

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT'TE D-LAKTAT'IN TANISAL ROLÜ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayşe Betül ÖZTÜRK

KAYSERİ – 2017

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI
DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT'TE D-LAKTAT'IN TANISAL ROLÜ
Proje No: 6887

Proje Türü
Tez projesi, Tıpta Uzmanlık

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Adı Soyadı: Cüneyt TURAN
Birimi/Bölümü: Çocuk Cerrahisi

Araştırmacının Adı Soyadı: Ayşe Betül ÖZTÜRK
Birimi/Bölümü: Çocuk Cerrahisi

Şubat 2018
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu proje TTU-2016-6887 proje kodu ve 6887 ID numarası ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. AMAÇ	7
2.GİRİŞ	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
4. BULGULAR	12
5. TARTIŞMA	14
6. KAYNAKLAR	16

DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT'TE D-LAKTAT'IN TANISAL ROLÜ

ÖZET

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğan bebeklerde en sık karşılaşılan önemli akkiz gastrointestinal hastalık olup yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki hastaların %1-3' ünde görülmektedir (1). NEK insidansı ağırlığı 1000 g' ın altındaki bebeklerin yaşaması ile artmaktadır. Hastalık daha çok prematür bebekleri etkilemektedir. Bu hastalığa karşı en

hassas olanlar doğumda vücut ağırlığı 1000 g' ın altında ve doğum yaşı 28 gebelik haftasının altındaki bebeklerdir.

Tanının erken konulması ve hemen yoğun bir tedaviye başlanması yaşam şansını etkileyen en önemli faktördür (4). Cerrahi tedaviye hastaların %25-50' sinde ihtiyaç duyulmaktadır. NEK' te kesin cerrahi endikasyonlar gangren ve barsak perforasyonudur (3). İdeali gangren oluşup perforasyon meydana gelmeden ameliyata alınmasıdır. Ancak bu çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Ameliyatta nekroze olmuş barsak segmentleri rezeke edilerek uçlara ostomi yapılmaktadır. Ana prensip barsakların mümkün olduğunca az miktarda rezeke edilmesidir (7).

D-laktat kolonik bakteriler tarafından absorbe olmayan karbonhidratlardan üretilmektedir. D-laktat ileumda da birikebilmektedir (9). D-laktat memeliler tarafından metabolize edilemez ve vücuttan atılması renal ekskresyon ile olur (10). Kanda D-laktat tespit edilmesi, gastrointestinal sistemde bakteriyel proliferasyon olduğunun göstergesidir (11).

Erken tanı ve tedavi hayati öneme sahiptir. Erken dönemde NEK tanısı oldukça zor olmaktadır. Hastaların erken tanı alması için D-Laktat'ın biomarker olarak kullanılabileceği düşünülerek bu çalışmada H/R yöntemi ile NEK modeli oluşturulan ratlarda D-laktat seviyesinin öneminin gösterilmesi amaçlandı.

H/R yöntemi ile ratlarda NEK modeli oluşturuldu. Histopatolojik olarak çalışma grubundaki bütün ratlarda değişik derecelerde NEK geliştiği gösterildi. NEK modeli oluşturulan gruptan alınan doku örneklerinden ölçülen D-laktat seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu görüldü.

Deneysel NEK modelinde D-laktat seviyesinin yükseldiği ve tanısal değeri olabileceğini gösterildi.

Anahtar kelimeler: Nekrotizan Enterokolit, D-Laktat, Prematürite, Rat, Düşük doğum ağırlığı, hipoksi/reoksijenizasyon.

DIAGNOSTIC ROLE OF D-LACTATE IN A RAT MODEL OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS

ABSTRACT

Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common acquired gastrointestinal disease in neonates and occurs 1-3% in neonatal intensive care units (1). As babies under 1000g have a higher chance of survival, the incidence of NEC is increasing. The disease mostly affects premature babies. The most vulnerable to this disease are infants whose body weight at birth is below 1000 g and birth is below 28 weeks of gestation.

Diagnosis and immediate intensive care is the most important factor affecting the chances of survival (4). Surgery is necessary in 25-50% of patients. Surgical indications for NEC are gangrene and bowel perforation (3). It would be better to perform the surgery before the perforation. Resection of the necrotizing intestinal segments and ostomy is performed at the ends. The intestines should be resected as little as possible (7).

D-lactate is produced by colonic bacteria. D-lactate may also accumulate in the ileum (9). D-lactate cannot be metabolized by mammals and excretion is from the kidneys(10). D-lactate is indicative for bacterial proliferation (11).

The incidence of necrotizing enterocolitis (NEC) has increased with the increase in the survival rate of babies born prematurely. The diagnosis of NEC may be challenging. We think that D-lactate can be used as biomarker for early diagnosis of patients. In this study, we aimed to show the importance of D-lactate level in a rat model of necrotizing enterocolitis.

We used the H / R method to construct the NEC model in rats. We showed that different degrees of NEC developed in all rats in the study group. D-lactate levels of the NEC group was higher then the control group.

Elevated D-lactate levels detected in a rat model of NEC, and can be used in diagnosis of NEC, but it is not a spesific marker.

Key words: Necrotizing enterocolitis, D-lactate, Prematurity, Rat, Low birth weight, hypoxia/reoxygenization.

AMAÇ

Özellikle prematür olarak doğan bebeklerin yaşama oranının artmasıyla beraber nekrotizan enterokolitin (NEK) görülme sıklığında da artış olmuştur. Erken tanı ve tedavi hayati öneme

sahiptir. Erken dönemde NEK tanısı oldukça zor olmaktadır. Hastaların erken tanı alması için D-Laktat'ın biomarker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı yenidoğanlarda D-laktat düzeylerinin NEK'in erken tanısında öncü bir belirteç olup olmadığının belirlenmesidir.

GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğan bebeklerdeki en sık karşılaşılan önemli akkiz gastrointestinal hastalık olup yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki hastaların %1-3' ünde görülmektedir (1). NEK insidansı ağırlığı 1000 g' ın altındaki bebeklerin yaşaması ile artmaktadır. Hastalık daha çok prematür bebekleri etkilemektedir. Bu hastalığa karşı en hassas olanlar doğumda vücut ağırlığı 1000 g' ın altında ve doğum yaşı 28 gebelik haftasının altındaki bebeklerdir. Birçok çalışmada erkek ve kız bebeklerin eşit oranda etkilendikleri gösterilmiştir (2).

Yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşması ve yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki imkanların artması ile birlikte düşük doğum ağırlıklı ve/veya preterm bebeklerin sağkalım oranları artmıştır ve bu nedenle de NEK sıklığı da artmıştır.

Semptomlar bebeklerin %90' ında ilk 10 gün içerisinde ortaya çıkar (3-5). Hastalık doğumdan birkaç hafta, hatta ay sonra da ortaya çıkabilir. Prematüre bebeklere nazaran miadında doğmuş bebeklerde semptomlar daha erken ortaya çıkmaktadır. Belirtiler ne kadar erken ortaya çıkarsa komplikasyon ve mortalite oranı o kadar yüksek olmaktadır (6).

Çok sayıdaki klinik ve deneysel çalışmaya rağmen NEK patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Barsak kan akımını azaltan durumların, hipoksinin, prematür bebeğin barsak motilitesindeki bozukluğun ve immatür bir mukozal bariyere sahip olmasının, hiperosmolar beslenmenin ve bazı enfeksiyon ajanlarının sorumlu olduğu sanılır (5). Mekanizma nasıl olursa olsun, hastalık barsak duvarında dolaşım bozukluğu, nekroz ve bakteriyel invazyonla karakterizedir (7). Yapılan çalışmalarda olguların %86' sında ileum, %74' ünde kolon va daha az olarak da (%28) jejunumun tutulduğu bildirilmiştir (4). Hastaların %18-38' inde barsak duvarının tüm katmanları nekrozedir (8).

NEK'li hastaların %20-40'ında medikal tedaviye rağmen cerrahi müdahale gerekmektedir. Cerrahi girişimler sırasında ve sonrasında mortalite %50'dir. Cerrahi girişim sonrasında %25 vakada uzun dönemde yara yeri enfeksiyonu, batın içi abse ve ileus gelişebilmektedir. NEK nedeniyle opere edilen hastaların en ciddi ve uzun soluklu problemi ise kısa barsak sendromudur(20).

NEK'e bağlı ölüm oranları %15-30 arasında değişmektedir (16,18,19,20,22,24). Yenidoğan yoğum bakım ünitelerinde genel olarak yenidoğan ölüm oranları azalmıştır, ancak NEK'e bağlı ölüm oranlarında azalma sağlanamamıştır (16,19,24).

NEK ile sepsisin birlikteliği sık görülmektedir. Savunma mekanizmaları tam gelişmemiş olduğu için prematürlerde bakteriyel kolonizasyon, sepsis ve barsak mukozasında hasar sık görülmektedir (12).

Hayvan modellerinde hipoksik-iskemik hasar yoluyla NEK oluşturulmaktadır. NEK'te en çok suçlanan etiyolojik faktörlerden biri mukozal kan akımının bozulmasıdır. Bu durum mukozanın hipoksik kalması, hücrelerin hasar görmesi ve nekroz ile sonuçlanır (19).

Tanının erken konulması ve hemen yoğun bir tedaviye başlanması yaşam şansını etkileyen en önemli faktördür (4). Cerrahi tedaviye hastaların %25-50' sinde ihtiyaç duyulmaktadır. NEK' te kesin cerrahi endikasyonlar gangren ve barsak perforasyonudur (3). İdeali gangren oluşup perforasyon meydana gelmeden ameliyata alınmasıdır. Ancak bu çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Ameliyatta nekroze olmuş barsak segmentleri rezeke edilerek uçlara ostomi yapılmaktadır. Ana prensip barsakların mümkün olduğunca az miktarda rezeke edilmesidir (7).

D-laktat kolonik bakteriler tarafından absorbe olmayan karbonhidratlardan üretilmektedir. D-laktat ileumda da birikebilmektedir (9). D-laktat memeliler tarafından metabolize edilemez ve vücuttan atılması renal ekskresyon ile olur (10). Kanda ve diğer steril dokularda D-laktat tespit edilmesi, gastrointestinal sistemde bakteriyel proliferasyon olduğunun göstergesidir (11). Mesane ve idrar normal şartlarda steril kabul edilmektedir, D-laktat'ın ekskresonunun renal yolla olması nedeniyle idrar ve mesaneden alınan örneklerde D-laktat yüksekliğinin de gastrointestinal sistemde bakteriyel proliferasyonun ve dolayısı ile NEK'in öncü bir göstergesi olabileceği düşünüldü.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (EÜHADYEK) 13.04.2016 tarih ve 16/064 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğünün TTU-2016-6887 proje nolu kararı gereğince karşılanmıştır.

Normal şartlarda gebe kalan, gebelikleri normal seyreden ve gebelikleri sırasında hiçbir müdahale yapılmayan Wistar Albino cinsi ratların gebeliklerinin 21. gününde sağlık personeli gözetiminde matür doğum yapmaları sağlandı. Toplam 20 yenidoğan rat Kontrol ve çalışma grubu olarak ikiye ayrıldı, normal oda sıcaklığında, yan yana kafeslerde annelerinin yanlarında bırakılarak beslendi ve bakımları yapıldı. Yenidoğan ratların tamamı annelerini emerek beslenirken anne ratlar %21 protein içeren standart Pellet yem ile beslendi.

Çalışma Grupları

Kontrol grubu (grup 1; n:10): hiçbir müdahale yapılmadı.

Çalışma grubu (grup 2; n:10): herhangi bir ilaç uygulanmadı, doğumdan itibaren H/R yöntemi ile NEK modeli oluşturuldu.

Hipoksi/Reoksijenizasyon yöntemi ile NEK modeli oluşturma

Doğumdan sonra çalışma grubundaki ratlar aynı gün başlanarak hipoksi/reoksijenizasyona maruz bırakıldı. Kapalı bir ortamda 5 dakika süreyle %100 karbondioksite maruz bırakılan ratlar sonra 5 dakika buzdolabında +4 °Csoğuğa maruz bırakıldı, son olarak kapalı ortamda 5 dakika %100 oksijen verilen ratlar işlem tamamlandıktan sonra annelerinin yanına bırakıldı. Bu işlem doğumdan sonraki üç gün boyunca günde iki kere yapıldı. Hipoksi sonrası tüm ratların siyanotik oldukları, gasping yaptıkları ve dışkıladıkları görüldü. Çalışma grubundaki ratların tamamı hayatlarının dördüncü günü, H/R işleminden en az dört saat geçtikten sonra servikal dislokasyon yöntemi ile dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası 30 dakika içinde tüm yenidoğan ratların (çalışma ve kontrol grubu) terminal ileumlarından en az 2cm olacak şekilde rezeksiyon yapıldı. Alınan terminal ileum örnekleri histopatolojik inceleme için numaralanarak ayrıldı. Kalan barsak dokuları elisa testi için numaralanarak ayrıldıktan sonra

-80 °Csaklandı. Bütün ratların mesaneleri eksize edilerek numaralandırıldı ve -80 °C'de saklandı.

Histopatolojik değerlendirme

Doku takibi

Yenidoğan ratlar dekapite edilerek terminal ileum dokuları alınıp %10 formaldehit içerisine konuldu. Sonrasında dokular trimlendi ve %10 formaldehit içerisinde fikse olması için bekletildi. Tespitten sonra doku örnekleri artan alkol serilerinden geçirilip, ksilende şeffaflaştırma işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Yapılan bu işlemler Tablo 1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 1. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği

Sıra	**Yapılan işlem**	**Süre**	**Sıra**	**Yapılan işlem**	**Süre**
1	%4 Formaldehit	72 saat	**8**	%100 Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	2 saat	**9**	%100 Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	**10**	Ksilen 1	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	**11**	Ksilen 2	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	**12**	Ksilen 3	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	**13**	Eriyik parafin	2 saat
7	%100 Alkol	1 saat	**14**	Bloklama	

Masson Trikrom boyama

Parafin bloklardan alınan 5µm'lik kesitler düz lamlara alındı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler Masson trikrom boyama metodu (Tablo 2) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilenden geçirilerek incelendi.

Tablo 2. Masson trikrom boyama metodu

Sıra	**Yapılan İşlem**	**Süre**	**Sıra**	**Yapılan İşlem**	**Süre**	**Sıra**	**Yapılan İşlem**	**Süre**
1	Ksilen 1,2,3	10'ar dk	**8**	Hematoksilen	9 dk	**15**	kurutma	5 dk
2	%100 1,	5' er	**9**	Musluk suyu		**16**	Anilin	3 dk

	2	dk					blue	
3	%96	5 dk	**10**	Asit alkol		**17**	Distile su	
4	%80	5 dk	**11**	Musluk suyu		**18**	%1'lik Asetik asit	2 dk
5	%70	5 dk	**12**	Asit fuksin	20 saniye	**19**	%96 Alkol	1 dk
6	%50	5 dk	**13**	Distile su		**20**	%100 1,2	1'er dk
7	Musluk suyu		**14**	Fosfomolibdik asit	5 dk	**21**	Ksilen 1,2,3	10'ar dk

Elisa metodu

Deneklerdeki D laktat seviyesini belirlemek için dekapitasyon sonrası alınan ve -80 °C'ye kaldırılan intestine ve mesane dokularının buz üzerinde homojenizasyon ve arkasından +4°C'de 10000 rpm de 15 dakika santrifüjü ile elde edilen süpernatantları kullanıldı. ELİSA metodu üretici firmadan temin edilen kitin (Cat: K667-100; BioVision) protokolüne göre Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı. Sonuçlar ELİSA reader cihazı ile 450 nm de nmol/ µl olarak hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirme

Değerler uygulanan teste göre ortanca, U değeri ve p değeri olarak raporlandı. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı hesaplamak için non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hesaplamalar SPSS 21 yazılım programı kullanılarak yapıldı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde yapılmıştır. Doğumdan sonra çalışma grubundaki ratlar aynı gün başlanarak hipoksi/reoksijenizasyona maruz bırakıldı. Kapalı bir ortamda 5 dakika süreyle %100 karbondioksite maruz bırakılan ratlar sonra 5 dakika buzdolabında +4 °C soğuğa maruz bırakıldı, son olarak kapalı ortamda 5 dakika %100 oksijen verilen ratlar işlem tamamlandıktan sonra annelerinin yanına bırakıldı. Bu işlem doğumdan sonraki üç gün boyunca günde iki kere yapıldı. Hipoksi sonrası tüm ratların siyanotik oldukları, gasping yaptıkları ve dışkıladıkları görüldü. Çalışma grubundaki ratların tamamı hayatlarının

dördüncü günü, H/R işleminden en az dört saat geçtikten sonra servikal dislokasyon yöntemi ile dekapite edildi. Dekapitasyoon sonrası 30 dakika içinde tüm yenidoğan ratların (çalışma ve kontrol grubu) terminal ileumlarından en az 2cm olacak şekilde rezeksiyon yapıldı. Alınan terminal ileum örnekleri histopatolojik inceleme için numaralanarak ayrıldı. Kalan barsak dokuları elisa testi için numaralanarak ayrıldıktan sonra -80 °C'de saklandı. Bütün ratların mesaneleri eksize edilerek numaralandırıldı ve -80 °C saklandı.

Deney gruplarına ait olan barsak örneklerinin morfolojik değerlendirmesi için tüm gruplardan ışık mikroskobik fotoğraflar çekildi ve incelendi. Şekil 7, her grubun histolojik sonuçlarını göstermektedir. Kontrol grubunda intestinal histolojik görünüm ve mukozal bütünlük bozulmamış olarak gözlendi. Bu gruba ait olan tüm örneklerde villus yüzey epiteline çok sayıda goblet hücresi görüldü ve hiçbirinde bağırsak nekrozu yoktu. Bununla birlikte, NEC grubundaki sıçanlarda farklı derecelerde vakuolizasyon, epitel hücrelerinin şişmesi, villus kaybı ve nekroz gibi değişimler dikkati çekti. NEC grubunda 5 sıçana ait intestinal kesitte villus yapısı kaybı ve nekroz (ağır yaralanma), 3 sıçanda epitel ödemi ve vakuolizasyon (orta derecede yaralanma) vardı.

Deney boyunca annelerinin yanında kalan ve anne sütü ile beslenen çalışma ve kontrol grubundaki ratların histopatolojik incelemesi yapıldı. Kontrol grubunda intestinal histolojik görünüm ve mukozal bütünlük bozulmamış olarak gözlendi. Bu gruba ait olan tüm örneklerde villus yüzey epiteline çok sayıda goblet hücresi görüldü ve hiçbirinde barsak nekrozu yoktu. Diğer taraftan çalışma grubunda, NEC grubundaki sıçanlarda farklı derecelerde vakuolizasyon, epitel hücrelerinin şişmesi, villus kaybı ve nekroz gibi değişimler dikkati çekti. Başarılı bir NEK modeli oluşturulduğuna karar verildi.

Kontrol ve çalışma gruplarında D-laktat seviyesini belirlemek için dekapitasyon sonrası alınan ve -80 °C'ye kaldırılan intestine ve mesane dokularının buz üzerinde homojenizasyon ve arkasından +4°C'de 10000 rpm de 15 dakika santrifüjü ile elde edilen süpernatantları kullanıldı. ELİSA metodu ile yapılan çalışma sonrası, sonuçlar ELİSA reader cihazı ile 450 nm de nmol/ µl olarak hesaplandı. Çalışma gubunda D-laktat seviyesinin belirgin şekilde daha yüksek olduğu görüldü.

Tablo 3'te, kontrol ve çalışma grubundaki ratların barsak ve mesane örneklerinde yapılan elisa testi sonucu elde edilen D-laktat seviyeleri gösterildi. 4, 7, 8, 9 ve 10 numaraları

spesmenlerde yapılan histopatolojik incelemede ağır derecede NEK bulguları tespit edildi. 1 ve 6 numaralı spesmenlerin histopatolojik incelemesinde ise orta derecede NEK bulguları tespit edildi.

Tablo 3. D-laktat seviyeleri

Spesmen numarası	Grup 1 barsak	Grup 2 barsak	Grup 1 mesane	Grup 2 mesane
1	0,6111	6,0255	0,4572	5,7788
2	2,5364	6,7213	0,0987	5,5791
3	1,2932	6,7055	0,3551	5,4337
4	0,2558	6,7794	0,1653	5,6412
5	1,2457	6,7471	0,1997	5,6518
6	2,4135	7,2949	1,4705	5,6446
7	1,6127	7,9654	0,2557	7,3723
8	0,1106	6,9407	0,6428	6,1961
9	0,9861	7,5994	0,0987	7,9196
10	0,3876	7,0148	0,7008	7,3929

Ağır derecede NEK tespit edilen rat sayısı 5 iken, 3 ratta orta derecede NEK ve 2 ratta hafif derecede NEK olduğu histopatolojik olarak gösterildi. Çalışma grubunda D-laktat'ın kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü.

Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı hesaplamak için non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. U değeri 0,00 ve $p<0,001$ bulundu. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

Tablo 4. Tanımlayıcı istatistikler

	N	min	Max	Mean	Std. Sapma
Barsak NEK grubu	10	6,03	7,96	6,98	0,54
Barsak kontrol grubu	10	0,11	2,54	1,15	0,85
Mesane NEK grubu	10	5,43	7,91	6,26	0,93
Mesane kontrol grubu	10	0,16	1,47	0,62	0,42

Tablo 5. Mesane için D-laktat seviyelerinin ortanca, U değeri ve p değeri

	Mesane için D-laktat median değeri	U değeri	P değeri
Çalışma n:10 Kontrol n:10	5,71 0,56	0,00	<0,001

Tablo 6. Barsak için D-laktat seviyelerinin ortanca, U değeri ve p değeri

	Barsak için D-laktat median değeri	U değeri	P değeri
Çalışma n:10	6,86	0,00	<0,001
Kontrol n:10	1,11		

TARTIŞMA

Çok sayıdaki klinik ve deneysel çalışmaya rağmen NEK patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Barsak kan akımını azaltan durumların, hipoksinin, prematür bebeğin barsak motilitesindeki bozukluğun ve immatür bir mukozal bariyere sahip olmasının, hiperosmolar beslenmenin ve bazı enfeksiyon ajanlarının sorumlu olduğu sanılır (5). Mekanizma nasıl olursa olsun, hastalık barsak duvarında dolaşım bozukluğu, nekroz ve bakteriyel invazyonla karakterizedir (7).

Hayvan modelleri oluşturabilmek için hastalığın patogenezinde yer aldığı düşünülen faktörlerden yararlanılmaktadır. Hipoksi-reoksijenizasyon, NEK patogenezinde suçlanan ana faktörlerden biri olarak NEK modeli oluşturmak için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Literatür incelemesinde en sık tercih edilen yöntemin H/R yöntemi olduğu görülmektedir. Bu çalışmada NEK modeli oluşturmak için H/R yöntemi tercih edildi ve başarılı bir NEK modeli oluşturuldu.

Laboratuar yöntemleri ile erken tanı konulabilmesi için pekçok parametre ile ilgili çalışma yapılmıştır, ancak bu parametrelerin hastalığa spesifik olmadığı gösterilmiştir. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir ve NEK'in erken tanısında hastalığa spesifik bir parametreye duyulan ihtiyaç devam etmektedir.

Laktat memelilerde iki steroizomer şeklinde bulunur; D-laktat ve L-laktat. D-laktat memelilerde, total laktat seviyesinin %1-5'ini oluşturmaktadır. Fizyolojik koşullarda memelilerin hücrelerinde sadece L-laktat üretilmesine karşın bakteriler hem D-laktat hem de L-laktat üretebilmektedir. Memelilerin steril vücut sıvılarında D-laktat tespit edilmesi bakteri varlığına işaret eder (9-11).

D-laktat kolonik bakteriler tarafından absorbe olmayan karbonhidratlardan üretilmektedir. D-laktat ileumda da prolifere olabilmektedir (9). D-laktat memeliler tarafından metabolize edilemez ve vücuttan atılması renal ekskresyon ile olur (10). Kanda D-laktat tespit edilmesi, gastrointestinal sistemde bakteriyel overgrowth olduğunun göstergesidir (11). Aynı şekilde idrarda D-laktat tesbiti de buna işaret eder.

Memelilerde serum D-laktat değerleri oldukça düşükken iskemi esnasında barsak florasındaki mikroorganizmalar tarafından üretilen D-laktat, mukozal hasara bağlı olarak hızla dolaşıma geçer. İskemi normal savunma mekanizmalarını bozarak bakteriyel proliferasyona ve D-laktat yüksekliğine neden olur. Memelilerde D-laktat metabolize edecek sistem bulunmadığı için iskemi anında hızla D-laktat yükselir ve uzun süre yüksek seyreder (9-11).

Hipoksinin gastrointestinal sistem motilitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Hayvanlarda hipoksi oluşturularak yapılan çalışmalarla hipoksinin mide boşalmasını geciktirdiği ve gastrointestinal sistem kontraksiyonlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (79-81). Yapılan hayvan deneylerinde iskemiyi takiben reoksijenizasyon sonucu barsak nekrozu geliştiği görülmüştür (82).

NEK için hayvan modeli oluşturulurken etyolojiden sorumlu olduğu düşünülen faktörlerden faydalınılmaktadır. En fazla suçlanan faktörler arasında prematürite, hipoksi, formüla mama ile beslenme, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı ve enfeksiyon yer almaktadır. Bu faktörlerden faydalınılarak oluşturulan değişik modellerde histopatolojik ve biyokimyasal olarak NEK benzeri değişiklikler tespit edilmiştir (88-90).

NEK tanısında öncü bir gösterge olarak D-laktatın tanısal değeri olup olmadığını araştırıldığı bu çalışmanın sonucunda NEK modelinde çalışma grubunun kan ve idrarında (idrar ihtiva eden mesane dokusunda) istatistiksel olarak anlamlı D-laktat yüksekliği tespit edildi. Hastalığa spesifik olmasa da tanı koymada yol gösteren bir biomarker olarak D-laktat'ın kullanılabileceği gösterildi.

Sonuç olarak; NEK modeli oluşturulan ratlardan alınan doku örneklerinde D-laktatın istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunması, D-laktatın tanısal bir biomarker olabileceğini düşündürmektedir. NEK ile D-laktat arasındaki ilişkinin kesin olarak belirlenmesi ve D-laktatın tanısal rolü olup olmadığının gösterilmesi için, kesin NEK tanısı

almış hastalardan alınacak kan ve idrar örneklerinde D-laktat ölçümünün yapılacağı yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. N Engl J Med 2011;364:255-64.
2. Lin PW, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis. Lancet 2006; 368:1271-83.
3. Caty MG, Azizkahn RG. Necrotizing enterocolitis. In Ashcraft KE (ed): Pediatric Surgery. Philadelphia, WB Saunders Company, 2000, pp. 443-52.
4. **Touloukian RJ.** Neonatal necrotizing enterocolitis: an update on etiology, diagnosis, and treatment. **Surg Clin North Am.** 1976, 56(2):281-98.
5. Walsh MC, **Kliegman RM**. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. Pediatr Clin N Am **1986, 33(1):179-201.**
6. Stoll BJ, Kanto WP Jr, Glass RI, Nahmias AJ, Brann AW Jr. Epidemiology of necrotizing enterocolitis: a case control study. The Journal of Pediatrics **1980, 96(3):447-51.**
7. **Başaklar AC. Yenidoğanlarda Gastrointestinal kanama. Başaklar AC (ed): Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006, sf. 757-82.**
8. **Rowe** MI, **Reblock** KK, **Kurkchubasche** AG, Healey PJ. Necrotizing enterocolitis in the extremely low birth weight infant. J Ped Surg 1994, 29(8):987–91.
9. Lord RS, Bralley JA. Organic acids; products of dietary carbonhydrate. In: Laboratory evaluations for integrative and functional medicine, 2nd edition, 2008. Metametrix Institute, Duluth, Georgia, USA, pp 384-386.
10. Oh MS, Phelps KR, Traube M, et al. D-Lactic acidosis in a man with the short-bowel syndrome. NEJM 1979;301:249-252.
11. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ: D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. Medicine 1998;77:73-82.
12. Akisu M. Nekrotizan enterokolitten korunma stratejileri. Anne ve Bebek Sağlığı Vakfı II. Neonatoloji günleri program ve özet kitabı s.59-60, İstanbul, 2005.
13. Berdon WE, Grossman H, Baker DH, Mizrahi A, Barlow O, Blanc WA. Necrotizing enterocolitis in the premature infant. Radiology 1964;83:879-87.

14. Mizrahi A, Barlow O, Berdon W, Blanc WA, Silverman WA. Necrotizing enterocolitis in premature infants. J Pediatr 1965;66:697-705.

15. 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;187:1-7.

16. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. Pediatr Clin North Am 1986;33:179-201.

17. Noerr B. Current controversies in the understanding of necrotizing enterocolitis. Part 1. Adv Neonatal Care 2003;3:107-20.

18. Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. In: O'Neill Jr. JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG (Eds.). Pediatric surgery. 5 th ed. St. Louis: Mosby; 1998. p.1297- 320.

19. Stoll BJ, Win PJ. Necrotizing enterocolitis. Lancet 2006;368:1271-83.

20. Crissinger KD. Understanding necrotizing enterocolitis-promising directions. Pathophysiology 1999;5:247-56.

21. Chandler JC, Hebra A. Necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. Semin Pediatr Surg 2000;9:63-72.

22. Powis MR, Smith K, Rennie M, Halliday D, Pierro A. Characteristics of protein and energy metabolism in neonates with necrotizing enterocolitis--a pilot study. J Pediatr Surg 1999;34:5-10.

23. Molik KA, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, Engum SA, Grosfeld JL. Portal venous air: the poor prognosis persists. J Pediatr Surg 2001;36:1143-5.

24. Ewer AK. Role of platelet-activating factor in the pathophysiology of necrotizing enterocolitis. Acta Paediatr Suppl 2002;91:2-5.

25. Çetinkaya M, Köksal N. Nekrotizan enterokolit. Güncel Pediatri 2004;2:146-51.

26. Wilson R, del Portillo M, Schmidt E, Feldman RA, Kanto WP. Risk factors for necrotizing enterocolitis in infants weighing more than 2,000 grams at birth: a casecontrol study. Pediatrics 1983;71:19-22.

27. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. JAMA 2004;292(19):2357-65.

28. Henry CM, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. Semin Perinat 2004;28:221-33.

29. Neu J. Neonatal necrotizing enterocolitis: an update. Acta Paediatr Suppl 2005;94:1005.

30. Berseth CL. Gestational evolution of small intestine motility in preterm and term infants. J Pediatr 1989;115:646-51.

31. Berseth CL. Neonatal small intestinal motility: motor responses to feeding in term and preterm infants. J Pediatr 1990;117:777-82.

32. Jadcherla SR, Berseth CL. Effect of erythromycin on gastroduodenal contractile activity in developing neonates. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002;34:16-22.

33. Sase M, Lee JJ, Ross MG, Buchmiller-Crair TL. Effect of hypoxia on fetal rabbit gastrointestinal motility. J Surg Res 2001;99:347-51

34. Ross G. Escape of mesenteric vessels from adrenergic and nonadrenergic vasoconstriction. Am J Physiol 1971;221:1217-22.

35. Kosloske AM. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. Acta Paediatr Suppl 1994;396:2-7.

36. Beach RC, Menzies IS, Clayden GS, Scopes JW. Gastrointestinal permeability changes in the preterm neonate. Arch Dis Child 1982;57:141-5.

37. Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure.World J Surg 2002;26:806-11.

38. Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, Sonne B, Stewart D, Harada T et al. Gastric acid secretory function in preterm infants. J Pediatr 1985;106:467-71.

39. Kliegman RM. Experimental validation of neonatal feeding practices. Pediatrics 1999;103:492-3.

40. Hoy CM, Wood CM, Hawkey PM, Puntis JW. Duodenal microflora in very-low-birthweight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. J Clin Microbiol 2000;38(12):4539-47.

41. Claud EC, Savidge T, Walker WA. Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. Pediatr Res 2003;53:419-25.

42. Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(11):6043-8.

43. Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. Semin Pediatr Surg 2005;14:145-51.

44. Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. Pediatr Res 2004;55:622-9.

45. Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. Pediatr Clin North Am 1996;43:409-32.

46. Coit AK. Necrotizing enterocolitis. J Perinat Neonatal Nurs 1999;12:53-66.

47. Dolgin SE, Shlasko E, Levitt MA, Hong AR, Brillhart S, Rynkowski M et al. Alterations in respiratory status: early signs of severe necrotizing enterocoltis. J Pediatr Surg 1998;33:856-8.

48. Martin CR, Walker WA. Intestinal immune defences and the inflammatory response in necrotising enterocolitis. Semin Fetal Neonatal Med 2006;11:369-77.

49. Kliegman RM, Walker WA, Yolken RH. Necrotizing enterocolitis: research agenda for a disease of unknown etiology and pathogenesis. Pediatr Res 1993;34:701-8.

50. Anderson DM, Kliegman RM. The relationship of neonatal alimentation practices to the occurrence of endemic necrotizing enterocolitis. Am J Perinatol 1991;8:62-7.

51. Kliegman RM. Experimental validation of neonatal feeding practices. Pediatrics 1999;103:492-3.

52. Li N, DeMarco VG, West CM, Neu J. Glutamine supports recovery from loss of transepithelial resistance and increase of permeability induced by media change in Caco-2 cells. J Nutr Biochem 2003;14:401-8.

53. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte cocultures [abstract]. Gut 2000;47:79-87.

54. Neish AS. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. Microbes Infect 2002;4:309-17.

55. Lawrence G, Bates J, Gaul A. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. Lancet 1982;1:137-9.

56. Kosloske AM, Ulrich JA. A bacteriologic basis for the clinical presentations of necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 1980;15:558-64.

57. Blakey JL, Lubitz L, Campbell NT, Gillam GL, Bishop RF, Barnes GL. Enteric colonization in sporadic neonatal necrotizing enterocolitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1985;4:591-5.

58. Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. Curr Opin Infect Dis 2003;16:349-55.

59. Overturf GD, Marcy SM. Focal bacterial infections. In: Remington JS, Klein JO (Eds.). Infectious diseases of fetus and newborn infant. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p.1047-91.

60. Kosloske AM, Ball WS, Umland E, Skipper B. Clostridial necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 1985;20:155-9.

61. Kosloske AM. Necrotizing enterocolitis in the neonate. Surg Gynecol Obstet 1979;148:259-69.

62. Maalouf EF, Fagbemi A, Duggan PJ, Jayanthi S, Counsell SJ, Lewis HJ et al. Magnetic resonance imaging of intestinal necrosis in preterm infants. Pediatrics 2000;105:510-4.

63. Ververidis M, Kiely EM, Spitz L, Drake DP, Eaton S, Pierro A. The clinical significance of thrombocytopenia in neonates with necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 2001;36:799-803.

64. Acunas B, Vatansever U, Duran R, Aladag N. Çok düşük tartılı yenidoğanlarda nekrotizan enterokolit şiddetini öngörecek etmenlerin incelenmesi. Turk Ped Arş 2006;2:95-9.

65. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, de Luca A, Puopolo M, de Carolis MP et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. Eur J Pediatr 2001;160:345-50.

66. Kowalewska B, Turzyniecka M. Hyperglycemia in necrotizing enterocolitis. Abstracts for ISPAD'99 p55, April 1999. Warsaw, Poland.

67. Hall NJ, Peters M, Eaton S, Pierro A. Hyperglycemia is associated with increased morbidity and mortality rates in neonates with necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 2004;39:898-901.

68. Ricketts RR, Jerles ML. Neonatal necrotizing enterocolitis: experience with 100 consecutive surgical patients. World J Surg 1990;14:600-5.

69. Oygür N. Gastrointestinal Sistemin Gelişmesi. Yurdakök M, Erdem G (Editörler). Neonatoloji'de. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004. s.545-9.

70. Ricketts RR. Surgical treatment of necrotizing enterocolitis and the short bowel syndrome. Clin Perinatol 1994;21:365-87.

71. Egan EA, Nelson RM, Mantilla G, Eitzman DV. Additional experience with routine use of oral kanamycin prophylaxis for necrotizing enterocolitis in infants under 1,500 grams. J Pediatr 1977;90:331-2.

72. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. Lancet 1990; 336(8730):1519-23.

73. McGuire W, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review [abstract]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2003;88:11-4.

74. Coşkun T. Anne sütü ile beslenme, bazı yeni bulgular. Yurdakök M, Coşkun T (Editörler). Pediatri. Ankara: Güneş Kitapevi; 1995. s.538-9.

75. Lange H, Jackel R: usefulness of plasma lactate concentration in the diagnosis of acute abdominal disease.Eur J Surg 1994;160:381-384.

76. Murray MJ, Barbosa JJ, Cobb CF: Serum D(-)-lactate levels as a predictor of acute intestinal ischemia in a rat model. J Surg Res 1993;54:507-509.

77. Faingold R, Daneman A, Tomlinson G et al. Necrotizing Enterocolitis: Assessment of Bowel Viability with Color Doppler US Radiology 2005; 235: 587-594

78. Wilson R, Kanto WP Jr, McCarthy BJ, Burton T, Lewin P, Terry J, et al. Epidemiologic characteristics of necrotizing enterocolitis: a population-based study. Am J Epidemiol 1981;114:880-887.

79. Szabo JS, Stonestreet BS, Oh W. Effects of hypoxemia on gastrointestinal blood flow and gastric emptying in the newborn piglet. Pediatr Res 1985;9:466-471.

80. Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in

vitro. Dig Dis Sci 1997;42:878-884.

81. Hebra A, Brown MF, McGeehin K, Broussard D, Ross AJ. The effects of ischemia and reperfusion on intestinal motility. J Pediatr Surg 1993;28:362-365.

82. Hayashi S, Gleason WA, McFee AS, Park MK. Effects of pH alterations and hypoxia on isolated human intestine. Scand J Gastroenterol 1986;21:9-15.

83. Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episode of hypoxia or cold stres on the development of enterocolitis in an animal model. Surgery 1975;77:687-690.

84. Okur H, Küçükaydın M, Köse K, Kontaş 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;30:1416-1419.

85. Gibbs K, Lin J, Holzman R. Necrotizing Enterocolitis. Indian J Pediatr. 2007;74:67-72.

86. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. Acta Pediatr Suppl 1997;422:85-88.

87. Yossuck P, Kraszpulski M, Salm AK. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volüme during brain development in the rat model. Early Hum Dev 2006;82:267-272.

88. Biçakçi Ü, Tander B, Aritürk E, Aydin BK, Aydin O, Rizalar R, et al. Effects of omeprazole and gentamicin on the biochemical and histopathological alterations of the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. Pediatr Surg Int 2005;21:800-805.

89. Kazez A, Küçükaydın N, Küçükaydın M, Kontaş O, Okur H, Doğan P. A model of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis: the role of distension. J Pediatr Surg 1997;32:1466-1469.

90. Canpolat FE, Yurdakök M, Özsoy Ş, Hazıroğlu R, Korkmaz A. Protective effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in a rat model of necrotizing enterocolitis. Pediatr Surg Int 2006;22:719-723.

91. Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. Semin Pediatr Surg 2005;14:145-51.