

Deneyisel nekrotizan enterokolit modelinde intraabdominal karbondioksit ensüflasyonunun bağırsak üzerine etkisi

Şenol EMRE¹, Gonca TEKANT¹, Dildar KONUKOĞLU², Sinem FIRTINA², Sergülen DERVİŞOĞLU³, Günay CAN⁴, Cenk BÜYÜKÜNAL¹

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı, NEK'li yenidoğanlarda güvenle uygulanabilirliği bildirilen laparoskopinin, deneyisel bir modelde gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Kırk adet Sprague-Dawley yenidoğan sıçan onlu 4 gruba ayrılmıştır. K grubu, işlem yapılmayan kontrol; L grubu, işlem yapılmadan 4. gün 10 mmHg basınçta 30 dk. karbondioksit, 30 dk. desüflasyon yapılan; N grubu modifiye Okur yöntemiyle NEK oluşturulan; NP grubu ise N grubundaki işlemlere ek olarak 4. gün P grubundaki gibi pnömoperitoneum-desüflasyon oluşturulan gruplar olarak belirlenmiştir. Denekler 4. gün dekapitasyonla sakrifiye edilmiş ve terminal ileum rezeke edilerek histopatolojik değişiklikler ile nitrik oksit, glutatyon ve TBARS düzeyleri incelenmiştir. Biyokimyasal incelemelerin istatistiksel değerlendirilmesi için ANOVA ve Tukey HSD, histopatolojik sonuçlar için Mann Whitney-U ve Kruskal Wallis testleri kullanılmıştır.

Bulgular: TBARS değerleri karşılaştırıldığında, NP grubunun K ve P gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu, diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. NO değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. GSH değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun K, P ve N gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu, N grubunun K ve L grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, K ve P grupları arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. P, N ve NP gruplarının histopatolojik evreleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, bu grupların kendi aralarında bir farklılık saptanmamıştır.

Sonuç: Çalışmada, CO₂ pnömoperitoneumun NEK'teki doku hasarına ek bir olumsuz katkısı olmadığı gözlenmiştir. Deneyisel hayvan modeli üzerinde yaptığımız bu çalışmanın sonuçları, klinikte kullanılmaya başlanan NEK'te laparoskopik tanı uygulamasının güvenilirliğini destekler niteliktedir.

Anahtar kelimeler: Nekrotizan enterokolit, pnömoperiton, laparoskopi

Abstract

Effect of carbondioxide insufflation on bowel in an experimental NEC model

Aim: The aim of the study is to evaluate the effects of laparoscopy, which is reported to be safely applied in newborns with NEC, on the gastrointestinal tract in an animal model.

Material and Methods: Forty newborn Sprague-Dawley rats were divided into four different groups of ten. Group K was the control group with no intervention whereas Group P was subjected to pneumoperitoneum using carbon dioxide insufflation under 10 mmHg for 30 minutes followed by desufflation for 30 minutes on the fourth day of the study. Rats in Group N were NEC models established by the method described by Okur. Group NP was subjected to pneumoperitoneum-desufflation on the fourth day of the study as Group P in addition to the procedures applied on Group N. Subjects were decapitated on the fourth day and histopathological findings of the resected terminal ileum, and nitric oxide, glutathione and TBARS levels were investigated. Statistical evaluation of biochemical results were performed using ANOVA and Tukey HSD tests, whereas Mann Whitney-U and Kruskal-Wallis tests were used for the evaluation of histopathological results.

Results: TBARS levels were significantly higher in Group NP compared to Groups K and P. However, a significant difference was not determined between the other groups. NO levels were significantly higher in Group NP than in Group K. There was no significant difference between the other groups. When GSH levels were compared, Group NP was found to have significantly higher GSH levels than Groups K, P and N. While any significant difference was not found between Groups 1, and N. Additionally, GSH levels were significantly higher in Group N when compared with Groups K and P. Histopathological stages of Groups P, N and NP were found to be significantly higher, whereas no difference was observed among these groups.

Conclusion: In the study, we demonstrated that carbondioxide pneumoperitoneum does not have a negative contributing effect on the tissue damage seen in NEC. The results of this animal model study support the safety of diagnostic laparoscopy, a newly used method, in NEC.

Keywords: Necrotising enterocolitis, laparoscopy, pneumoperitoneum

Yazarların ORCID IDs bilgileri: Ş.E. 0000-0001-9526-7151

Alındığı tarih: 07.03.2018

Kabul tarihi: 29.03.2018

Yazışma adresi: Uzm. Dr. Şenol Emre, Kartaltepe Mah. İncirli Caddesi Kıbrıs Sok. No:12/8, Bakırköy - İstanbul - Türkiye

e-mail: senolemre@hotmail.com

Giriş

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğanlarda karşılaşılan en sık gastrointestinal (GI) sistem acillerinden biridir ⁽¹⁾. NEK, prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hastalığı olarak bilinir. Son kırk yılda yenidoğan yoğun bakım koşullarındaki teknolojik ilerleme ve deneyim artışı nedeniyle 1.000 gram ve altındaki bebeklerin yaşatılabilir hale gelmesi sonucu NEK sıklığında artış gözlenmiştir ^(2,3).

NEK'te, bebeklerin sıklıkla prematür ya da düşük doğum ağırlıklı ve bağırsıklık sistemleri yeterince gelişmemiş yenidoğanlar olması nedeniyle, olabildiğince az girişimsel yöntemlerle ve az bağırsak kaybı ile hastanın içinde bulunduğu durumdan kurtarılıp aşamalı olarak tedavi edilmesi güncel tedavinin esasını oluşturmaktadır ⁽¹⁾. Son yıllarda laparoskopik cerrahinin NEK'te kullanımı ile ilgili çok az sayıda klinik deneyim ve yayın bulunmaktadır ^(4,5).

Laparoskopik cerrahide uygulanan pnömoperitoneumun bağırsak üzerine etkileri konusunda deneysel ve klinik birçok çalışma yapılmış, bu çalışmalarda fizyolojik sınırlar içinde laparoskopi uygulanan deneklerde GI sistem üzerinde laparoskopinin olumsuz yan etkileri izlenmediği bildirilmiştir ⁽⁶⁾.

Bu çalışma, NEK'li yenidoğan bebeklerde güvenle uygulanabilirliği bildirilen laparoskopinin, bir deneysel modelde GI sistem üzerindeki etkilerini irdelemek amacıyla planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamız Cerrahpaşa Tıp Fak. Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 21 Mart 2006-6193 sayılı izni ile Cerrahpaşa Tıp Fak. Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda yaşları 0-1 saat arasında, ağırlıkları 3,4-5,6 g arasında değişen toplam 44 adet Sprague-Dawley soyundan yenidoğan sıçan denek kullanılmıştır. Deney süresi boyunca 2 adet yenidoğan sıçan annelerinin terk etmesi nedeniyle ortama adapte olamayarak ölmüştür. Diğer 2 denek ise 10 dk.'lık hipoksi süresine dayanamayarak ölmüştür. Geri kalan 40 yenidoğan sıçan 4 ayrı gruba ayrılmıştır.

Deneysel NEK modelinin oluşturulması:

Çalışmamızda kullanılan yenidoğan sıçanlarda NEK oluşturmak için modifiye Okur yöntemi kullanılmıştır ⁽⁶⁾. Bu amaçla yenidoğan sıçanlara doğumdan hemen sonra, önce kapalı bir kavanozda %100 CO₂ solutuldu (Resim 1). On dk. süren bu işlemin ilk dk.'larından itibaren gasping tipi solunum ve siyanoz geliştiği, son dk.'larda ise solunumun dışardan güçlükle izlenebilecek hale geldiği görüldü. Sonrasında kavanozun kapağı açılarak içindeki CO₂'nin boşalması sağlandıktan sonra +4°C soğukta 10 dk. bekletildiler. İleri derecede siyanoze ve apatik hale gelen sıçanlara bu defa kavanoz içinde 5 dk. %100 O₂ solutuldu. Siyanozu düzelen denekler daha sonra annelerinin yanına bırakıldı. Bu işlem 3 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere 2 defa yinelendi.



Resim 1. Hipoksi oluşturmak için kullanılan hava sızdırmaz düzenek.

Gruplar aşağıdaki şekilde belirlendi:

K grubu (kontrol grubu): Bu gruptaki yenidoğan sıçanlar her gün tartıldıktan sonra annelerinin yanına bırakıldı ve herhangi bir işlem yapılmadı.

P grubu (Pnömooperitoneum grubu): Bu gruptaki denekler tartıldıktan sonra annelerinin yanına bırakıldı. 4. gün pnömoperitoneum yapıldı.

N grubu (NEK grubu): Bu gruptaki yenidoğan sıçanlar 3 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde iki defa yukarıda söz edilen işleme tabi tutuldular.

NP grubu (NEK+Pnömooperitoneum grubu): Bu gruptaki yenidoğan sıçanlar 3 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde iki defa yukarıda söz edilen işleme tabi tutuldular. 4. gün pnömoperitoneum yapıldı.

Tüm gruplardaki denekler 4. gün dekapitasyonla sakrifiye edildi.

İntraabdominal CO₂ enfüflasyonu

Elli mg/kg intraperitoneal kethamine hydrochloride (Ketalar flk., Eczacıbaşı/Pfizer, Türkiye) ile yapılan anestezi sonrası, göbek kordonunun 0,5-1 cm üzerinden 24 gauge IV kanul (Ivflon, Venex International Ltd., Birmingham, UK) ile karın boşluğuna girildi (Resim 2). Aesculap Flow25 (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) ensüflatör ile 10 mmHg basınç, 1 ml/dk. akımda 30 dk. CO₂ enfüle edildi. Ciltaltına kaçak olursa kanülün girdiği delik 7/0 polyglactin 910 (Vicryl, Ethicon Inc., Johnson and Johnson Medical Products, New Jersey, USA) sütür ile kapatılarak hemen altından tekrar karın boşluğuna girildi ve sonrasında 30 dk. desüflasyon yapıldı.



Resim 2. Pnömo-peritoneum oluşturmak için karın boşluğuna girilmesi.

Çalışmamızda, pnömo-peritoneum oluşturmada teknik bir zorlukla ya da işlem sırasında bağırsak yaralanması, damar yaralanması gibi herhangi bir sorunla karşılaşmadık.

Denekler işlemden hemen sonra sakrifiye edildi. Orta hat kesisi ile karın boşluğuna girilip histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için terminal ileumdan 1,5-2 cm'lik biyopsiler alındı (Resim 3). Alınan biyopsi materyalinin yarısı biyokimyasal inceleme için ayrıldı. Serum fizyolojikle yıkanarak, üzerindeki kan ve diğer çevresel dokulardan ayrılan ileum parçası -80°C'lik derin dondurucuya kondu. Histopatolojik inceleme için ayrılan ileum parçası ise %10'luk formaldehit solusyonu içinde tespit edildi.



Resim 3. N grubundaki bir deneğin bağırsaklarının görünümü.

Biyokimyasal İnceleme:

Tüm dokular tartıldıktan sonra doku homojenatları 0,13 M KCL'de hazırlandı. Tüm analizlerde aynı homojenat kullanıldı.

a) TBARS (Tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler) analizi: Dokuda lipid peroksidasyonunun belirteci olarak TBARS (Tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler-Thiobarbituric acid reactive substances) miktarı Buege ve Aust yöntemi kullanılarak ölçüldü⁽⁷⁾. Bir hacim homojenat 2 hacim %15 (w/v) trikloroasetik asit, %0,375 (w/v) tiobarbitürik asit ve 0,25 M hidroklorik asit içeren reaktif ile karıştırıldı. Otuz dk. kaynar su banyosunda tutulduktan sonra 1000 devirde 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantın absorbanansı spektrofotometrede 535 nm'de okundu. TBARS konsantrasyonu molar absorbanans coefficienti (1,56 x 10⁵M-1cm-1) kullanılarak hesaplandı. TBARS için intra ve interassay cv sırasıyla %3 ve %4 olarak bulundu. Sonuçlar nmol /mg protein olarak ölçüldü.

b) Glutatyon (GSH) analizi: Dokudaki sülfidril bileşiklerini tayin eden Ellman yöntemi ile⁽⁸⁾ doku GSH düzeyleri saptandı. Homojenat önce metafosforik asit ile proteinsizleştirildi. Santrifüj sonrası elde

edilen süpernatant %40 (w/v) 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona sokuldu. Oluşan rengin absorbansı 412 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. GSH konsantrasyonu hesabı için molar absorbans coefficienti ($13,6 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol/mg}$ doku proteini olarak ölçüldü. GSH analizi için intra ve interassay cv sırasıyla %2,8 ve %3,5 bulundu.

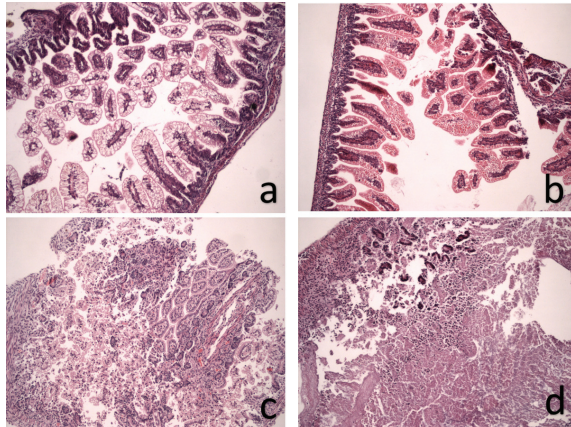
c) **Nitrik Oksit (NO) analizi:** Doku NO konsantrasyonu enzimatik kit (Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit, BioVision, Inc., California, USA) kullanılarak nitrit+nitrat olarak belirlendi⁽⁹⁾. Nitrat, nitrat redüktaz ile nitrite indirgendikten sonra nitrit konsantrasyonu 430 nm boyunda Griess ayracı ilavesi ile spektrofotometrik olarak saptandı. Hazırlanan nitrit ve nitrat standart grafiklerine göre sonuçlar değerlendirildi. NO için intra ve interassay coefficient variation sırasıyla %4 ve %5 olarak bulundu. Sonuçlar pmol/mg doku proteini olarak ölçüldü.

d) **Doku proteini tayini:** Protein konsantrasyonu Lowry ve ark.'nın⁽¹⁰⁾ yöntemi kullanılarak spektrofotometrik yöntemle saptandı.

Histopatolojik İnceleme:

İleoçekal valvin hemen proksimalinden alınan yaklaşık 1,5-2 santimetre uzunluğundaki terminal ileum segmenti %10'luk formaldehit solusyonu içinde oda ısısında tespit edildi. Tespit edilen dokular parafin bloklar haline getirildi. Bu bloklardan alınan 3-5 mikrometre kalınlığındaki doku kesitleri hematoxilen-eozin (H-E) boyasıyla boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi. Histopatolojik değerlendirme için bağırsaktaki morfolojik değişiklikler 0'dan 4'e kadar evrelendi. Buna göre:

➤ Evre 0: Normal ileum dokusu (Resim 4a),



Resim 4. a) Normal ileum dokusu. (H-E, x100), b) Evre 1 değişikliği. (H-E, x100), c) Evre 2 değişikliği. (H-E, x100), d) Evre 4 değişikliği (H-E, x100).

- Evre 1: Villus yüzey epitelinde dejeneratif değişiklik (Resim 4b),
- Evre 2: Fokal villus yüzey epiteli nekrozu (Resim 4c),
- Evre 3: Yaygın yüzey epiteli nekrozu, epitel bazal membranında ayrışma, villus düzensizliği
- Evre 4: Transmukozal/fokal transmural nekroz ve villus atrofisi (Resim 4d) olarak belirlendi.

İstatistiksel değerlendirme:

Biyokimyasal inceleme sonuçlarının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için ANOVA ve Tukey HSD testleri, histopatolojik sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi içinse Mann Whitney-U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı.

Bulgular

a) TBARS Sonuçları:

Kontrol grubunda (K grubu) TBARS düzeyi ortalama $2,01 \pm 0,37$ nmol/mg protein bulundu. P grubunda bu değer, ortalama $1,91 \pm 0,49$ nmol/mg protein, N grubunda ortalama $2,60 \pm 0,51$ nmol/mg protein, NP grubunda ise ortalama $3,21 \pm 0,88$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. TBARS değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun değerlerinin K ve P gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p < 0,001$), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Ortalama ve standart sapmalar Tablo 1'de özetlenmiş, TBARS düzeyleri farklılığı Şekil 1'de gösterilmiştir.

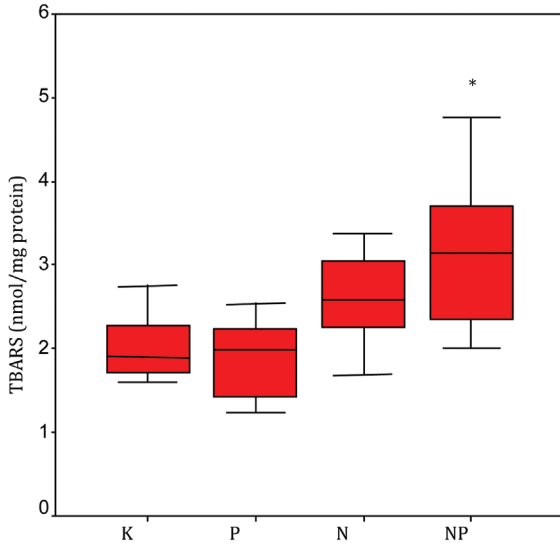
b) NO Sonuçları:

Kontrol grubunda (K grubu) NO düzeyi ortalama $93,20 \pm 14,77$ nmol/mg protein bulundu. P grubunda bu değer, ortalama $117,83 \pm 11,30$ nmol/mg protein, N grubunda ortalama $114,50 \pm 18,07$ nmol/mg protein, NP grubunda ise ortalama $132,10 \pm 29,40$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. NO değerleri karşı-

Tablo 1. Tüm gruplardaki TBARS düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları.

Gruplar	Ortalama (nmol/mg protein)	SS*	p
K Grubu	2,01	0,37	
P Grubu	1,91	0,49	
N Grubu	2,60	0,51	
NP Grubu	3,21	0,88	,001

*Standart sapma

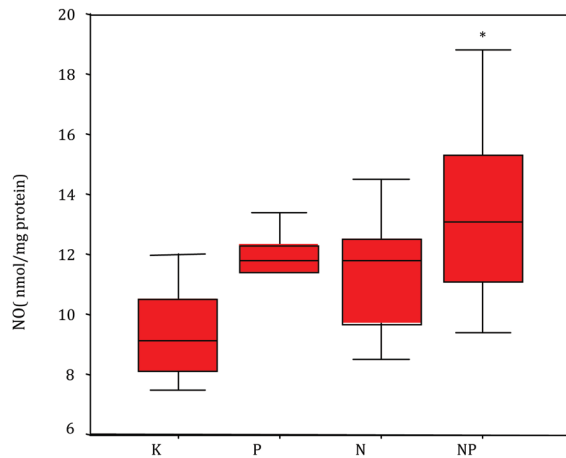


Şekil 1. Tüm gruplardaki TBARS değerlerinin farklılık tablosu.
*NP grubunun TBARS değerleri K ve P gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p<0,001$).

Tablo 2. Tüm gruplardaki NO düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları.

Gruplar	Ortalama (nmol/mg protein)	SS*	p
K Grubu	93,20	14,77	
P Grubu	117,83	11,30	
N Grubu	114,50	18,07	
NP Grubu	132,10	29,40	,001

*Standart sapma



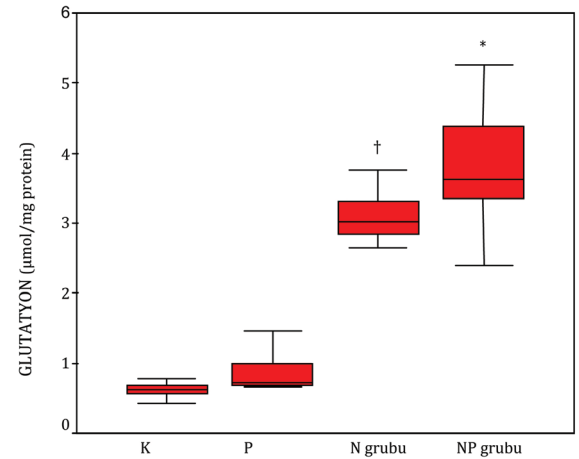
Şekil 2. Tüm gruplardaki NO değerlerinin farklılık tablosu.
*NP grubunun NO değerleri K grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p<0,001$).

laştırıldığında NP grubunun değerlerinin K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,001$), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı

Tablo 3. Tüm gruplardaki GSH düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları.

Gruplar	Ortalama ($\mu\text{mol/mg protein}$)	SS*	p
K Grubu	0,62	0,10	
P Grubu	0,88	0,31	
N Grubu	3,11	0,38	,001
NP Grubu	3,78	0,86	,001

*Standart sapma



Şekil 3. Tüm gruplardaki GSH değerlerinin farklılık tablosu.
*NP grubunun GSH değerleri K, P ve N gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p<0,001$).
†N grubunun GSH değerleri K ve P gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p<0,001$).

bulunmuştur. Ortalama ve standart sapmalar Tablo-2'de özetlenmiş, NO düzeyleri farklılığı Şekil 2'de gösterilmiştir.

c) GSH Sonuçları:

Kontrol grubunda (K grubu) GSH düzeyi ortalama $0,62\pm0,10 \mu\text{mol/mg protein}$ bulundu. P grubunda bu değer, ortalama $0,88\pm0,31 \mu\text{mol/mg protein}$, N grubunda ortalama $3,11\pm0,38 \mu\text{mol/mg protein}$, NP grubunda ise ortalama $3,78\pm0,86 \mu\text{mol/mg protein}$ olarak bulunmuştur. GSH değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun değerlerinin K, P ve N gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,001$), N grubunun değerlerinin de K ve P grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,001$), K ve P grupları arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. Ortalama ve standart sapmalar Tablo 3'te özetlenmiş, GSH düzeyleri farklılığı Şekil 3'te gösterilmiştir.

Histopatolojik değerlendirme sonuçları:

Işık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede, kontrol

grubunda Evre 1 değişiklik görülen bir denek dışında hiçbir denekte doku hasarı görülmedi. P grubunda ağırlıklı olarak Evre 2 değişiklik izlendi. İki denekte Evre 1 değişiklik görüldü. N grubunda da Evre 1 hasar görülen 2 denek dışındaki tüm deneklerde histopatolojik olarak Evre 2 değişiklikler görüldü. NP grubunda ise bir denekte Evre 4, diğer tüm deneklerde Evre 2 değişiklikler izlendi. Bu bulguların istatistiksel değerlendirmesi sonucunda P, N ve NP gruplarının histopatolojik doku hasarı evreleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Kontrol grubu dışındaki grupların kendi aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Doku hasarının histopatolojik evrelerinin gruplara göre dağılımı, ortalama ve standart sapmalar Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Doku hasarının histopatolojik evrelerinin gruplara göre dağılımı.

Gruplar	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4	Ort. (Evre)	SS	p
K Grubu	9	1	-	-	-	0,10	0,31	,001
P Grubu	-	2	8	-	-	1,80	0,42	
N Grubu	-	2	8	-	-	1,80	0,42	
NP Grubu	-	-	9	-	1	2,20	0,63	

*Standart sapma

Tartışma

NEK 1960'lı yıllarda yenidoğan yoğun bakım koşullarının düzelmesiyle birlikte sıklığı giderek artan ve bugün itibariyle yenidoğanlarda en sık cerrahi girişim gerektiren GI sistem patolojilerinden biridir ⁽¹⁾. Etiyolojide prematürite, iskemi ile oluşan bağırsak mukoza bariyer hasarı, bazı enfeksiyon ajanları, enteral beslenme ve bazı ilaçların etkili olduğu düşünülmektedir.

NEK oluşumunda ana faktörlerden biri olarak nitelenen iskeminin önemi klinik ve deneysel çalışmalarla desteklenmiştir. NEK etyopatogenezinde iskeminin önemli rol üstlendiğini öne sürenler NEK'li bebeklerin en az %80'inin zor doğumlar sonucunda dünyaya geldiğini belirtmişlerdir ⁽¹¹⁻¹³⁾. Barlow ve Santulli ⁽¹⁴⁾ yaptıkları çalışmada, hipoksi ve soğuk stresine maruz bırakılan yenidoğan sıçanlarda NEK geliştiğini göstermişlerdir. Okur ve ark. ⁽⁶⁾ 3 gün boyunca yenidoğan sıçanlarda önce 5 dk. %100 karbondioksit solutarak hipoksi, daha sonra 5 dk. %100 oksijen solutarak re-

oksijenasyon sağladıklarını, bunun sonucunda tüm deneklerin bağırsak kesitlerinde ışık mikroskobu ile rahatlıkla izlenebilen NEK'in karakteristik değişikliklerini oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Biz çalışmamızda, NEK modeli olarak Okur ve ark.'nın ⁽⁶⁾ yöntemini soğuk stresini ekleyerek ve hipoksi-reoksijenasyon süresini uzatarak uyguladık. Bu yöntemi bizden önce uygulamış olan Özkan ve ark.'dan ⁽¹⁵⁾ farklı olarak işlemleri 3 gün uygulayıp, sakrifikasyonu 4. gün gerçekleştirdik. Bu yöntemi yeğlememizin nedeni hipoksi ve soğuk stresine dayalı yöntemin bildirilmiş sonuçlarının doyurucu düzeyde olması, kolay uygulanabilir olması, tamamen anne bağımlı yenidoğan sıçanlarda formula mama ile oluşturulacak bir modelin ileri derecede uygulama gücü ve kişiye özgü uygulama hatalarına açık oluşudur. Çalışmamızda, histopatolojik incelemede, NEK gruplarındaki (N ve NP grupları) 20 denegin ikisinde Evre 1 (%10), 17'sinde Evre 2 (%85) ve birinde Evre 4 (%5) değişiklik görülmüştür. Bu bulgular kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NEK grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir. Özellikle N grubu ile K grubu arasındaki farklılık modelin tutarlılığını desteklemektedir.

Laparoskopide oluşturulan pnömoperitoneumun yan etkileri kullanılan gazın cinsine ve intraabdominal basınç artışına bağlıdır. Bu amaçla en sık kullanılan CO₂'nin intraperitoneal insüflasyonunun, diafragma yükselmesi ve vagal uyarı gibi lokal etkilerin yanı sıra hiperkarbi, asidoz ve kardiyak önyükte artma gibi sistemik etkilere yol açtığı bilinmektedir ^(5,16). Ayrıca CO₂'in kendisinin de diğer gazlara oranla daha fazla sistemik asidoz ve iskemik organ hasarına neden olduğu gösterilmiştir ⁽¹⁷⁾. İntraabdominal basınç artışının en önemli etkilerinden biri, ince bağırsakta iskemiye neden olan mezenterik arter kan akımındaki azalmadır. İntestinal mukoza, intestinal mukozal bariyer hasarına yol açan iskemiyle ilişkili çeşitli sistemik ve bölgesel faktörlere son derece hassastır. İnsanlarda yapılan klinik çalışmalarda ve hayvan deneylerinde, 10 mmHg'lık intraabdominal basıncın herhangi bir yan etkiye yol açmadığı, buna karşılık 15 mmHg'lık intraabdominal basıncın splanknik sistem ve parietal peritoneadaki kan akımını azalttığı bildirilmiştir ⁽¹⁸⁻²¹⁾. Kaya ve ark. ⁽²²⁾ erişkin tavşanlarda yaptıkları deneyde, 15 mmHg basınç ile oluşturulan pnömoperitoneum ile bağırsakta herhangi bir histopatolojik değişiklik ol-

madığını bildirmiştir. Artmış intrabdominal basıncın intestinal dokular üzerindeki etkisi yalnızca mekanik etkiye bağlı olmayıp, hümorale mekanizmalarla oluşan vazokonstriksiyona da bağlıdır⁽²³⁾. Jacobi ve ark. TNF α ve IL-10'un sıçanlardaki plazma düzeylerini 8 mmHg basınç ve 30 dk. süreyle uygulanan intraabdominal CO₂ veya Helyum insüflasyonundan sonra değerlendirmişler; Helyum ve kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, CO₂ grubunun TNF α plazma düzeylerini düşük, IL-10 düzeylerini yüksek bulmuşlardır⁽²⁴⁾. Sängör ve Gutt ise sıçanlarda 8 mmHg basınç ve 60 dakika süreyle uygulanan pnömoperitoneum sonrası NOS'un 3 izoformunun düzeylerini ölçmüşler, duodenum ve peritonda iNOS (NOS2) düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Bu artışın, laparotomi grubundaki kadar yüksek olmasa da gazsız laparoskopi grubuna göre belirgin derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir⁽²⁴⁾. Cevrioglu ve ark.⁽²⁵⁾ tarafından erişkin sıçanlarda yapılan bir çalışmada, bir gruba 60 dk. süreyle 15 mmHg basınçla intraabdominal CO₂ insüflasyonu, sonrasında 30 dk. desüflasyon yapılmış. Diğer bir gruba ise aynı sürelerde 10 mmHg basınçla insüflasyon, sonrasında desüflasyon yapılmıştır. Daha sonra eritrosit ve peritonda GSH düzeylerini incelemişlerdir. Eritrosit GSH düzeyleri açısından kontrol grubuyla diğer gruplar arasında fark saptayamadıklarını, doku GSH düzeylerinin ise 15 mmHg'lık grupta kontrol grubuna göre belirgin derecede azalmış olduğunu bildirmişlerdir.

Malondialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümü şeklinde belirtilir⁽²⁶⁾. Biz de çalışmamızda, lipid peroksidasyonunu belirlemek için TBARS değerlerini kullandık. Ünsal ve ark.⁽²⁷⁾ erişkin sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, artmış intraabdominal basıncın terminal ileumda yarattığı biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri araştırmışlar; 10 ve 20 mmHg basınç ve 60 dk. süreyle uygulanan CO₂ pnömoperitoneum ile doku MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış olduğunu, histopatolojik olarak da mukoza ve submukozada belirgin değişikliklerin oluştuğunu bildirmişlerdir. NEK'te laparoskopinin kullanımı ile ilgili deneyim

ve yayınlar az sayıdadır. Pierro ve ark.'nın⁽³⁾ NEK cerrahisinde yeni bir yaklaşımı bildirdikleri klinik çalışmalarında, NEK ön tanısıyla cerrahi girişim gerektiren 11 olguda laparoskopik eksplorasyon yapmışlardır. Pnömooperitoneum işlemi 15 mmHg basınç ve 2 l/dk. akım ile CO₂ kullanılarak oluşturulmuştur. 9 olguda NEK saptanan seride ortalama eksplorasyon süresinden bahsedilmemiştir.

NEK'li yenidoğan bebeklerde güvenle uygulanabilirliği bildirilen laparoskopinin, GI sistem üzerindeki etkilerini irdelemek amacıyla planladığımız çalışmamızda, bu tip bir eksplorasyonun en kısa süresinin 30 dk. civarında olacağını varsayarak insüflasyon süresini 30 dk. olarak belirledik. Yine İngilizce ve Türkçe literatürde yaptığımız araştırmada, yenidoğan sıçanlarda bildirilmiş bir pnömoperitoneum modeline rastlayamadık. Bunun üzerine hem yenidoğan bebeklerde kullandığımız hem de literatürde biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin meydana geldiği asgari basınç olarak bildirildiği için basıncı 10 mmHg olarak belirledik. Pnömooperitoneum oluşturmada, klinikte kullanımı genel kabul gören ve rutin olarak kullandığımız CO₂'i yeğledik.

Çalışmamızda, K grubunda beklenildiği gibi histopatolojik incelemede bir denek dışında normal, sağlıklı yapıda villuslar belirlenmiş ve tüm biyokimyasal değerler temel kabul edilmiştir.

N grubunda, doku TBARS ve NO düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir farklılık izlenmemiş, buna karşılık doku GSH düzeyleri ile doku hasarının histopatolojik evresi K grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

P grubunda, doku TBARS, NO ve glutatyon düzeylerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış izlenmemiştir. Ancak oluşan doku hasarının histopatolojik derecesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

NP grubunda, doku TBARS, NO ve glutatyon düzeyleri ile doku hasarının histopatolojik derecesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. NP grubunun değerleri P ve N grubuyla karşılaştırıldığında, glutatyon düzeyleri NP grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuş ancak doku NO düzeyleri ve doku hasarının histopatolojik derecesinde farklılık

saptanmamıştır. NP grubu ile diğer gruplar TBARS düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, NP grubunda P grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, N grubuna göre farklı bulunmamıştır.

P ve N grupları, kendi aralarında kıyaslandığında, N grubunun yalnızca doku glutasyon düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup, TBARS, NO ve doku hasarının histopatolojik dereceleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu bulgular ışığında, oluşturduğumuz NEK modeli irdelendiğinde oluşan histopatolojik değişiklikler yeterli düzeydedir. Doku NO ve TBARS düzeylerinde anlamlı değişiklik olmaması GSH düzeyindeki yükselişe bağlı olabilir. GSH, antioksidan savunma mekanizmasının oksidatif stresin belli bir düzeyin ötesine geçmesini engelleyerek bu sonuçların elde edilmesini sağlamış olabilir.

P grubunda NO, TBARS ve GSH düzeylerinde artış olmadan histopatolojik değişiklik izlenmesi, pnömoperitoneum oluşturmak için seçtiğimiz 10 mmHG basıncın yenidoğan sıçanların splanknik dolaşımını bozduğu ve bazı histolojik değişikliklere neden olduğu yönünde yorumlanabilir.

Çalışmanın zayıf yönleri: Çalışmamızda biyokimyasal değişiklikleri saptayabilmek için denekler işlemiden kısa süre sonra sakrifiye edildikleri için, histolojik değişikliklerin uzun dönemde kalıcı olup olmadığını değerlendirmek olası olmamıştır. Ayrıca pnömoperitoneum grubunda histopatolojik değişiklik izlenmesi, 10 mmHG basıncın yenidoğan sıçanların splanknik dolaşımını bozduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle yenidoğan sıçanlarda farklı basınç ve sürelerde pnömoperitoneumun etkilerinin araştırıldığı çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak, NP grubundaki NO ve TBARS düzeyleri ile histopatolojik hasar derecelerinin N grubuna göre farklı olmaması, GSH düzeylerinin ise anlamlı derecede yükselmiş olması CO₂ pnömoperitoneumun NEK'te oluşan doku hasarına herhangi bir olumsuz katkısı olmadığı yönünde değerlendirilmiştir. Bu nedenle çalışma NEK'li ve düşük doğum tartılı bebeklerde tanısal ve girişimsel laparoskopinin güvenli ve etkin bir yöntem olduğu konusundaki bulguları destekler niteliktedir.

Çıkar çatışması: Bu makalenin yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını bildirirler.

Kaynaklar

1. St. Peter SD, Ostlie DJ. Necrotizing enterocolitis. In: Ashcraft KW, Holcomb GW, Murphy JP (eds): Pediatric Surgery. 4th ed., Philadelphia, Elsevier Inc.; 2005, pp:461-476.
2. Wilson R, del Portillo M, Schmidt E, et al. Risk factors for necrotizing enterocolitis in infants weighing more than 2,000 grams at birth: a case-control study. Pediatrics. 1983;71(1):19-22.
3. Pierro A, Hall N, Ade-Ajayi A, et al. Laparoscopy assists surgical decision making in infants with necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 2004;39(6):902-6. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.02.006>
4. Pierro A. The surgical management of necrotising enterocolitis. Early Hum Dev. 2005;81(1):79-85. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2004.10.018>
5. Emir H, Akman M, Belce A, et al. Is intestinal ischemia a risk of laparoscopy? An experimental study in rabbits. Eur J Pediatr Surg. 2001;11(3):158-62. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15491>
6. Okur H, Kucukaydin M, Kose K, et al. 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. [https://doi.org/10.1016/0022-3468\(95\)90395-X](https://doi.org/10.1016/0022-3468(95)90395-X)
7. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978;52:302-10. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
8. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 1959;82(1):70-7. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
9. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. Methods Enzymol. 1996;268:237-46. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)68026-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)68026-4)
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):267-72.
11. Lloyd JR. The etiology of gastrointestinal perforations in the newborn. Pediatr Surg. 1969;4(1):77-84. [https://doi.org/10.1016/0022-3468\(69\)90186-9](https://doi.org/10.1016/0022-3468(69)90186-9)
12. Tan KL, Tan AY, Wong TT. Necrotizing enterocolitis in young infants: five examples. Clin Pediatr (Phila). 1972;11(1):44-8. <https://doi.org/10.1177/00092287201100114>
13. Santulli TV, Schullinger JN, Heird WC, et al. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. Pediatrics. 1975;55(3):376-87.
14. Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. Surgery. 1975;77(5):687-90.
15. Özkan KU, İnanç F, Kılınç M, et al. Leptin tedavisi yeni doğan rat incebarsağında hipoksi/reoksijenasyon hasarına karşı koruyucu mudur? Fırat Tıp Dergisi. 2005;10(1):5-9.
16. Jobe BA, Hunter JG. Minimally-invasive surgery. In: Brunnicardi FC, et al. (eds.): Schwartz's Principles of Surgery. 8th ed., New York, 2005: 379-401.

17. O'Malley C, Cunningham AJ. Physiologic changes during laparoscopy. *Anesthesiol Clin North America*. 2001;19(1):1-19.
[https://doi.org/10.1016/S0889-8537\(05\)70208-X](https://doi.org/10.1016/S0889-8537(05)70208-X)
18. Schilling MK, Redaelli C, Krahenbuhl L, et al. Splanchnic microcirculatory changes during CO₂ laparoscopy. *J Am Coll Surg*. 1997;184(4):378-82.
19. Ishizaki Y, Bandai Y, Shimomura K, et al. Safe intra-abdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery. *Surgery*. 1993;114(3):549-54.
20. Ishizaki Y, Bandai Y, Shimomura K, et al. Changes in splanchnic blood flow and cardiovascular effects following peritoneal insufflation of carbon dioxide. *Surg Endosc*. 1993;7(5):420-3.
<https://doi.org/10.1007/BF00311734>
21. Rasmussen IB, Berggren U, Arvidsson D, et al. Effects of pneumoperitoneum on splanchnic hemodynamics: an experimental study in pigs. *Eur J Surg*. 1995;161(11):819-26.
22. Kaya Y, Coskun T, Demir MA, et al. Abdominal insufflation-deflation injury in small intestine in rabbits. *Eur J Surg*. 2002;168(7):410-7.
<https://doi.org/10.1080/110241502320789104>
23. Viinamki O, Punnonen R. Vasopressin release during laparoscopy: role of increased intra-abdominal pressure. *Lancet*. 1982;1(8264):175-6.
24. Gutt CN, Kuntz C, Schmandra T, Wunsch A, et al. Metabolism and immunology in laparoscopy. First workshop on experimental laparoscopic surgery, Frankfurt, 1997. *Surg Endosc*. 1998;12(8):1096-8.
<https://doi.org/10.1007/s004649900790>
25. Cevrioglu AS, Yilmaz S, Koken T, et al. Comparison of the effects of low intra-abdominal pressure and ischaemic preconditioning on the generation of oxidative stress markers and inflammatory cytokines during laparoscopy in rats. *Hum Reprod*. 2004;19(9):2144-51.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deh380>
26. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. 2018. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>
27. Unsal MA, Imamoglu M, Kadioglu M, et al. The acute alterations in biochemistry, morphology, and contractility of rat-isolated terminal ileum via increased intra-abdominal pressure. *Pharmacol Res*. 2006;53(2):135-41.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.09.010>