, n:8):* İlk 3 günde intraperitoneal (İP) olarak 20 mg/kg doz ile yüklemenin 24 saat ardından 5 mg/kg/gün doz ile kafein sitrat (Peyona 20 mg/ml flakon, Chiesi, İstanbul) uygulandı. Ek bir işlem uygulanmadı.

*H/R (Hipoksi/Reoksijenizasyon) grubu (Grup III, n:8):* Kafein rejimine uygun şekilde aynı hacimde İP salın verildi. Doğum sonrası dördüncü günde H/R yöntemi ile NEK modeli oluşturuldu (117).

*Kafein + H/R grubu (Grup IV, n:8):* İlk 3 günde İP olarak 20 mg/kg doz ile yüklemenin 24 saat ardından 5 mg/kg/gün doz ile kafein sitrat uygulandı ve dördüncü günde H/R yöntemi ile NEK modeli oluşturuldu.

### **Hipoksi/Reoksijenizasyon Yöntemi ile NEK Modeli Oluşturma Metodu**

Doğumdan sonra ilk üç gün annelerinin yanında anne sütü ile beslenen ve yukarıda tanımlanan ilaçların uygulandığı rat yavruları, dördüncü günde hava geçirmez kapalı bir ortamda beş dakika süreyle %100 CO<sub>2</sub> solutularak hipoksiye sokuldu; hemen ardından beş dakika süreyle %100 O<sub>2</sub> solutularak reoksijenizasyon uygulandı (Şekil 3,4) (117). Hipoksi periyodundan sonra tüm hayvanların siyanotik oldukları, gasping yaptıkları ve dışkılamalarının olduğu gözlemlendi. Günlük vücut ağırlığı takibi yapılan çalışma gruplarındaki tüm hayvanlar doğumdan sonra 4. günde

(96 saatlikken), NEK modeli oluşturulanlar işlemden en az dört saat sonra servikal dislokasyon ile dekapite edildi. Dekapitasyondan sonra 30 dakika içinde tüm rat yavrularının terminal ileumundan en az iki cm olacak şekilde rezeksiyon yapıldı (Şekil 5,6). Alınan bağırsak doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik inceleme için, bir kısmı ise biyokimyasal tetkikler için ayrıldı.



Şekil 3, 4: Hava geçirmez kapalı bir ortamda H/R yöntemi uygulanışı.

### Histopatolojik Değerlendirme

Alınan bağırsak örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında %10'luk tamponlu formalin ile fikse edildi ve parafine gömülerek bloklandı. Histolojik değerlendirme için parafin bloklardan 5 mikrometrelik ( $\mu\text{m}$ ) kesitler alınarak Hemotoksilen-Eosin (H&E) boyası ile boyandı. Bağırsaktaki histopatolojik değişiklikler, ışık mikroskopunda uzman bir patolog tarafından rat grupları bilinmeden kör olarak değerlendirildi ve aşağıdaki gibi semikantitatif olarak *Grade 1*: Normal histoloji, *Grade 2*: (Minimal) Hidropik dejenerasyon ve/veya yüzeysel epitel hücrelerinin seperasyonu, *Grade 3*: (Hafif) Villus epitel hücre nekrozu, *Grade 4*: (Orta) Tam villus nekrozu, *Grade 5*: (Şiddetli) Transmural nekroz şeklinde derecelendirildi (118).

### İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal (İHK) değerlendirme için parafin bloklardan poly-L-lizinli elektrostatik yüklü lamlara 4-5  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler alınarak

deparafinizasyon için etüvde 60°C’de en az iki saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dâhil olmak üzere, tüm boyama süreci Ventana, BechMark LT tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında gerçekleştirildi. Primer antikor olarak anti-TLR4 monoklonal antikor (Dilüsyon: 1/75, İnkübasyon süresi: 60 dakika, Klon:76B357.1, Abcam, England) kullanıldı. Kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılmaları ve lamel ile kapatılma aşamaları elde yapılarak immünohistokimya boyama protokolü tamamlandı. Pozitif kontrol olarak rat ince barsağı kullanıldı. Aynı doku örneklerine ait kesitler, aynı İHK yöntemle primer antikor ilave edilmeksizin boyanarak negatif kontrol olarak değerlendirildi. Anti-TLR4 monoklonal antikor boyanması değerlendirilirken her rat için kesitin tamamı ışık mikroskopunun (NİKON ECLIPSE Ci-L) X4, X10, X20, X40 büyütmesinde taranarak membranöz boyanmanın en yoğun ve kesitin en ince olduğu alanlar seçildi. Anti-TLR4 monoklonal antikor boyanmasını değerlendirirken membranöz boyanma yoğunluğu için 0: boyanma yok, 1: zayıf boyanma, 2: orta boyanma ve 3: güçlü boyanma olarak derecelendirildi. Pozitif boyanan alanlar için 0: pozitif boyanan hücre oranı %10 veya altı, 1: pozitif boyanan hücre oranı %11-25, 2: pozitif boyanan hücre oranı %26- 50, 3: pozitif boyanan hücre oranı %51-75, 4: pozitif boyanan hücre oranı %76 ve üzeri olarak derecelendirildi. Bundan sonra final boyanma skorunu hesaplamak için bu iki farklı derecelendirmenin skorları çarpıldı. Elde edilen sayı ile final skora ulaşıldı. Buna göre final skorları, 0-2: negatif, 3-4: zayıf pozitif, 6-8: orta pozitif, 9-12: şiddetli pozitif olarak değerlendirildi (119,120).

### **Biyokimyasal Değerlendirme**

Terminal ileumdan alınan bağırsak doku örnekleri sıvı nitrojen ile dondurularak saklama kabında TNF- $\alpha$ , IL-6, TAS, TOS analizi için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında bir biyokimya uzmanı tarafından değerlendirilinceye kadar -80 °C’de saklandı.

### **TNF- $\alpha$ Düzeyi Ölçümü**

Çalışılacak preparatlar oda ısısında çözüldü. *Rat TNF alpha ELISA Kit* (ELISA; Invitrogen, Thermo Fisher, Camirillo, CA, USA) kullanıldı. ELISA plağındaki kuyucuklara 100  $\mu$ l standart ve 100  $\mu$ l örnek eklendi. Plakların üzeri kapatılarak iki saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaklar

yıkama solüsyonu (Wash buffer) ile dört kez yıkandı. 100 µl TNF-α biotin konjugat hem standartlara hem de örneklerle eklenerek, plakların üzeri kapalı şekilde bir saat oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı. İnkübasyondan sonra plaklar yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı. 100 µl horseradish peroksidaz (HRP) eklenip 30 dakika ışıktan korunarak plaklar inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaklar yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı. 100 µl kromojen eklenip renklenme sağlandı. 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulup plakların 450 nm’de ELISA reader cihazında okuması yapıldı. Okunan absorbans değerleri, bilgisayar programında yerine konularak TNF-α (pg/ml) saptandı.

### **IL-6 Düzeyi Ölçümü**

Çalışılacak preparatlar oda ısısında çözüldü. İnterlökin-6 düzeyi ölçümü için *Rat IL-6 ELISA Kit* (ELISA; Invitrogen, Thermo Fisher, Camirillo, CA, USA) kitleri kullanılarak protokoller uygulandı. ELISA plağındaki kuyucuklara 100 µl standart ve 100 µl örnek eklendi. Plakların üzeri kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaklar yıkama solüsyonu (Wash buffer) ile 4 kez yıkandı. 100 µl IL-6 biotin konjugat hem standartlara hem de örneklerle eklenerek, plakların üzeri kapalı şekilde bir saat oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı. İnkübasyondan sonra plaklar yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı. 100 µl HRP eklenip, 30 dakika ışıktan korunarak plaklar inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaklar yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı. 100 µl kromojen eklenip renklenme sağlandı 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulup plakların 450 nm’de ELISA reader cihazında okuması yapıldı. Okunan absorbans değerleri, bilgisayar programında yerine konularak IL-6 düzeyleri (pg/ml) saptandı.

### **Total Antioksidan Status, Total Oksidan Status düzeyi ve OSİ hesaplanması**

Çalışılacak preparatlar oda ısısında eritildi. TOS ve TAS kitleri (Rel Assay Diagnostics) Synergy HT, Biotek biyokimya otoanalizörüne uyarlanarak çalışıldı. Standarttan ve örneklerden 30 µl eklendi. Reagent 1 den 500 µl bütün kuyucuklara eklendi ve 30 saniye sonra 660 nm’de ilk okuma yapıldı. 5 µl reagent 2 eklenip ve 660 nm’de ikinci okuma yapılarak sonuçlar hesaplandı.

TAS ölçümü Özcan Erel tarafından tanımlanan total antioksidan aktivite metodu kullanılarak yapıldı (121). Ölçümün sonuçları  $\mu\text{mol Trolox equivalent/l}$  olarak birimlendirildi. TOS ölçümü Özcan Erel tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı (122). Ölçümün sonuçları  $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$  olarak birimlendirildi. OSİ değeri TOS/TAS oranı olarak kabul edildi. Öncelikle TAS değerleri  $\text{mmol/L}$  ye çevrildi. OSİ değeri Formula yöntemine göre hesaplandı (123). OSİ (Arbitrary Unit)=TOS ( $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$ )/TAS ( $\text{mmol Trolox Equiv./L}$ ).



**Şekil 5, 6:** H/R modeli oluşturulan rat yavrusu bağırsaklarının makroskopik görünümü. Belirgin renk değişikliği, kanama odakları ve nekrotik alanlar dikkati çekiyor.

### **İstatistiksel Analizler**

Vücut ağırlıkları, histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal bulgular ortanca ve minimum-maksimum aralıklara göre verildi. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemede non-parametrik test (*Kruskal Wallis* ve *Mann-Whitney U* testi) kullanıldı. Saptanan sonuçlar arasındaki farklılık için  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi. İstatistiksel verilerin bilgisayarda hesaplanmasında *Statistical packages for social sciences (SPSS)* (*SPSS for Windows 22*; SPSS, Chicago, Illinois, A.B.D) yazılım programı kullanıldı.

## BULGULAR

Deney boyunca annelerinin yanında kalan ve anne sütü ile beslenen yavru ratların üç günlük izleminde, her bir grubun günlük vücut ağırlığı artışının olduğu ve gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı saptandı ( $p > 0.05$ , Tablo 2).

**Tablo 2:** Gruplardaki rat yavrularının 1., 2. ve 3. gün vücut ağırlıkları (gr) ve dağılımı.

Gruplar	1. gün	2. gün	3. gün
	(Ort±SS) (min-maks)	(Ort±SS) (min-maks)	(Ort±SS) (min-maks)
<b>Grup 1 (Kontrol) (n:8)</b>	7.25 ± 0.46 (7 - 8)	8.25 ± 0.46 (8 - 9)	9.38 ± 0.52 (9 - 10)
<b>Grup 2 (Kafein) (n:8)</b>	7.75 ± 0.71 (7 - 9)	8.75 ± 0.71 (8 - 10)	9.88 ± 0.64 (9 - 11)
<b>Grup 3 (H/R) (n:8)</b>	7.63 ± 0.52 (7 - 8)	8.63 ± 0.52 (8 - 9)	9.63 ± 0.52 (9 - 10)
<b>Grup 4 (Kafein+H/R) (n:8)</b>	8 ± 0.93 (7 - 9)	9 ± 0.93 (8 - 10)	10.25 ± 0.71 (9 - 11)
<b>p</b>	0.237	0.237	0.064

Ort±SS:Ortalama±standart sapma, min: minimum, maks: maksimum, H/R: Hipoksi/Reoksijenizasyon.

Bağırsakların histopatolojik değerlendirilmesinde kontrol grubunun tümü normal histopatolojik (*grade 1*) yapıya sahipken, kafein uygulanan ancak NEK modeli oluşturulmayan rat yavrularının bağırsaklarında makroskopik olarak hafif renk değişikliği, mikroskopik olarak ise hepsinde hidropik dejenerasyon (*grade 2*) olduğu saptandı. H/R modeli ile NEK oluşturulan yavru ratların bağırsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar ile mikroskopik olarak hepsinde villüs epitel hücre nekrozu (*grade 3*) olduğu saptandı. Kafein uygulanan ve H/R modeli ile NEK modeli oluşturulan yavru ratların bağırsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, belirgin



ödem ve lokalize hemorajik alanlar ile mikroskopik olarak villüs epitel hücre nekrozu (grade 3) ve tam villüs nekrozu (grade 4) olduğu saptandı (Şekil 7-10). Kafein+H/R grubu ile kontrol ve kafein grupları arasında, H/R ile kontrol grupları arasında histopatolojik incelemede istatistiksel anlamlı farklılık bulundu (p=0.001, Tablo 3). Kafein verilip NEK olmayan grup ile kontrol, H/R grubu ile kafein grubu, kafein+H/R grubu ile H/R grubu arasında ise bağırsak histopatolojisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05, Tablo 3). Bu bulgular ile H/R yöntemiyle rat yavrularının bağırsaklarında histopatolojik olarak *grade 3* hasarlanma meydana geldiği görüldü. Kafeinin, kafein grubundaki bağırsak doku örneklerinde, hidropik dejenarasyona neden olarak NEK oluşumunu kolaylaştırdığı görüldü. Ancak kafein+H/R grubu histopatolojik skorları H/R grubu skorları ile karşılaştırıldığında, kafeinin intestinal hasarlanmayı belirgin olarak arttırmadığı saptandı.

**Tablo 3:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak histopatolojik değerlendirme skorları.

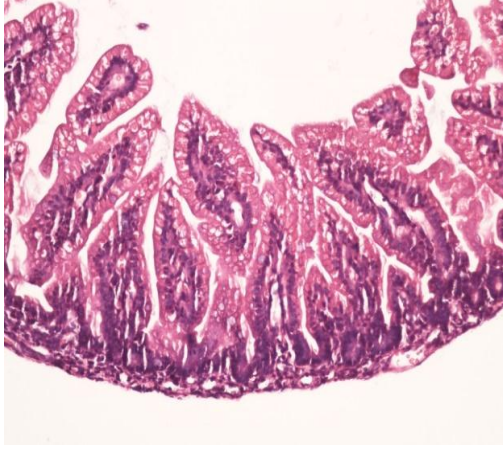
<b>Gruplar</b>	<b>Histopatolojik <i>Grade</i></b> <b><i>Ort (min-maks)</i></b>
<b>Kontrol</b>	1.0 (1 - 1) <sup>a</sup>
<b>Kafein</b>	2.0 (1 - 2) <sup>b</sup>
<b>H/R</b>	3.0 (2 - 3) <sup>c</sup>
<b>Kafein+H/R</b>	3.0 (2 - 4)

Ort: Ortalama, min: minimum, maks: maksimum, H/R: Hipoksi/Reoksijenizasyon.

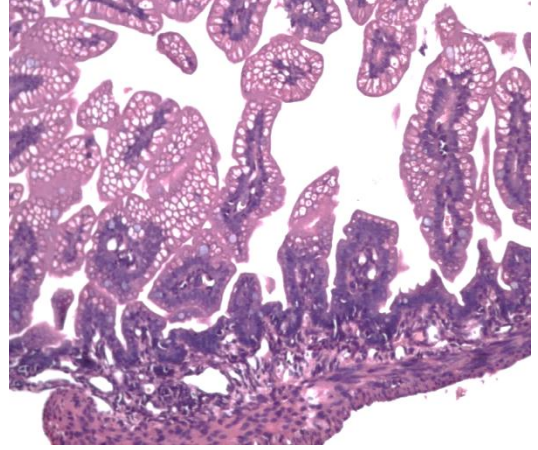
a : Kafein+H/R ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( p=0.001).

b : Kafein+H/R ile Kafein grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( p=0.001).

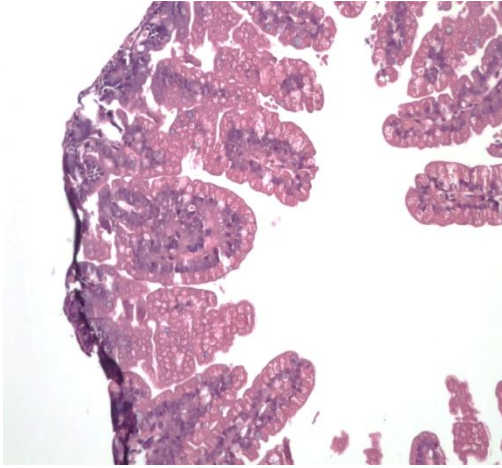
c : H/R ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( p=0.001).



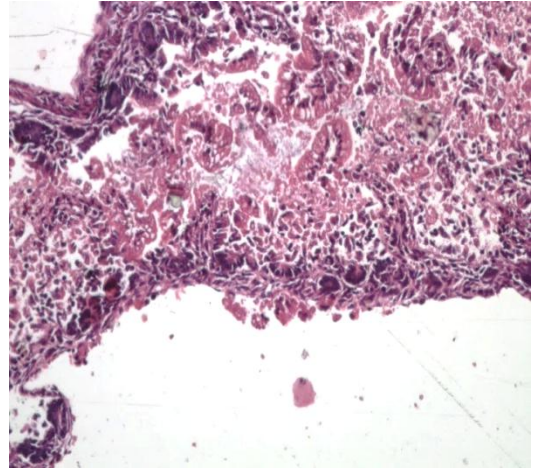
**Şekil 7.** Kontrol grubu (Rat no: 8). Normal histoloji, *grade 1* (H&E, X1/200).



**Şekil 8.** Kafein grubu (Rat no: 3). Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, *grade 2* (H&E, X1/200).



**Şekil 9.** H/R grubu (Rat no: 4). Hafif villus epitel hücre nekrozu, *grade 3* (H&E, X1/200).



**Şekil 10.** Kafein+H/R grubu (Rat no: 1). Tam villus epitel hücre nekrozu, *grade 4* (H&E, X1/200).

İmmunohistokimyasal yöntemle çalışılan ve artması durumunda NEK'le ilişkili olduğu bilinen TLR4'ün bağırsak doku yoğunluğu değerlendirildiğinde, H/R ve kafein+H/R grubunda en yüksek, kontrol ve kafein grubunda ise en düşük olduğu saptanmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ). TLR4'ün yüzdesi tüm gruplarda eşit olarak değerlendirildi (Tablo 4). TLR4

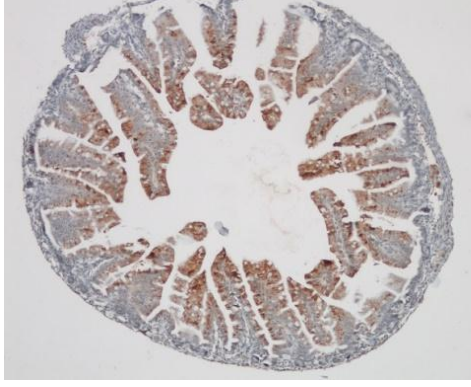
yoğunluk ve yüzde skorlarının çarpımı ile elde edilen final skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 11-14).

**Tablo 4:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak immunohistokimyasal olarak TLR4 boyaması yoğunluğu, yüzdeleri ve final skor sonuçları.

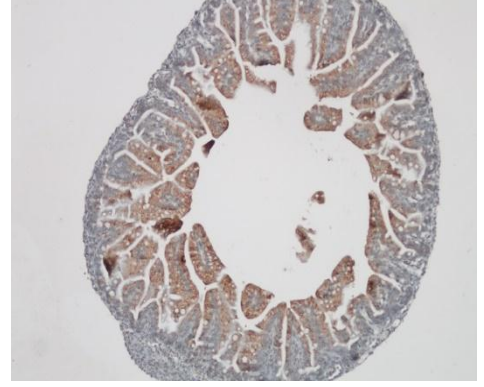
<b>Gruplar</b>	<b>TLR4 (Yoğunluk) Ort (min-maks)</b>	<b>TLR4 (%) Ort (min-maks)</b>	<b>Final Skoru Ort (min-maks)</b>	<b>p</b>
<b>Grup 1 (Kontrol) (n:8)</b>	2 (1-3)	4 (2-4)	2,5 (1-4)	
<b>Grup 2 Kafein (n:8)</b>	2 (1-3)	4 (3-4)	3,1 (2-4)	
<b>Grup 3 H/R (n:8)</b>	2,5 (1-3)	4 (3-4)	3,1 (2-4)	>0,05
<b>Grup4 Kafein+H/R (n:8)</b>	3(1-3)	4 (3-4)	3,3 (2-4)	

TLR4:Toll-like reseptör 4, Ort: Ortalama, min: minimum, maks: maksimum, H/R: Hipoksi/Reoksijenizasyon.

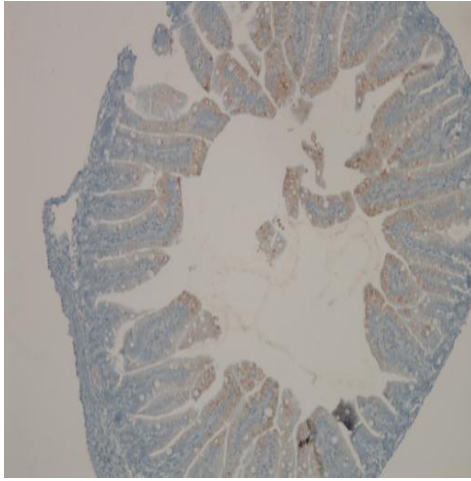
NEK'te inflamatuvar mediatör olarak belirtilen TNF- $\alpha$  ve IL-6 bağırsak doku düzeyleri incelendiğinde, en yüksek düzeylerin sırasıyla H/R ve kafein+H/R gruplarında olduğu görüldü (Şekil 15,16). Gruplar karşılaştırıldığında, H/R, kafein+H/R ve kafein gruplarının bağırsak doku TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin artış gösterdiği saptandı ( $p<0.05$ ). Ayrıca H/R ve kafein+H/R gruplarının, kafein grubuna göre TNF- $\alpha$  ve IL-6 bağırsak doku düzeylerinin anlamlı oranda artış olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). H/R grubunun TNF- $\alpha$  ve IL-6 bağırsak doku düzeylerinin, kafein+H/R grubuna göre yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptandı ( $p>0.05$ , Tablo 5).



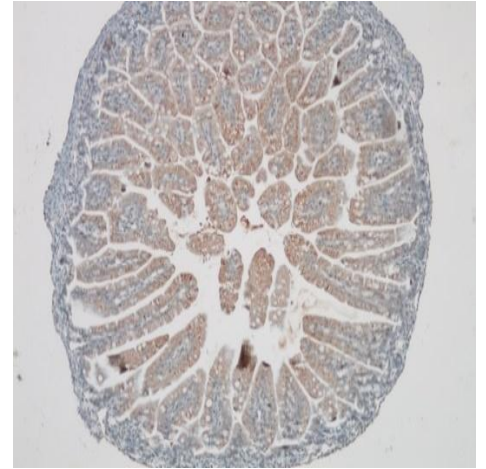
**Şekil 11.** Kontrol grubu (Rat no: 1).  
TLR ekspresyonu (X1/100).



**Şekil 12.** H/R grubu (Rat no: 8). TLR  
ekspresyonu ( X1/100).

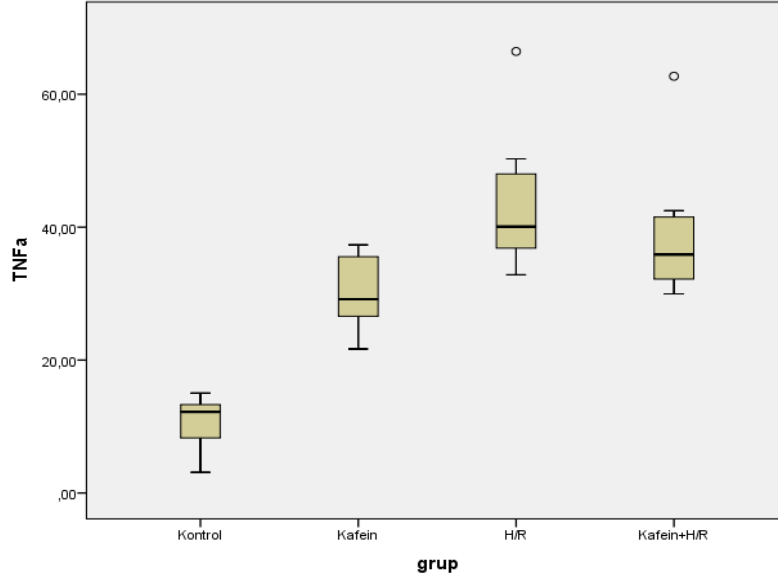


**Şekil 13.** Kafein grubu (Rat no: 8).  
TLR ekspresyonu ( X1/100).

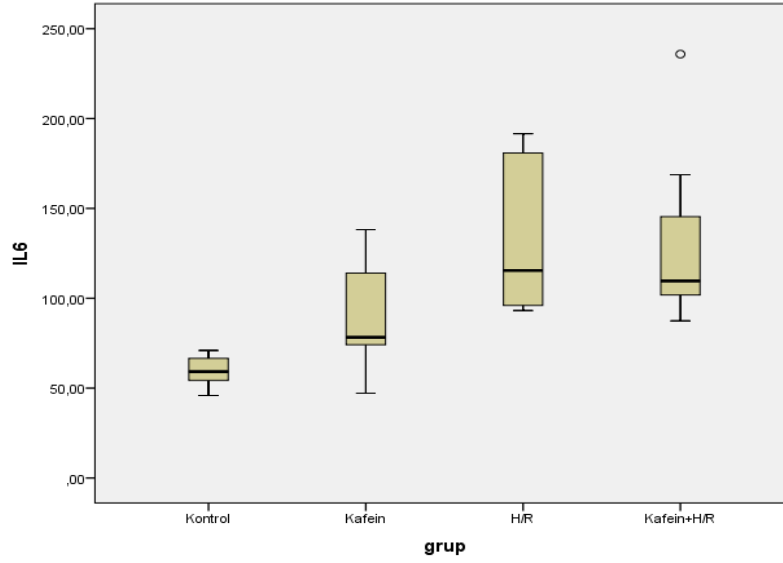


**Şekil 14.** Kafein+H/R (Rat no: 8).  
TLR ekspresyonu (X1/100).

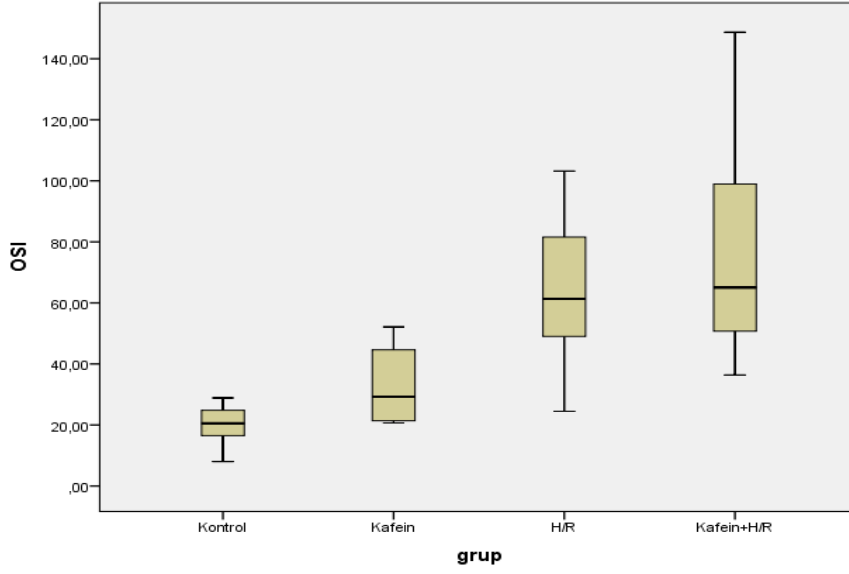
**Şekil 15:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak TNF- $\alpha$  düzeyleri.



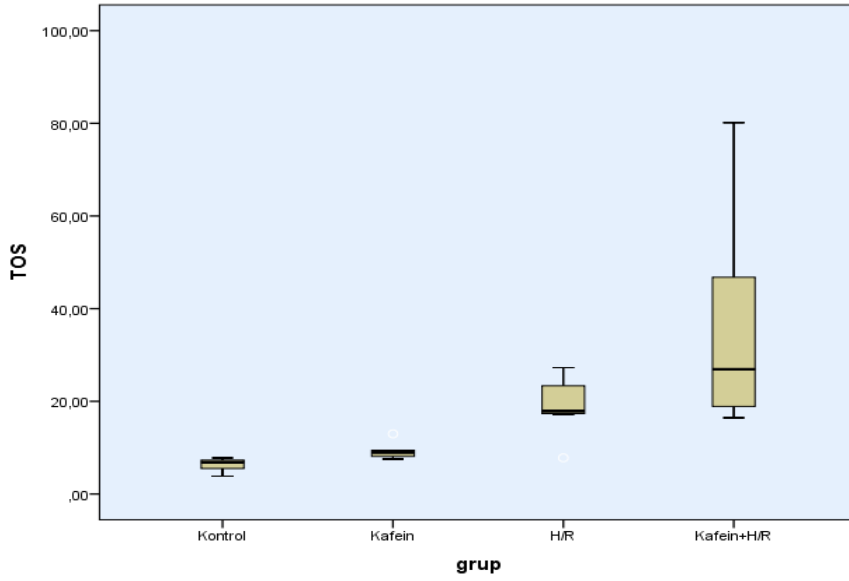
**Şekil 16:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak IL-6 düzeyleri.



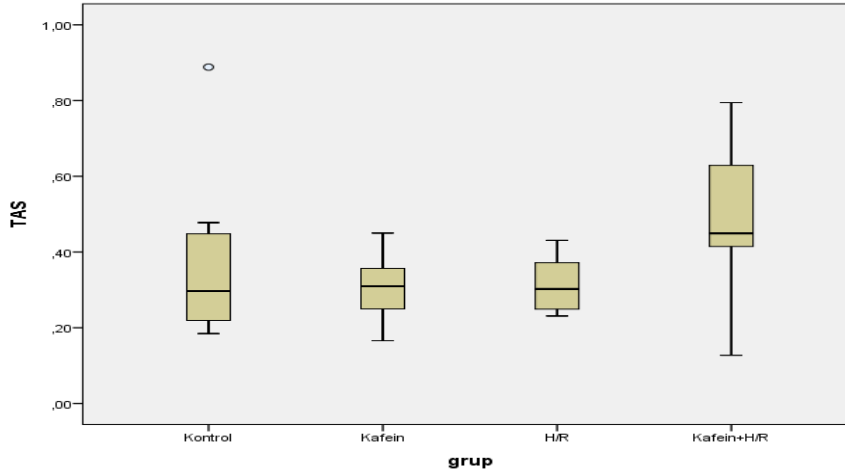
**Şekil 17 :** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının OSİ değerleri.



**Şekil 18:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak TOS düzeyleri.



**Şekil 19:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsaklarındaki TAS düzeyleri.



NEK'te oksidatif durumu gösteren TOS bağırsak doku düzeyleri incelendiğinde; en yüksek düzeylerin sırasıyla kafein+H/R ve H/R gruplarında olduğu görüldü (Şekil 18). Gruplar karşılaştırıldığında, kafein+H/R, H/R ve kafein gruplarının kontrol grubuna göre belirgin bağırsak TOS düzeyinde artış gösterdiği saptandı ( $p<0.05$ ). Ayrıca kafein+H/R ve H/R gruplarının, kafein grubuna göre bağırsak TOS düzeylerinin anlamlı oranda artış olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Kafein+H/R grubunun TOS doku düzeylerinin H/R grubuna göre yüksek olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı bulundu ( $p>0.05$ , Tablo 5).

NEK'te anti-oksidan durumu gösteren TAS'ın bağırsak doku düzeyleri (Şekil 19) incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ( $p>0.05$ , Tablo 5).

Hesaplanan OSİ değerleri incelendiğinde, en yüksek düzeylerin sırasıyla kafein+H/R ve H/R gruplarında olduğu görüldü (Şekil 17). Gruplar karşılaştırıldığında, kafein+H/R, H/R ve kafein gruplarının kontrol grubuna göre bağırsak OSİ düzeyinin belirgin artış gösterdiği saptandı ( $p<0.05$ ). Ayrıca kafein+H/R ve H/R gruplarının, kafein grubuna göre bağırsak doku OSİ düzeylerinin anlamlı oranda artış gösterdiği görüldü ( $p<0.05$ ). Kafein+H/R grubunun OSİ değeri H/R grubuna göre yüksek olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı bulundu ( $p>0.05$ , Tablo 5).

**Tablo 5:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının bağırsak TNF- $\alpha$ , IL-6, TOS, TAS, OSİ düzeyleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmesi.

<b>Gruplar</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> <b>pg/ml</b> <b>(Ort<math>\pm</math>SS)</b>	<b>IL-6</b> <b>pg/ml</b> <b>(Ort<math>\pm</math>SS)</b>	<b>TOS</b> <b>mmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> <b>Equiv./L</b> <b>(Ort<math>\pm</math>SS)</b>	<b>TAS</b> <b>Mmol</b> <b>Trolox</b> <b>Equiv./L</b> <b>(Ort<math>\pm</math>SS)</b>	<b>OSİ</b> <b>(Ort<math>\pm</math>SS)</b>
<b>Kontrol</b>	10,71 $\pm$ 4,28	59,63 $\pm$ 8,62	6,38 $\pm$ 1,37	0,38 $\pm$ 0,23	20,08 $\pm$ 6,51
<b>Kafein</b>	30,20 $\pm$ 5,49 <sup>*</sup>	89,77 $\pm$ 31,09 <sup>a</sup>	9,20 $\pm$ 1,71 <sup><math>\beta</math></sup>	0,30 $\pm$ 0,09	32,90 $\pm$ 13,07 <sup><math>\gamma</math></sup>
<b>H/R</b>	43,63 $\pm$ 10,74 <sup>**</sup>	133,67 $\pm$ 43,84 <sup>aa</sup>	19,02 $\pm$ 5,86 <sup><math>\beta\beta</math></sup>	0,31 $\pm$ 0,08	63,94 $\pm$ 25,52 <sup><math>\gamma\gamma</math></sup>
<b>Kafein+H/R</b>	38,98 $\pm$ 10,52 <sup>**</sup>	129,62 $\pm$ 49,35 <sup>aa</sup>	35,22 $\pm$ 21,78 <sup><math>\beta\beta</math></sup>	0,49 $\pm$ 0,21	76,81 $\pm$ 37,04 <sup><math>\gamma\gamma</math></sup>
<b>p</b>	0,000	0,000	0,000	>0,05	0,000

TNF- $\alpha$ : Tümör nekrozis faktör alfa, IL-6: İnterlökin-6, TOS: Total oksidan status, TAS: Total antioksidan status, OSİ: Oksidatif stres indeksi, Ort $\pm$ SS: Ortalama $\pm$ standart sapma, H/R: Hipoksi/Reoksijenizasyon.

\* : Kafein>kontrol (p:0,001).

\*\* : H/R ve kafein+H/R>kontrol (p: 0,000) ve kafein (p<0,05).

<sup>a</sup> : Kafein> kontrol (p:0,007) .

<sup>aa</sup> : H/R ve kafein+H/R>kontrol (p:0,000) ve kafein (p<0,05).

<sup>$\beta$</sup>  : Kafein>kontrol (p:0,001).

<sup>$\beta\beta$</sup>  : Kafein+H/R ve H/R> kontrol (p:0,000) ve kafein (p<0,01)

<sup>$\gamma$</sup>  : Kafein>kontrol (p:0,028).

<sup>$\gamma\gamma$</sup>  : Kafein+H/R ve H/R>kontrol (p<0,005) ve kafein (p<0,01)



## TARTIŞMA

Nekrotizan enterokolit tüm gelişmelere rağmen özellikle prematüre yenidoğanları etkileyen, patofizyolojisi tam olarak anlaşılmayan önemli bir gastrointestinal problem olup, prematürelerin önemli morbidite ve mortalite nedenidir (2). NEK görülme sıklığı coğrafi farklılıklar göstermekle birlikte aynı bölgedeki yenidoğan yoğun bakım üniteleri arasında bile farklılık göstermektedir (124).

Dünyada prematüre bebeklerde NEK görülme sıklığının %2,6-28 oranında olduğu bildirilmektedir (18). Prematürite nedeni ile yoğun bakım ünitelerine yatırılıp izlenenlerin %1-7,7'sinde NEK geliştiği ve tanı almış hastaların da %90'ının prematüre bebeklerden oluştuğu bildirilmektedir (18). Yapılan bir çalışmada 1500 gramın altında doğan prematüre bebeklerin %10'unun NEK'ten etkilendiği rapor edilmektedir (19).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda NEK insidansının %3 ile %6 oranları arasında değiştiği belirtilmektedir (20-22).

Günümüzde yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin yaygınlaşması ve teknolojik gelişmelerle prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşama şanslarının artmasına paralel olarak, NEK görülme sıklığı da artmıştır. Etiyolojinin tam anlaşılabilmesi, spesifik tedavi stratejilerinin net belirlenememesi nedeniyle morbidite ve mortalitesi halen yüksek bir hastalıktır.

NEK patogenezi net olmamakla birlikte etiyopatogenezde prematüre doğum, hipoksik-iskemik hasar, enteral ve formula ile besleme, beslenme volümünün hızlı artırılması, medikal tedaviler, eritrosit transfüzyonu, bakteri kolonizasyonu ve sepsis gibi birçok predispozan faktör sorumlu tutulmaktadır. Bu faktörler eşliğinde serbest oksijen radikalleri, aktive lökositler, lökotrienler, PAF, TNF- $\alpha$ , interleükinler, TLR gibi inflamatuvar mediatörler aracılığıyla, NEK'te ortak son yol olan bağırsak nekrozu gelişmektedir (2,6,18,23,47,48,73-75,82,86).

Hücresel apoptozis denilen programlanmış ölümü, proapoptotik ve antiapoptotik sinyal yolları arasındaki dengeye bağlıdır. Memeli hücrelerinde, apoptozise neden olan ve normalde inaktif olarak bulunan kaspazların aktivasyonu, hücre ölümünde kritik rol üstlenir. Kaspazlar ekstrinsek ve intrinsek yollarla aktive olabilir (125). TNF- $\alpha$ , fas ligand ve TLR ligandlar ekstrinsek yolun aktivatörleri

iken, intrensek yolun aktivasyonu DNA hasarı ya da yüksek pH gibi toksik oksidatif strese yanıtla oluşur.

NEK olan bebeklerin %90-95'i prematüre bebeklerdir. Term bebeklerde de predispozan faktörler varlığında NEK görülebilmektedir (2). Deneysel çalışmalarda yedi günlük ve daha büyük rat yavrularının santral sinir sistemi matürasyonunun, term insan yavrularının beyin gelişimine denk geldiği, yedi günden küçük rat yavrularının preterm bebeklere denk geldiği, hatta bir günlük rat yavrusunun insanda 22-24. gebelik haftası, üç günlük rat yavrusunun ise 28-32. gebelik haftasına denk geldiği belirtilmektedir (116). NEK bir prematüre hastalığı olduğu için, çalışmamıza prematüre döneme denk gelen postnatal 1-4 günlük rat yavruları alındı .

NEK'in patofizyolojisi ile ilgili ilk gözlemler, bağırsak iskemisinin bağırsak nekrozuna yol açtığını göstermiştir (126). Sudaki memelilerde gözlemlenen "dalış refleksi" ne benzer şekilde, stres dönemlerinde kan akımının splanknik bölgeden vital organlara doğru yöneldiği ve bu nedenle bağırsak hasarının oluştuğu öne sürülmüştür. Erken epidemiyolojik gözlemler, asfiksiyi önemli bir risk faktörü olarak tanımlasa da, sonraki çalışmalar NEK vakalarının çoğunun bağırsak perfüzyonunda ciddi bir bozulma ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Hayvan modellerinde, çalışmalar bağırsak nekrozunun başlatılmasında intestinal iskemi sonrası reperfüzyonun gerekli olduğunu göstermiştir (2).

Okur ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yeni bir yöntem ile hipoksi-reoksijenizasyon uygulanarak rat yavrularında NEK modeli oluşturulmuştur (117). Başka pek çok deneysel çalışmada Okur ve arkadaşlarının yöntemi uygulanıp histopatolojik ve biyokimyasal olarak insanlardaki NEK'e benzer intestinal hasarlanmanın meydana geldiği gösterilmiştir (55,116,127-129). Çalışmamızda da aynı yöntem ile rat yavrularında NEK modeli oluşturulmuştur.

Non-spesifik adenozin reseptör antagonisti olan kafein, hem 2016 RDS yönetimi Avrupa konsensüs raporu, hem de 2018 Türk Neonatoloji Derneği BPD izlem rehberinde doğum ağırlığı 1250 gr, doğumda gebelik yaşı 28 haftanın altında olan ve BPD riski taşıyan prematürelere postnatal ilk gün 20 mg/kg yükleme, 24 saat sonra 5 mg/kg idame doz ile önerilmektedir (9, 11). Bizim çalışmamızda da rat yavrularına aynı prematüre apnesinde önerilen kafein dozları verilerek NEK ile ilişkisi incelendi.

Dört adet olduğu belirtilen adenozin reseptörlerinden A<sub>2b</sub> en fazla başta kolon olmak üzere, retina, mesane ve fibroblastta bulunup, doku tamirinde görev almaktadır. Ayrıca T hücre ve natürel killer hücre üzerinden antiinflamatuvar etkinliği olduğu, ryanodin reseptörleri üzerinden hücre içi kalsiyum salınımında ve dolayısıyla kontraksiyonda görev aldığı bilinmektedir (12-14). Aynı zamanda endotelial ve düz kas hücrelerinde bulunan A<sub>2b</sub> reseptörünün vaskularizasyon ve vazodilatasyondan da sorumlu olabileceği bildirilmektedir (109).

Yapılan kısıtlı sayıdaki klinik ve deneysel çalışmalarda, adenozin reseptör antagonisti kafeinin, gastrointestinal sistemde motilitede ve süperiyor mezenterik arter kan akımında belirgin azalmaya neden olduğu ve bunun da NEK riskini arttırabileceği belirtilmektedir (14,17,110).

Çalışmamızda, Okur ve arkadaşlarının modeli kullanılarak H/R yöntemiyle intestinal hasarlanma (NEK modeli) oluşturulan ratların terminal ileumundan alınan bağırsak örneklerinde; makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar, mikroskopik olarak hidropik dejenerasyondan (grade 2) tam villüs epitel hücre nekrozuna (grade 4) kadar histopatolojik hasarlanma saptanırken, kontrol grubu tümüyle normal (grade 1) olarak değerlendirildi. Deneysel çalışma boyunca İP olarak 20 mg/kg/gün dozda yükleme, 24 saat sonra 5 mg/kg/gün idame dozda kafein uygulanan rat yavrularının olduğu kafein grubunda belirgin hidropik dejenerasyon (grade 2) görüldü. Kafein verildikten sonra H/R modeli ile NEK oluşturulan rat yavrularının olduğu kafein+H/R grubunda ise tam villüs epitel hücre nekrozu (grade 4) saptandı. Kafein grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da villüs epitel hücrelerinde belirgin hidropik dejenerasyon saptanması, kafeinin NEK patofizyolojisinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Kafein hacmine eşdeğer izotonik sodyum klorür solüsyonu İP verildikten sonra dördüncü günde H/R yöntemi ile NEK oluşturulan H/R grubunda histopatolojik olarak saptanan hafif villüs epitel hücre nekrozu skorunun, kontrol grubuna göre belirgin farklılık oluşturduğu görüldü. Kafein+H/R grubunun histopatolojik değerlendirme median skoru H/R grubunun median skoru ile aynı olmasına rağmen, H/R grubunda kafein+H/R grubunda görülen tam villüs epitel hücre nekrozunun görülmemesi, kafeinin NEK patofizyolojisinde predispozan rolü olabileceğini akla getirmektedir. Çalışmamızda uygulanan H/R modeli daha önce yapılan birçok

deneysel çalışmadaki H/R grubu bağırsak histopatolojik bulguları ile benzerlik göstermektedir (117,128). Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi hipoksi/reoksijenizasyonun NEK patogenezinde önemli bir risk faktörü olduğu bu çalışma ile de bir kez daha gösterildi.

TLR'ler bağırsakta bağışıklık hücreleri ve epitel hücrelerinde bulunur (130). Nekrotizan enterokolitte TLR'ler hakkındaki bilgilerimizin çoğu hayvan deneylerinden elde edilmekle birlikte, hayvan verileri ile insan verilerinin her zaman uyumlu olmayacağı unutulmamalıdır. TLR'lerin işlevi, intrauterin steril olan bağırsakların doğumdan sonra kolonizasyonu sırasında, komensal ve patojen mikroorganizmalar arasındaki dengenin sağlanmasıdır (5). TLR'ler arasında TLR4, NEK için en fazla dikkati çekendir. TLR4, enflamasyonun bir tetikleyicisi olan gram-negatif bakteriyel hücre duvarı bileşeni lipopolisakkarit tarafından aktive edilir. TLR4 geni ve protein ekspresyonu, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında NEK'li insan ve fare ince bağırsaklarında daha yüksektir (130-132). TLR4 aynı zamanda, çözünür CD14, laktadherin, laktoferrin ve 2p-fukosillaktoz gibi anne sütündeki araçların da hedefidir (133). Anne sütü ile beslenen farelerin ileumlarının incelendiği bir çalışmada, fare anne sütünün TLR4 ekspresyonunu azaltarak, NEK'i azalttığı gösterilmiştir (134). Çalışmamızda tüm gruplarda TLR4 yoğunluğu ve yüzde oranları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. TLR4 reseptör yoğunluğu ve yüzdesinin çarpımı ile elde edilen final skoru puanlamasında, final skoru sırasıyla kafein+H/R grubunda sonra H/R grubu, ardından kafein grubunda en yüksekti. Ancak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kafeinin antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, prematüre apnesinde kullanılan kafeinin yenidoğan rat akciğerinde TLR2, TLR4 ve TLR9 düzeylerine etkisi incelenmiş. Kafein alan grupta, TLR 2 ve TLR4 düzeyleri azalırken, TLR9 düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (114). Literatürde NEK'te kafeinin TLR4 üzerinden etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Antiinflamatuvar etkisi olduğu belirtilen kafeinin, TLR4 düzeyleri üzerine etkisinin diğer risk faktörleri ile birlikte değerlendirileceği daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

TNF- $\alpha$ , her hücre tipinde NF- $\kappa$ B gibi inflamatuvar mediatörleri aktive eden bir anahtar sitokindir. NEK olmayan kontrollerle kıyaslandığında, TNF- $\alpha$ 'nın NEK'te

sistemik (135) ve intestinal dokuda (136) düzeylerinin arttığı, ancak hastalık şiddetinin göstergesi olarak kabul edilmediği bildirilmektedir (137). NEK modeli uygulanmış ratlarda ilk beslemeden kısa bir zaman sonra bile, doku ve sistemik TNF- $\alpha$  düzeyleri anlamlı olarak artmaktadır (138,139). TNF- $\alpha$ 'nın NEK patofizyolojisindeki rolü düşünülerek yapılan bir deneysel çalışmada, TNF- $\alpha$  blokörü olduğu bilinen pentoksifilin, NEK sağaltımında anlamlı bir azalma yapmadığı rapor edilmiştir (140). Ancak, monoklonal anti-TNF antikoru olan etanersept veya infliksimab ile NEK modeli oluşturulmuş yenidoğan rat yavrularında, bağırsak inflamasyonu ve doku hasarını önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (141,142). Çalışmamızda TNF- $\alpha$  H/R gruplarında kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptanmıştır. Aynı zamanda kafein grubunda TNF- $\alpha$  düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek iken, H/R grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur.

IL-6'nın hem kendisi, hem de hepatositleri uyararak salgılattığı CRP önemli biyokimyasal belirteçlerdir (143). IL-6 geninde tek nükleotid polimorfizminin olduğu bilinen 32 hafta ve altındaki Kafkasya'lı bebeklerde yapılan bir çalışmada, IL-6 düzeyi ile korele NEK saptanması, IL-6'nın NEK patogenezinde önemli bir rol aldığını düşündürmektedir (144). Yapılan başka bir çalışmada, IL-6 gen polimorfizmi saptanan 32 haftadan küçük bebeklerde NEK gelişme riski altı kat ve evre III hastalığa ilerlemenin yedi kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (145). Kontrollerle karşılaştırıldığında, evre III NEK hastalarında rezeke edilen bağırsak dokusunda, yüksek IL-6 düzeyi ve mRNA ekspresyonunu saptayan çalışmalar da mevcuttur (131,146,147). IL-6'nın H/R'de (NEK) yüksek olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (131,143-145,147). Çalışmamızda IL-6 düzeyleri H/R gruplarında kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptandı. IL-6 düzeyleri, kafein grubunda, kontrol grubuna göre belirgin yüksek, H/R grubuna göre belirgin düşüktü.

Hipoksi/reperfüzyon nedeniyle oluşan intestinal hasarın, ortamdaki hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $O^-$ ) ve hidroksil anyonu ( $OH^-$ ) gibi serbest oksijen radikalleri aracılığıyla geliştiği, bu radikallere bağlı olarak nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı meydana geldiği ve hücre ölümünün gerçekleştiği belirtilmektedir (117,148). Serbest oksijen radikallerinin

kronik akciğer hastalığı, NEK, prematürite retinopatisi ve intrakraniyal kanama dahil olmak üzere prematürelere birçok durumda suçlu olduğu bilinmektedir. Hipoksi ve benzeri durumla tetiklenen PAF gibi proinflamatuvar mediyatörlerden sonra inflamatuvar sitokinler (TNF- $\alpha$ ,IL-6) salınır. Bu durum, aktive edilmiş polimorfonükleer lökositlerin migrasyonu sonucunda, reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin aşırı artışı ile sonuçlanır (135,149). Normal fizyolojik koşullar altında, reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin zararlı etkileri antioksidan enzimlerin düzeyi ile sınırlandırılabilir. Bununla birlikte, aşırı reaktif oksijen ve reaktif nitrojenlerin üretimi ya da antioksidan kapasitedeki sınırlamalardan kaynaklanan dengesizlik, mukozal hasara neden olup, ardından hücrel membran lipidlerinin peroksidasyonu ve hücrel proteinlerin oksidasyonu nedeniyle nekroz meydana gelir (150). Çalışmamızda oksidatif stresi değerlendirmek üzere Özcan Erel'in tanımladığı yöntemle, TOS, TAS ve OSİ değerlendirilmeleri yapıldı (122).

Çalışmamıza benzer H/R modeli yapılan hayvan çalışmalarında, antioksidan kapasitenin (glutasyon ve glutasyon peroksidaz) azaldığı, lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit gibi oksidatif strese bağlı ürünlerin arttığı bildirilmektedir (128). Bu deneysel çalışmada TOS değeri H/R gruplarında kontrol ve kafein grubuna göre belirgin artmış aynı zamanda kafein grubunda kontrol grubuna göre de belirgin yüksek saptandı. Ancak TAS bakımından gruplar arasında farklılık yoktu. TOS/TAS oranı olarak değerlendirilen OSİ bakımından gruplar değerlendirildiğinde; H/R gruplarında OSİ belirgin yüksek bulundu. Ayrıca OSİ'nin kafein grubunda kontrol grubuna göre belirgin yüksek, ancak H/R grubuna göre belirgin düşük olduğu görüldü. Hatta en yüksek OSİ değeri kafein+H/R grubunda bulundu. Kafeinin OSİ'yi kontrol grubuna göre artırması H/R uygulanan rat yavrularında intestinal hasarlanmada predispozan bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Prematürelere hipoksi reoksijenizasyon sonrası yoğun olarak ortama salınan serbest oksijen radikallerine karşı koruyucu olan antioksidan defans sistemleri yetersizdir (2). Çünkü antioksidan enzimleri içeren hücre içi antioksidan savunma mekanizmaları, gebeliğin son zamanlarında artar. Bu nedenle daha düşük seviyelerde plazma radikal toplayıcıları, metal bağlayıcı proteinler (transferrin ve seruloplazmin), katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi

azdır (151). Antioksidan enzim kapasitesindeki eksiklik NEK'de doku hasarına yatkınlığı gösteren bir faktördür (30).

Neonataloji ve teknolojideki ilerlemelere rağmen, NEK'in spesifik erken klinik belirtisi ve laboratuvar bulgusu yoktur. Tanı konulmasında gecikilmesi morbidite ve mortaliteyi arttırdığından, erken tanı konulabilmesini sağlayacak belirteçler gerekmektedir. Kordon kanındaki oksidatif stres belirteçlerinin NEK riski olan bebeklerin erken tanımlanmasına izin verdiğine dair kanıtlar vardır. Özellikle prematüre bebeklerde görülen bu ağır hastalık için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde bu belirteçler kullanılabilir (152).

Prematüre bebeklerde apne tedavisi için rutin kullanılması önerilen (9-11), antioksidan, nöroprotektif etkileri olduğu belirtilen kafeinin gastrointestinal sistem ve hücre düzeyindeki etkilerinin gösterildiği karışık ve çelişkili çalışmalar vardır (15, 16).

Hoecker ve arkadaşlarının (110) 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, ortalama gebelik yaşları  $31 \pm 1,2$  hafta ve ortalama vücut ağırlıkları  $1400 \pm 380$  gr olan 16 preterm yenidoğana 24. ve 72. saatlerde  $25 \text{ mg/kg/gün}$  kafein verilerek, kafeinden sonra 1. ve 2. saatlerde doppler sonografi ile süperiyor mezenterik ve çölyak arterlerindeki kan akım hızları ölçülmüş. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, kan basıncı ve kalp hızında hiçbir değişiklik gözlenmezken, süperiyor mezenterik arterdeki ortalama kan akım hızının kafein uygulamasından 1 ve 2 saat sonra anlamlı derecede azaldığı saptanmış. Çölyak arterindeki ortalama kan akım hızı da istatistiksel olarak anlamlı (%14) azalma göstermiş ve bu durumun intestinal hasarlanma ile ilişkili olabileceği düşünülmüş (110).

Park ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir derlemede erken kafein kullanımının, NEK riskini arttırmadan, mortalite ve bronkopulmoner displazi de dahil olmak üzere, yenidoğanların ciddi sorunları üzerine yararlı etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (15). Hemen arkasından Cox ve arkadaşlarının 2015 (16) yılında yaptıkları retrospektif bir çalışmada, 18 aylık dönemde üçüncü düzey yoğun bakım ünitelerinde izlenen 615 prematüre bebekte nekrotizan enterokolit ve kafein uygulaması arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bunların %7,3'ünde NEK geliştiği, kafein uygulaması ile NEK gelişimi arasında bir ilişki olduğu vurgulanmıştır. Prematüre bebeklerde kafein uygulaması ile nekrotizan enterokolit gelişimi arasında

potansiyel bir ilişki olduğu belirtilmekle birlikte, doz bağımlı etkilerin ve yükleme dozlarının araştırılması gerektiği ifade edilmiştir. Çalışmamızda prematüre apnesi tedavisinde rutin kullanımı önerilen kafeinin, H/R modeli geliştirilen ratlarda kontrol grubuna göre TNF- $\alpha$ , IL-6 ve OSİ'yi belirgin arttırdığı bu nedenle NEK gelişiminde predispozan bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir.

Non-spesifik adenosin reseptör antagonisti kafeinin bronkopulmoner dsiplazi oluşturulmuş yenidoğan ratlardaki etkisini araştıran bir çalışmada kafein tedavisinin enflamasyonu arttırdığı ve hiperoksiye maruz kalan yenidoğan ratlarda alveoler hipoplaziyi kötüleştirdiği belirtilmiş. Bu değişikliklerin alveolar tip II hücre sayısının azalması, hücre apoptozunun artması ve A<sub>2a</sub> reseptörlerinin ekspresyonunun azalması ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Kafein ve hiperoksinin kesilmesinin ardından akciğer bulgularının gerilediği belirtilmektedir (8). Adenosinin bilinen bir diğer özelliği ise endoplazmik retikulumda bulunan riyanodin reseptörlerine etki ederek hücre içine kalsiyum salınımı, dolayısıyla kontraksiyonda rolü olmasıdır. Deneysel çalışmalarda kafeinin alt özefagus sfinkter tonusu ile gastrointestinal sistem motilitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu kafein kaynaklı miyorelaksan etkinin yaştan bağımsız ve riyanodin reseptörleri aracılığıyla olduğu belirtilmektedir (14).

Kolonda adenosin A<sub>2b</sub> reseptörlerinin fazlaca bulunduğu belirtilmektedir (12). Kafein adenosin reseptör blokajı yaparak adenosinin antiinflamatuvar (13), antiapoptotik (8) ve prokinetik (14) etkilerini engellemektedir. Kafeinin vazokontrüksiyon yaparak intestinal kanlanmayı azalttığı da belirtilmektedir (17, 110).

Yakın tarihli bir çalışmada, 28-32 hafta arasındaki prematürelere, kafeinin 20 mg/kg yükleme dozundan sonra iki saat sonra süperiyor mezenterik arter kan akımının belirgin azaldığı, altı saat sonra düzeldiği, idame (5-10 mg/kg) dozundan sonra bu etkinin görülmediği belirtilmektedir. Araştırmacılar süperiyor mezenterik arter kan akımındaki belirgin azalmanın gastrointestinal sistemde hasara yol açabileceğini, dolayısıyla en azından bu 2 saatlik süreçte enteral beslenmenin kesilmesinin daha iyi olabileceğini belirtmektedir (17).

Sonuç olarak, bu deneysel çalışmayla kafeinin, yenidoğan ratlarda TNF- $\alpha$ , IL-6 ve OSİ'yi arttırarak NEK gelişimini kolaylaştırıcı bir rolünün olabileceği düşünülmektedir. Kafeinin NEK gelişimindeki kolaylaştırıcı rolü muhtemelen,



riyanodin reseptörleri aracılığıyla gastrointestinal motiliteyi azaltması, süperiyor mezenterik arter kan akımını azaltması ve belki de intestinal adenzin A<sub>2b</sub> reseptörleri üzerinden antiinflamatuar etkiyi azaltmasıyla ilişkili olabilir. Bu konuda geniş kapsamlı, kontrollü ve randomize çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## SONUÇLAR

1. Deneysel boyunca annelerinin yanında kalan ve anne sütü ile beslenen yavru ratların üç günlük izleminde, her bir grubun günlük vücut ağırlığı artışının olduğu ve gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı görüldü ( $p > 0.05$ ).

2. Histopatolojik incelemede kontrol grubundaki örneklerin hepsi normal olarak değerlendirilirken, en ağır hasarlanma kafein+H/R ve H/R gruplarında saptandı. Kafein+H/R ve H/R gruplarındaki histopatolojik hasarlanma kontrol grubuna göre ve kafein+H/R grubundaki histopatolojik hasarlanma kafein grubuna göre belirgin yüksekti ( $p:0,001$ ).

3. Kafein grubunun histopatolojik incelemesinde örneklerin hepsinde hidropik dejenerasyon saptanmakla birlikte, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ).

4. İmmunohistokimyasal incelemede, TLR4 yoğunluk ve yüzdesi değerlerinin çarpımı ile elde edilen final skorları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. TLR4 final skoru kafein+H/R ve H/R gruplarında en yüksekti ( $p>0,05$ ).

5. Bağırsak dokusu TNF- $\alpha$  düzeyi sırasıyla H/R ve kafein+H/R gruplarında en yüksek saptandı. Kafein, H/R, kafein+H/R gruplarında bağırsak doku TNF- $\alpha$  düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekken ( $p<0,001$ ), kafein grubu bağırsak TNF- $\alpha$  düzeyi H/R ve kafein+H/R gruplarına göre anlamlı düşüktü ( $p<0,05$ ).

6. Bağırsak dokusu IL-6 düzeyi sırasıyla H/R ve kafein+H/R gruplarında en yüksek saptandı. Kafein, H/R, kafein+H/R gruplarında bağırsak dokusu IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak anlamlı oranda yüksekken ( $p<0,001$ ), kafein grubu bağırsak IL-6 düzeyi H/R ve kafein+H/R gruplarına göre anlamlı düşüktü ( $p<0,05$ ).

7. Bağırsak dokusu TOS düzeyleri sırasıyla kafein+H/R ve H/R gruplarında en yüksek saptandı. Kafein, H/R, kafein+H/R bağırsak dokusu TOS düzeyleri kontrol

grubuna göre belirgin yüksekken ( $p<0,001$ ), kafein grubu bağırsak TOS düzeyi H/R ve kafein+H/R grubuna göre anlamlı düşüktü ( $p<0,01$ ).

8. Bağırsak dokusu TAS düzeyleri sırasıyla kafein+H/R ve kontrol grubunda en yüksek saptanmakla birlikte istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. ( $p>0,05$ )

9. Bağırsak OSİ düzeyleri sırasıyla kafein+H/R ve H/R gruplarında en yüksek saptandı. Kafein, H/R, kafein+H/R bağırsak dokusu OSİ düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı artmışken ( $p<0,05$ ), kafein grubu bağırsak OSİ düzeyi H/R ve kafein+H/R gruplarına göre belirgin düşüktü ( $p<0,01$ ).

## KAYNAKLAR

1. Berdon WE, Grossman H, Baker DH, Mizrahi A, Barlow O, Blanc WA. Necrotizing enterocolitis in the premature infant. *Radiology* 1964;83(5):879–87.
2. Caplan M. Neonatal Necrotizing enterocolitis. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. *Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine diseases of the fetus and infant*. 10th ed. St. Louis: Elsevier 2015; 1423–32.
3. Neu J, Mihatsch W. Recent developments in necrotizing enterocolitis. *J Parenter Enter Nutr* 2012;36(1suppl):30S–35S.
4. Emami CN, Petrosyan M, Giuliani S, Williams M, Hunter C, Prasadarao N V., et al. Role of the host defense system and intestinal microbial flora in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Surg Infect (Larchmt)* 2009;10(5):407–17.
5. Cho SX, Berger PJ, Nold-Petry CA, Nold MF. The immunological landscape in necrotising enterocolitis. *Expert Rev Mol Med* 2016;18:e12.
6. Sharma R, Tepas JJ, Hudak ML, Mollitt DL, Wludyka PS, Teng RJ, et al. Neonatal gut barrier and multiple organ failure: Role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2007;42(3):454–61.
7. Aydemir C, Dilli D, Uras N, Ulu HO, Oguz SS, Erdeve O, et al. Total oxidant status and oxidative stress are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2011;46(11):2096–100.
8. Dayanim S, Lopez B, Maisonet TM, Grewal S, Londhe VA. Caffeine induces alveolar apoptosis in the hyperoxia-exposed developing mouse lung. *Pediatr Res* 2014;75(3):395–402.
9. Arsan S, Korkmaz T.A, Doç T, Oğuz S. Türk Neonatoloji Derneği bronkopulmoner displazi korunma ve izlem rehberi 2018 güncellemesi. 2018;1-24.

10. Javid PJ, Riggle KM, Smith C. Necrotizing enterocolitis and short bowel syndrome. In: Gleason CA, Juul SE, eds. *Avery's diseases of the newborn*. 10th ed. Philadelphia: Elsevier 2016;1090–7.
11. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, et al. European Consensus - 2016 Update. *Neonatology* 2017;111(2):107–25.
12. Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* 1992;6(3):384–93.
13. Bazzichi L, Trincavelli L, Rossi A, De Feo F, Lucacchini A, Bombardieri S, et al. A 2B adenosine receptor activity is reduced in neutrophils from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2004;7(7):189–95.
14. Welsh C, Pan J, Belik J. Caffeine impairs gastrointestinal function in newborn rats. *Pediatr Res* 2015;78(1):24–8.
15. Park HW, Lim G, Chung S-H, Chung S, Kim KS, Kim S-N. Early caffeine use in very low birth weight infants and neonatal outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Korean Med Sci* 2015;30:1828–35.
16. Cox C, Hashem NG, Tebbs J, Bookstaver PB, Iskersky V. Evaluation of caffeine and the development of necrotizing enterocolitis. *J Neonatal Perinatal Med* 2015;8(4):339–47.
17. Abdel Wahed MA, Issa HM, Khafagy SM, Abdel Raouf SM. Effect of caffeine on superior mesenteric artery blood flow velocities in preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017;1–5.
18. Bhatia Jatinder. Strategies to prevent necrotising enterocolitis. *Chin Med J (Engl)* 2010;123(20):2759–65.
19. Claud E. Neonatal necrotizing enterocolitis – Inflammation and intestinal Immaturity. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2009;8(3):248–59.
20. Erdem G, Erdoğan-Bakar E, Yiğit Ş, Turanlı G. Hacettepe Üniversitesi

Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde izlenen prematüre bebeklerin nöro gelişimsel izlemi. *Çocuk Sağlığı ve Hast Derg* 2006;49:185–92.

21. Gülcan H, Üzüm İ, Aslan S, Yoloğlu S. İnönü Üniversitesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde izlenen çok düşük doğum ağırlıklı preterm olgularımızın değerlendirilmesi. *Turgut Özal Tıp Merk Derg* 2004;11(1):19–23.
22. Kavuncuoglu S, Aldemir EY, Celik N, Cetindag F, Sander S, Payasli M, et al. Necrotizing enterocolitis; an important morbidity in premature infants: Results of a 9 year study. *Jinekoloji Obstet Pediatr ve Pediatr Cerrahi Derg* 2013;5(1):13–20.
23. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006;368(9543):1271–83.
24. Patel RM, Kandefer S, Walsh MC, Bell EF, Carlo WA, Laptook AR, et al. Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. *N Engl J Med* 2015;372(4):331–40.
25. Lambert D, Christensen R, Henry E, Besner G, Baer V, Wiedmeier S, et al. Necrotizing enterocolitis in term neonates: data from a multihospital health-care system. *J Perinatol* 2007;27:437–43.
26. Maayan-Metzger A, Itzchak A, Mazkereth R, Kuint J. Necrotizing enterocolitis in full-term infants: Case-control study and review of the literature. *J Perinatol* 2004;24:494–9.
27. Sharma R, Hudak M, Tepas Iii J, Wludyka P, Marvin W, Bradshaw J, et al. Impact of gestational age on the clinical presentation and surgical outcome of necrotizing enterocolitis. *J Perinatol*. 2006;26:342–7.
28. Blakely ML, Lally KP, McDonald S, Brown RL, Barnhart DC, Ricketts RR, et al. Postoperative outcomes of extremely low birth-weight infants with necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation: A prospective cohort study by the NICHD Neonatal Research Network. *Ann Surg* 2005;241(6):984-9-94.
29. Salhab WA, Perlman JM, Silver L, Broyles BRS. Necrotizing enterocolitis

- and neurodevelopmental outcome in extremely low birth weight infants. *J Perinatol* 2004;24:534–40.
30. Hsueh W, Caplan MS, Qu X-W, Tan X-D, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: Clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003;6(1):6–23.
  31. Henry MC., Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2004;28(3):221–33.
  32. Neu J, Chen M, Beierle E. Intestinal innate immunity: How does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14(3):137–44.
  33. Sase M, Miwa I, Sumie M, Nakata M, Sugino N, Ross MG. Ontogeny of gastric emptying patterns in the human fetus. *J Matern Neonatal Med* 2005;17(3):213–7.
  34. Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR, Camerini V. Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2008;63:117–23.
  35. Kosloske A. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 1994;83(396):2–7.
  36. Chandler JC, Hebra A. Necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *Semin Pediatr Surg* 2000;9(2):63–72.
  37. Morriss FH, Moore M, Gibson T, West MS. Motility of the small intestine in preterm infants who later have necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;117(1):20–3.
  38. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: Nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Liver Physiol* 2000;279(5):851–7.
  39. Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *J*

- Parenter Enter Nutr 1999;23(5suppl):3–6.
40. Buisine MP, Devisme L, Savidge TC, Gespach C, Gosselin B, Porchet N, et al. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut* 1998;43(4):519–24.
  41. Otte JM, Kiehne K, Herzig KH. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol* 2003;38(8):717–26.
  42. Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20(2):82–8.
  43. Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21(2):147–51.
  44. Salzman NH, Polin RA, Harris MC, Ruchelli E, Hebra A, Zirin-Butler S, et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 1998;44(1):20–6.
  45. Liu Z, Li N, Neu J. Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta Paediatr* 2007;94(4):386–93.
  46. Collier-Hyams L, Neish A. Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1339–48.
  47. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000;289(5484):1560–3.
  48. Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14(3):145–51.
  49. Morowitz MJ, Poroyko V, Caplan M, Alverdy J, Liu DC. Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 2010;125(4):777–85.



50. Okogbule-Wonodi AC, Gross GW, Sun C-CJ, Agthe AG, Xiao L, Waites KB, et al. Necrotizing enterocolitis is associated with Ureaplasma colonization in preterm infants. *Pediatr Res* 2011;69(5):442–7.
51. Stewart C, Marrs E, Magorrian S, Nelson A, Lanyon C, Perry J, et al. The preterm gut microbiota: Changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. *Acta Paediatr* 2012;101(11):1121–7.
52. Peter CS, Feuerhahn M, Bohnhorst B, Schlaud M, Ziesing S, von der Hardt H, et al. Necrotising enterocolitis: Is there a relationship to specific pathogens? *Eur J Pediatr* 1999;158(1):67–70.
53. Martin CR, Walker WA. Probiotics: Role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008;32(2):127–37.
54. Caplan MS, Miller–Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999;117(3):577–83.
55. Akisu M, Baka M, Yalaz M, Huseyinov A, Kultursay N. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Eur J Pediatr Surg* 2003;13(5):319–23.
56. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evidence-Based: Child Heal A Cochrane Rev J* 2014;9(3):584–671.
57. Alexander VN, Northrup V, Bizzarro MJ. Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2011;159(3):392–7.
58. Cotten CM, Taylor S, Stoll B, Goldberg RN, Hansen NI, Sánchez PJ, et al. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2009;123(1):58–66.

59. Dittmar E, Beyer P, Fischer D, Schäfer V, Schoepe H, Bauer K, et al. Necrotizing enterocolitis of the neonate with *Clostridium perfringens*: Diagnosis, clinical course, and role of alpha toxin. *Eur J Pediatr* 2008;167(8):891–5.
60. Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, Bullitt E, Donahue J, Robinson N, et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 2008;153(3):339–44.
61. Goldman A, Olga PL. Anti-infectious and infectious agents in human milk. In: Olga PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee JR, eds. *Mucosal Immunology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press 1999;1511-21.
62. Fituch C, Palkowetz K, Goldman A, Schanler R. Concentrations of IL-10 in preterm human milk and in milk from mothers of infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 2007;93(11):1496–500.
63. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(1):219–26.
64. Chan K, Saing H, Yung R, Yeung Y, Tsoi N. A study of pre-antibiotic bacteriology in 125 patients with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 1994;83(396):45–8.
65. Henderson G, Craig S, Brocklehurst P, McGuire W. Enteral feeding regimens and necrotising enterocolitis in preterm infants: A multicentre case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009;94(2):120-3.
66. Meinzen-Derr J, Poindexter B, Wrage L, Morrow AL, Stoll B, Donovan EF. Role of human milk in extremely low birth weight infants risk of necrotizing enterocolitis or death. *J Perinatol* 2009;29(1):57–62.
67. Berseth CL. Feeding strategies and necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 2005;17(2):170–3.
68. Clark DA, Miller MJS. Intraluminal pathogenesis of necrotizing enterocolitis.

- J Pediatr 1990;117(1):S64–7.
69. Oddie SJ, Young L, McGuire W. Slow advancement of enteral feed volumes to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;8:CD001241.
  70. Morgan J, Young L, McGuire W. Delayed introduction of progressive enteral feeds to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;12:CD001970.
  71. Morgan J, Bombell S, McGuire W. Early trophic feeding versus enteral fasting for very preterm or very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;3:CD000504.
  72. Caplan M. Is EGF the holy grail for NEC? *J Pediatr* 2007;150(4):329–30.
  73. Frost BL, Jilling T, Caplan MS. The importance of pro-inflammatory signaling in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008;32(2):100–6.
  74. Zhou Y, Li Y, Zhou B, Chen K, Lyv Z, Huang D, et al. Inflammation and apoptosis. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23(1):44–56.
  75. Caplan MS, MacKendrick W. Inflammatory mediators and intestinal injury. *Clin Perinatol* 1994;21(2):235–46.
  76. Johnson L, Quinn GE, Abbasi S, Otis C, Goldstein D, Sacks L, et al. Effect of sustained pharmacologic vitamin E levels on incidence and severity of retinopathy of prematurity: A controlled clinical trial. *J Pediatr* 1989;114(5):827–38.
  77. Christensen RD. Association between red blood cell transfusions and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2011;158(3):349–50.
  78. Maheshwari A, Patel RM, Christensen RD. Anemia, red blood cell transfusions, and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2018;27(1):47–51.

79. Mohamed A, Shah PS. Transfusion associated necrotizing enterocolitis: A meta-analysis of observational data. *Pediatrics* 2012;129(3):529–40.
80. Stritzke AI, Smyth J, Synnes A, Lee SK, Shah PS. Transfusion-associated necrotising enterocolitis in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013;98(1):10-4.
81. Blau J, Calo JM, Dozor D, Sutton M, Alpan G, La Gamma EF. Transfusion-related acute gut injury: Necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates after packed red blood cell transfusion. *J Pediatr* 2011;158(3):403–9.
82. Book LS, Herbst JJ, Atherton SO, Jung AL. Necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants fed an elemental formula. *J Pediatr* 1975;87(4):602–5.
83. Guillet R. Association of H2-blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2006;117(2):137–42.
84. Carrion V, Egan EA. Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;11(3):317–23.
85. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, et al. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity for the caffeine for apnea of prematurity trial group. *N Engl J Med*. 2007;357:1935-7(18):1893–902.
86. Morag I, Goldman M, Kuint J, Heyman E. Excessive weight gain as a possible predictor of necrotizing enterocolitis in premature infants. *Isr Med Assoc J* 2007;9(1):24–7.
87. Yee WH, Soraisham AS, Shah VS, Aziz K, Yoon W, Lee SK, et al. Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Pediatrics* 2012;129(2):298-304.
88. Dominguez KM, Moss RL. Necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 2012;39(2):387–401.

89. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978;187(1):1–7.
90. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: Treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986;33(1):179–201.
91. Hutter JJ, Hathaway WE, Wayne ER. Hematologic abnormalities in severe neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1976;88(6):1026–31.
92. Wang YJ, Shian WJ, Chang WT, Chen HC, Chi CS. Clinical observation of neonatal gastrointestinal perforation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1994;53(4):215–9.
93. Kliegman RM. Neonatal necrotizing enterocolitis: implications for an infectious disease. *Pediatr Clin North Am.* 1979;26(2):327–44.
94. Oygür N. Nekrotizan enterokolit. In: Yurdakök M, Erdem G, eds. *Neonatoloji*. Ankara: Alp Ofset 2004:552–6.
95. Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003;8(6):449–59.
96. Kliegman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 1984;310(17):1093–103.
97. Yurdakök M. What next in necrotizing enterocolitis? *Turkish J Pediatr* 2008;50(1):1–11.
98. Hunter CJ, Podd B, Ford HR, Camerini V. Evidence vs experience in neonatal practices in necrotizing enterocolitis. *J Perinatol* 2008;28(1):9–13.
99. Bălănescu RN, Topor L, Drăgan GC. Clinical and Surgical Aspects in Necrotizing Enterocolitis. *Chirurgia* 2013;108(2):184–8.
100. Bohnhorst B, Müller S, Dördelmann M, Peter CS, Petersen C, Poets CF. Early feeding after necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr* 2003;143(4):484–7.

101. Rees CM, Eaton S, Kiely EM, Wade AM, McHugh K, Pierro A. Peritoneal drainage or laparotomy for neonatal bowel perforation? *Ann Surg* 2008;248(1):44–51.
102. Wu SF, Caplan M, Lin HC. Necrotizing enterocolitis: Old problem with new hope. *Pediatr Neonatol* 2012;53(3):158–63.
103. Bradshaw WT. Necrotizing enterocolitis. *J Perinat Neonatal Nurs* 2009;23(1):87–94.
104. Horwitz JR, Lally KP, Cheu HW, David Vazquez W, Grosfeld JL, Ziegler MM. Complications after surgical intervention for necrotizing enterocolitis: A multicenter review. *J Pediatr Surg* 1995;30(7):994–9.
105. Ricketts RR, Jerles ML. Neonatal necrotizing enterocolitis: Experience with 100 consecutive surgical patients. *World J Surg* 1990;14(5):600–5.
106. Picone S, Bedetta M, Paolillo P. Caffeine citrate: When and for how long. A literature review. *J Matern Neonatal Med* 2012;25(sup3):11–4.
107. Julien CA, Joseph V, Bairam A. Caffeine reduces apnea frequency and enhances ventilatory long-term facilitation in rat pups raised in chronic intermittent hypoxia. *Pediatr Res* 2010;68(2):105–11.
108. Chavez-Valdez R, Wills-Karp M, Ahlawat R, Cristofalo EA, Nathan A, Gauda EB. Caffeine modulates TNF- $\alpha$  production by cord blood monocytes: The role of adenosine receptors. *Pediatr Res* 2009;65(2):203–8.
109. Lu Q, Harrington EO, Newton J, Casserly B, Radin G, Warburton R, et al. Adenosine protected against pulmonary edema through transporter- and receptor A2-mediated endothelial barrier enhancement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298(6):755–67.
110. Hoecker C, Nelle M, Poeschl J, Beedgen B, Linderkamp O. Caffeine impairs cerebral and intestinal blood flow velocity in preterm infants. *Pediatrics* 2002;109(5):784–7.

111. Mohammed S, Nour I, Shabaan AE, Shouman B, Abdel-Hady H, Nasef N. High versus low-dose caffeine for apnea of prematurity: A randomized controlled trial. *Eur J Pediatr* 2015;174(7):949–56.
112. Natarajan G, Botica ML, Thomas R, Aranda JV. Therapeutic drug monitoring for caffeine in preterm neonates: An unnecessary exercise? *Pediatrics* 2007;119(5):936–40.
113. Steer P, Flenady V, Shearman A, Charles B, Gray PH, Henderson-Smart D, et al. High dose caffeine citrate for extubation of preterm infants: A randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89(6):499-503.
114. Tunc T, Aydemir G, Karaoglu A, Cekmez F, Kul M, Aydinöz S, et al. Toll-like receptor levels and caffeine responsiveness in rat pups during perinatal period. *Regul Pept* 2013;182:41–4.
115. Deliktaş M, Ergin H, Demiray A, Akça H, Özdemir ÖMA, Özdemir MB. Caffeine prevents bilirubin-induced cytotoxicity in cultured newborn rat astrocytes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018;1-7
116. Yossuck P, Kraszpulski M, Salm AK. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volume during brain development in the rat model. *Early Hum Dev* 2006;82(4):267–72.
117. Okur H, Küçükaydin M, Köse K, Konaş O, Doğan P, Kazez A. Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: The role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995;30(10):1416–9.
118. Ozkan KU, Ozokutan BH, Inanç F, Boran C, Kiliç M. Does maternal nicotine exposure during gestation increase the injury severity of small intestine in the newborn rats subjected to experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2005;40(3):484–8.
119. Sheyhidin I, Nabi G, Hasim A, Zhang RP, Ainiwaer J, Ma H, et al. Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous

- cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011;17(32):3745–51.
120. Fu H, Li C, Yang W, Gai X, Jia T, Lei Y, et al. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: Implications for tumor progression and escape. *Acta Histochem* 2013;115(2):151–7.
  121. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004;37(2):112–9.
  122. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38(12):1103–11.
  123. Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Aslan M, Celik H, Erel O. Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis* 2005;5(1):95.
  124. Boo NY, Cheah IG. Risk factors associated with necrotising enterocolitis in very low birth weight infants in Malaysian neonatal intensive care units. *Singapore Med J* 2012;53(12): 826-31.
  125. Siggers RH, Hackam DJ. The role of innate immune-stimulated epithelial apoptosis during gastrointestinal inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(22):3623–34.
  126. Touloukian RJ, Posch JN, Spencer R. The pathogenesis of ischemic gastroenterocolitis of the neonate: Selective gut mucosal ischemia in asphyxiated neonatal piglets. *J Pediatr Surg* 1972;7(2):194–205.
  127. Özdemir ÖMA, Ergin H, Yenisey Ç, Türk NŞ. Protective effects of ginkgo biloba extract in rats with hypoxia/reoxygenation–induced intestinal injury. *J Pediatr Surg* 2011;46(4):685–90.
  128. Özdemir ÖMA, Ergin H, Yenisey Ç, Türk NŞ, Şimşek NG. Protective effects of clarithromycin in rats with hypoxia/ reoxygenation-induced intestinal injury. *J Pediatr Surg* 2010;45:2169–74.
  129. Özdemir ÖMA, Gözkeser E, Bir F, Yenisey Ç. The effects of resveratrol on



- hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Pediatr Neonatol* 2014;55(5):352–7.
130. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):131–44.
  131. Chan KYY, Leung KT, Tam YH, Lam HS, Cheung HM, Ma TPY, et al. Genome-wide expression profiles of necrotizing enterocolitis versus spontaneous intestinal perforation in human intestinal tissues. *Ann Surg* 2014;260(6):1128–37.
  132. Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC, Cetin S, Li J, Branca MF, et al. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol* 2007;179(7):4808–20.
  133. He Y, Lawlor NT, Newburg DS. Human milk components modulate toll-like receptor-mediated inflammation. *Adv Nutr* 2016;7(1):102–11.
  134. Good M, Sodhi CP, Egan CE, Afrazi A, Jia H, Yamaguchi Y, et al. Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor. *Mucosal Immunol* 2015;8(5):1166–79.
  135. Caplan MS, Sun XM, Hseuh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;116(6):960–4.
  136. Baregamian N, Song J, Bailey CE, Papaconstantinou J, Evers BM, Chung DH. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 control reactive oxygen species release, mitochondrial autophagy and C-Jun N-Terminal Kinase/P38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2(5):297–306.
  137. Morecroft JA, Spitz L, Hamilton PA, Holmes SJ. Plasma interleukin-6 and tumour necrosis factor levels as predictors of disease severity and outcome in

- necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1994;29(0022–3468):798–800.
138. Sheng Q, Lv Z, Cai W, Song H, Qian L, Mu H, et al. Human  $\beta$ -defensin-3 promotes intestinal epithelial cell migration and reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 2014;76(3):269–79.
  139. Rentea RM, Welak SR, Fredrich K, Donohoe D, Pritchard KA, Oldham KT, et al. Early enteral stressors in newborns increase inflammatory cytokine expression in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *Eur J Pediatr Surg* 2013;23(1):39–47.
  140. Erdener D, Bakirtas F, Alkanat M, Mutaf I, Habif S, Bayindir O. Pentoxifylline does not prevent hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis. An experimental study. *Biol Neonate* 2004;86(1):29–33.
  141. Yurttutan S, Ozdemir R, Canpolat FE, Oncel MY, Unverdi HG, Uysal B, et al. Beneficial effects of Etanercept on experimental necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int.* 2014;30(1):71–7.
  142. Tayman C, Aydemir S, Yakut I, Serkant U, Ciftci A, Arslan E, et al. TNF- $\alpha$  blockade efficiently reduced severe intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *J Investig Surg* 2016;29(4):209–17.
  143. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res* 2014;2(4):288–94.
  144. Kilpinen S, Hulkkonen J, Wang XY, Hurme M. The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonates but not in adults. *Eur Cytokine Netw* 2001;12(1):62–8.
  145. Franklin AL, Said M, Cappiello CD, Gordish-Dressman H, Tatari-Calderone Z, Vukmanovic S, et al. Are immune modulating single nucleotide polymorphisms associated with necrotizing enterocolitis? *Sci Rep* 2016;5:18369.
  146. Ren Y, Lin CL, Li Z, Chen XY, Huang X, Lui V, et al. Up-regulation of

macrophage migration inhibitory factor in infants with acute neonatal necrotizing enterocolitis. *Histopathology* 2005;46(6):659–67.

147. Chan KYY, Leung FWL, Lam HS, Tam YH, To KF, Cheung HM, et al. Immunoregulatory protein profiles of necrotizing enterocolitis versus spontaneous intestinal perforation in preterm infants. *PLoS One*. 2012;7(5):36977.
148. Neu J. Necrotizing enterocolitis: The search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996;43(2):409–32.
149. Guven A, Tunc T, Topal T, Kul M, Korkmaz A, Gundogdu G, et al.  $\alpha$ -Lipoic acid and ebselen prevent ischemia/reperfusion injury in the rat intestine. *Surg Toda*. 2008;38(11):1029–35.
150. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Physiol* 2002;282(2):C227–41.
151. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn—a 30-year perspective. *Biol Neonate* 2005;88(3):228–36.
152. Perrone S, Tataranno ML, Santacroce A, Negro S, Buonocore G. The role of oxidative stress on necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Curr Pediatr Rev* 2014;10(3):202–7.