



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**HİRSCHSPRUNG HASTALIĞINDA, BARSAK SEGMENTİNDE
NÖROGLOBİN, SİTOGLOBİN VE NÖROLİZİN'İN EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Javid ABDULLAYEV

Antalya, 2025



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**HİRSCHSPRUNG HASTALIĞINDA, BARSAK SEGMENTİNDE
NÖROGLOBİN, SİTOGLOBİN VE NÖROLİZİN'İN EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Javid ABDULLAYEV

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahman KARAMAN

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

**"Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2022-6148)"**

Antalya, 2025

TEŞEKKÜR

Beni eğitmek için harcadığı zaman ve çaba için daima minnettar olacağım, aynı zamanda tezimin başarılı bir şekilde hazırlanmasında vazgeçilmez emeği olan hocam Prof. Dr. Abdurrahman Karaman'a,

Cerrahi etiği ve bilimselliği her zaman ön planda tutan, başımız sıkıştığında ilk başvurduğumuz, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Güngör Karagüzel'e,

Eğitimimin yarısında bizden ayrılmış olsa da her zaman kişiliği ile yol gösteren, her zaman hasta doktor ilişkisinde örnek aldığım ve beni bu konuda daha farklı kılan hocam Prof. Dr. Mustafa Melikoğlu'na,

Öğrenmeyi eğlenceli kılan hem bilimsel hem de sosyal hayatımızda farklı düşünmemizi sağlayan hocam Dr. Öğr. Üyesi Cem Boneval'e,

Eğitim sürecimde bana farklı yaklaşımlarıyla örnek olan Öğr. Gör Dr. Kutay Bahadır'a

Tez süreci boyunca desteğini benden esirgemeyen, her gittiğimde güler yüzüyle bizi dinleyen Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Gülsüm Özlem ELPEK'e

Hem işimizi hem fikirlerimizi, aynı zamanda yorucu günlerin ardından sosyal hayatımızı paylaştığımız asistan arkadaşlarıma,

Çocuk cerrahinin eğitimi ve devamlılığında vazgeçilmez hizmetleri olan, her zor anımızda yanımızda olan tüm hemşire ve personel arkadaşlara

Ameliyathane yaşantısında bizleri daim destekleyen tüm ameliyathane ekibine

Yaptığımız işlerin belgeleme ve kayıtlarını sorunsuz olarak takip eden başta sekreter Arzu KARAKUŞ olmakla tüm sekreterlerimize

Tüm teşekkürlerin haricinde sözün yetersiz kaldığı, hayatımın her alanında beni ben yapan eğitip terbiye eden, her alanda var eden babam Şayar, annem Resmiye' ye

Eğitim döneminde ve bundan sonra da cerrahinin ailemden aldığı ilgi ve alakayı tamamlayan, hiçbir zaman bunu bana hissettirmeyen, sevgili eşim Leman'a, çocuklarım Halik, Esmer ve Zeyd'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Unuttuğım, yazmadığım ve benimle beraber mutlu olup, benimle üzülen
herkese sonsuz teşekkür ederim.

Saygılarımla.



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar VE ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Gastrointestinal Sistem	3
2.1.1 Embriyoloji.....	3
2.1.2 Anatomi.....	3
2.1.3. Fizyoloji.....	8
2.2. Enterik Sinir Sistemi	9
2.2.1. Tanımı.....	9
2.2.2. Embriyoloji.....	9
2.2.3. ESS'nin Genel Yapısı	13
2.3. Hirschsprung Hastalığı.....	14
2.3.1. Tanımı.....	14
2.3.2 Tarihçesi.....	15
2.3.3 Epidemiyolojisi.....	15
2.3.4. Etiyopatogenezi.....	16
2.3.5. Klinik.....	18
2.3.6. Tanı.....	19
2.3.7. Tedavi.....	20
2.4. Nğb, Cygb ve Nln'nin Genel Bilgileri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Hasta Seçimi.....	25
3.2. Gruplar	26
3.3. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	26
3.4. İmmünohistokimyasal İnceleme	26
3.5. İmmunhistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi	29
3.6. İstatistiksel Analizler.....	29
4. BULGULAR	30

5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	44
7. ÖZET.....	45
8. ABSTRACT	47
9. KAYNAKLAR	49
10. EKLER.....	54



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Cygb	Sitogloblin
ESS	Enterik Sinir Sistemi
GDNF	Glial Hücre Hattından Türetilen Nörotrofik Faktör
GİS	Gastrointestinal Sistem
HH	Hirschsprung Hastalığı
HİEK	Hirschsprung ilişkili enterokolit
İPAN	İntrinsik Primer Afferent Nöronlar
KM	Konjenital Megakolon
M	Musculus/Muscle
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
Ngb	Nöroglobin
Nln	Nörolizin
PSS	Periferik Sinir Sistemi
RAIR	Rektoanal İnhibitör Refleks
TKA	Total Kolonik Aganglionezis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Anorektal bölge anatomisi	7
Şekil 2.2. Enterik nöral krest hücrelerinin göçü.....	10
Şekil 2.3. Fare gastrointestinal sisteminde enterik nöral krest (NC) türevi hücrelerin kolonizasyonu	11
Şekil 2.4. ESS'deki nöron tipleri	12
Şekil 2.5. Enterik sinir sisteminin genel organizasyonu.	14
Şekil 2.6. HH da tutulan segmentlerin oranı.	18
Şekil 2.7. Ngb'nin görünümü	22
Şekil 2.8. Cygb'nin görünümü	23
Şekil 2.9. Nln'nin görünümü	24
Şekil 3.1. Antikorların pozitif kontrol dokularında boyanması.	27
Şekil 4.1. Ngb'nin immünohistokimyasal boyanması.	32
Şekil 4.2. Ngb'nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.	33
Şekil 4.3. Ngb'nin ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.	34
Şekil 4.4. Cygb'nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.	36
Şekil 4.5. Cygb'nin immünohistokimyasal boyanması	38
Şekil 4.6. Cygb'nin aganglionik zon ve ganglionik zon gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.	39

TABLolar VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. HH’da etkili genlerin fonksiyonu.	17
Tablo 4.1. Ngb’nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin karşılaştırılması.	30
Tablo 4.2. Ngb’nin ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarının boyanma şiddetinin karşılaştırılması.	34
Tablo 4.3. Cygb’nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin karşılaştırılması.	35
Tablo 4.4. Cygb’nin ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarında boyanmanın şiddetinin karşılaştırılması.	37



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hirschsprung hastalığı (HH), distal barsağın miyenterik ve submukozal pleksuslarında ganglion hücrelerinin yokluğu ile karakterize olan enterik sinir sisteminin (ESS) gelişimsel bir bozukluğudur. Etiyolojisi heterojen olsa da günümüzde bilinen en önemli mekanizma nöral krest hücrelerinin, kranialden kaudale göçünün bozulması ya da matürasyonu ile ilgili süreçte oluşan sorunlardır (1). Etkilenen alana göre farklı ölçülerde hastalıklı barsak segmentleri görülebilir (2). HH da aganglionik segment %80 oranında anüsten rektosigmoid kolona kadar, %15-20 oranında anüsten sigmoid kolonun proksimaline kadar uzayabilir ki, buna da uzun segment HH denir. HH'nın yaklaşık olarak %5'inde tüm kalın barsak tutulmuştur ve buna da total kolonik agangliyozis denir. Klinik olarak barsağın aganglionik kısmı gevşeyemez ve hastada barsak tıkanıklığı semptomları görülür (3). HH için en tipik ve en erken belirti doğumdan sonra mekonyumun 24–48 saatten daha geç çıkarılmasıdır. Hastaların %80'i klasik distal barsak tıkanıklığı tablosu ile yenidoğan döneminde tanı alır (4). Hastalığın tanısında altın standart rektal biyopsidir (4). HH tek veya çok aşamalı cerrahi teknikler kullanılarak tedavi edilir (5).

Çok sayıda etiyolojik çalışma yapılmasına rağmen, HH'nda iskemik hasara bağlı ganglion yetersizliği veya bu durumun etiyolojiye yansımaları bilinmemektedir. Nöroglobin (Ngb), Sitogloblin (Cygb) ve Nörolizin (Nln) hücre düzeyinde iskemik hasarı gösteren peptidazlardır (6–8).

Ngb adından da anlaşılacağı gibi, ağırlıklı olarak merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemlerinin (PSS) nöronlarında daha fazla eksprese olur. Ngb hipoksik hasarlar üzerine bir gaz sensörü işleviyle uyumlu biyokimyasal karakterizasyonuna sahip monomerik hekza koordinat yapısında 17 kDa'lık bir oksijen bağlayıcı hem proteindir. MSS'de, PSS'de ve diğer birçok dokuda eksprese olur: hücresel düzeyde, esas olarak da sitozolde, mitokondrinin iç duvarında ve çekirdeklerde yer alır. Ngb'nin iskemik hasardan sonraki nöroprotektif etkisi iyi belgelenmiş olmasına rağmen, bu rolün altında yatan mekanizmalar henüz iyi bilinmemektedir (7,9,10).

Cygb son on yılda, memelilerde bulunan dördüncü globin tipi olarak keşfedildi; Ağırlıklı olarak fibroblastlarda, düz kaslarda, farklı organ ve dokulardaki ilgili hücre tiplerinde miyogloblin ve hemogloblin ile yapısal benzerliğe sahip olduğundan ve hipoksi üzerine dokularda yüksek düzeyde tespit edildiğinden oksijenin difüzyonunu ve algılamasını kolaylaştırmada, NO dioksijenasyonunda veya oksidatif strese karşı korumada rol oynayabileceği öne sürülmüştür (6).

Nln Frederic Checler ve meslektaşları tarafından keşfedilen ve ayrıntılı olarak incelenen M3 peptidaz ailesine ait bir monomerik çinko endopeptidazdır. Vücutta bol miktarda bulunmasına rağmen, Nln beyin hücrelerinin sitozol ve mitokondrilerinde yüksek oranda sentezlenir ve hücre tipine bağlı olarak plazma membranında da bulunur. Çalışmalar göstermiştir ki Nln iskemik inmenin patogenezi ile dikkate değer şekilde ilişkilidir ve iskemik inme sonrası dokuda artışı saptanan endopeptidazdır (8).

Literatürde Ngb, Cygb ve Nln'nin HH'nin etiyolojideki yerine dair çalışma bulunmamaktadır. HH hastalığı nedeni ile opere olan olgulardan alınan aganglionik ve ganglionik barsak segmentleri ile birlikte HH hastalığı, iskemik barsak hasarı saptanmamış ancak barsak rezeksiyonu yapılmış olgulardan alınan normal barsak segmentlerindeki Ngb, Cygb ve Nln düzeyinin değerlendirilmesinin HH etyopatogenezinin belirgin katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz. Oluşabilecek farklılığın ortaya koyulması ileride yeni tanı yöntemleri geliştirilmesi için zemin hazırlayabilir. Çalışmamızda bu peptidazların HH'nin barsak segmentlerindeki ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi ve literatüre yeni katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gastrointestinal Sistem

2.1.1 Embriyoloji

Vücuttaki tüm organ ve sistemler arasında, gastrointestinal sistem, her biri farklı işlevlere sahip olan, yapılarının sayısı ve kullanılan sinyal moleküllerinin çeşitliliği nedeniyle çok karmaşık bir yapıdır. Gıdaların sindirimi, besin maddelerinin, elektrolitlerin ve suyun emilimi, büyük ve çeşitli bir mikrobiyota içeren lümeninde gerçekleşir (11,12). Gastrointestinal sistem (GİS), en geniş yüzey alanı ile ağızda başlayıp anüste sonlanan ve her 3 germ yaprağından köken almış bir sistemdir (13).

Gelişimin 4. haftasında embriyo uzar ve yumurta kesesi embriyo içi ve embriyo dışı bölgelere ayrılır (14,15). Sindirim borusunun kökeni embriyo içi bölgede meydana gelir, embriyo dışı kısmın gerilemesi ve kaybolması 12. hafta civarında gerçekleşir. Bu sırada sindirim sistemi ön barsak, orta barsak ve arka barsak olarak ayrılır (14,15).

Endoderm- barsak mukozasının epitelini, mezoderm- kas tabakasını ve lamina propriayı oluştururken, ektoderm- nöral krest hücrelerinden gelişen enterik sinir sistemini oluşturur (16).

Bu sistemin gelişiminde 2 önemli adım vardır: barsak tüpünün oluşumu (gastrulasyon) ve özel hücre grupları ile bireysel organların gelişimi (17). Barsakların oluşum süreci ve emilim şekli 32. haftada yetişkine benzer şekilde tamamlanır (18).

2.1.2 Anatomi

i. Özofagus- Birincil işlevi, yiyecekleri ağızdan mideye taşımaktır. Ön barsağın sürekli gelişimi sonucu oluşmaktadır. Özofagus, yetişkinde yaklaşık 23-25 cm uzunluğundadır. Proksimal ve distal uçlarının her birinde sfinkter bulunmaktadır. Bu yapılar mukoza ile kaplı bir lümen, bağ dokusu ve düz kas dış bileşimine sahiptir (14,15). Üç anatomik segmente ayrılır: servikal, torakal ve abdominal. Özofagus

duvarı içten dışa doğru mukoza, submukoza, muskularis propria ve adventisya tabakalarından oluşmuştur. Özofagusun yalnızca periton boşluğundaki kısmında seroza bulunur (15).

ii. Mide- orta hattın solunda ve üst karın bölgesinin ortasında yer alan, aynı zamanda sindirim sisteminin en genişlemiş kısmıdır (19). Mide, gelişimin 4. haftasında belirir, hızlı özofageal uzama nedeniyle 12. haftada C2'den T11 vertebral seviyesine iner. Büyümenin 7. haftasında mide, uzunlamasına eksen etrafında saat yönünde 90° döner ve sağ tarafın arkaya, sol tarafın ise öne dönmesine neden olur. Bundan dolayı sinirlerde de aynı pozisyonel değişiklikler olur: sağ vagus siniri arka duvara, sol vagus siniri soldan ön duvara hareket eder. Gelişmekte olan mide 8. haftada anteroposterior eksen etrafında saat yönünde rotasyona uğrar ve pilor bölgesini sağa doğru yukarı, kardiyak kısmı ise sola doğru aşağı çeker (15,19). Mide, intraperitoneal bir organdır (15). Mukoza, submukoza, muskularis eksterna ve serozası mevcut olup, 4 ana bölgeden oluşur: kardial, fundus, korpus ve pilor (19). En önemli arteri sol gastrik arterdir (15,19). Zengin kan dolaşımına sahip ve oldukça hareketli aynı zamanda esnek bir organdır. Bu organ, yüksek metabolik hızlarda çalışan farklı hücre tiplerine ve sindirimin 2. aşaması için hızlı peristalsizm dalgalarını kolaylaştırmak için çoklu kas katmanlarına sahiptir (19).

GİS vasküler beslenmeye göre üç bölüme ayrılır. Çölyak arteri tarafından beslenen ön barsak (foregut); özofagus, mide, duodenumun bir kısmı ve safra yollarından oluşur. Superior mezenterik arter tarafından beslenen orta barsak (midgut); ince barsaklar ve splenik fleksuraya kadar kalın barsağı içerir. Sonuncu arka barsak (hindgut); anal kanalın üst kısmına kadar olan kalın barsağın geri kalanını içerir ve inferior mezenterik arter tarafından beslenir (17,18).

İnce barsaklar midenin pilorundan başlayarak ileoçekal bileşkeye dek olan kısımdır. İnce barsağın proksimalden distale doğru segmentleri- duodenum, jejunum ve ileumdur (20).

iii. Duodenum- İnce barsağın “C” şeklindeki bölümü ve pilorun devamıdır. Adını Latince ‘duodenum digitorum’- ‘12 parmak’ kelimesinden almış olup, adı ile eşit uzunluğa yani ~25-30 cm’ e denk gelmektedir. 4 parçadan ibarettir (15,20,21).

Duodenumun birinci bölümü (Pars Superior): ~5 cm uzunluğunda olup, proksimali mobil (intraperitoneal), distali sabittir (retroperitoneal). Onun dışında

tüm duodenum retroperitoneal olarak kabul edilir (20). Arkasında koledok, vena porta, vena kava inferior ve gastroduodenal arter ve önünde karaciğerin kaudat lobu yer almaktadır (15).

Duodenumun ikinci bölümü (Pars Descendens): ~7,5 cm uzunlukta olup, orta kısmı konkav yapı şeklindedir. Bu alana posteromedialden pankreatobiliyer kanal açılır. Burada bulunan Ampulla Vater (her zaman olmayabilir ~%14)- pankreas ve safra yollarının duodenuma girmeden oluşturdukları ortak kanalın adıdır. Papilla Vater ise duodenal mukozanın ampulla vaterden taşması olarak bilinmektedir. Duodenumun bu kısmı önden karaciğerin sağ lobu transvers kolon ve jejunum ile komşudur (15).

Duodenumun üçüncü bölümü (Pars Horizontalis): ~10 cm uzunlukta olup aort ve vena kava inferiorun önünden sağdan sola geçer. Pankreasın altında ve superior mezenterik arter ve venin arkasında yer alır (15).

Duodenumun dördüncü bölümü (Pars Ascendens): ~2,5 cm uzunluğa denk gelmekte olup, duodenumun son kısmıdır. Aortun solundan başlayarak üst ve alt GİS ayrımını yapan, duodenojejunal bileşkeyi diyaframın sağ krusuna bağlayan Treitz ligamanında sonlanmaktadır(15).

Duodenumun proksimal segmenti gastroduodenal arter ve superior pankreatikoduodenal arter tarafından, distali ise superior mezenterik arter ve inferior pankreatikoduodenal arter tarafından beslenir. Venöz drenaj arterleri takip eder ve en sonunda portal sisteme boşalır (15).

iv. Jejunum: İnce barsakların orta bölümü olan ve yetişkinlerde yaklaşık 2,5 metre uzunlukta olan ileum, duodenojejunal bileşkeden başlamış olup jejunoileal bileşkede sonlanmaktadır (15,20). Bu sonlanım noktası net olmamakla beraber ince basanın son kısmı olan ileumla arada bazı farklılıklar bulunmaktadır. Jejunumun vizual olarak daha kırmızı (kanlanması daha fazla) olması, çapı ve duvar kalınlığının daha büyük olması, belirgin plikalara sahip olması, sadece mezenterinde yağ dokusu bulunması başlıca farklı özelliklerdir (15).

v. İleum: İnce barsakların son kısmı olan ileum, yetişkinlerde yaklaşık olarak 3 metre kadar uzamaktadır. En son çekuma invajine olmuş şekilde sonlanmaktadır (15).

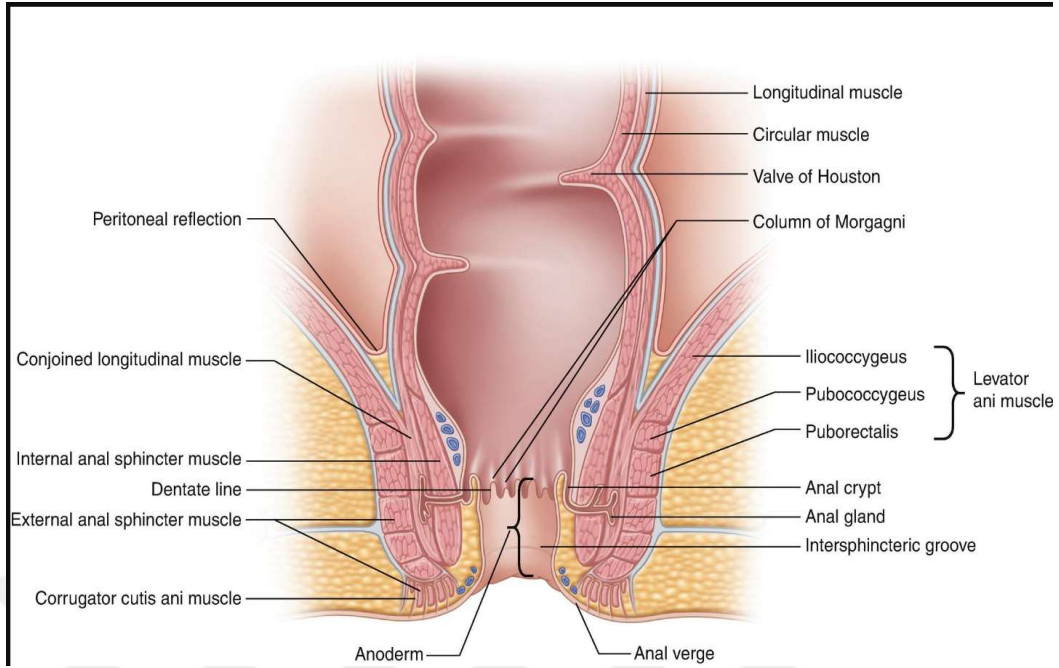
İleum jejunumla beraber GİS' in %60'nı oluşturmakta olup, intestinal emilimin %90'ını gerçekleştirmektedir (15).

vi. Kolon: Terminal ileumla anüs arasında yerleşen barsak bölümüdür. Bitiş yerini net tarif etmek gerekirse anal kanalın 2 cm 'lik proksimali yani- dentat line'' (pektinat hat) olarak adlandırılan alandır. Uzunluğu yetişkinlerde ortalama 1,3-1,8 metredir. Kolon - Çekum, asendan, transvers, desenden, sigmoid ve rektum gibi parçaların bütününden ibarettir. Kolonla ince barsaklarla aralarında bazı farklar bulunmaktadır (15,22).

- Çapı genel olarak ince barsaklardan geniştir. Kendi içinde de çekum ve rektumda en geniş çapa sahiptir (15,22).
- Apendiks epiploika- rektum hariç kolonun peritonla kaplı yağ birikintileri bulunur (15).
- Tenia coli adı verilen 3 longitudinal (Tenia libera, Tenia mesocolica, Tenia omentalis) kas şeridiyle karakterizedir. Tenialar birbirine 120 derecelik aralıklarla seyredirler. Bu tenialar apendiks tabanında birbirinden uzaklaşmaya başlar, bu nedenden dolayı apendiksin yerini belirlemede faydalıdır (15,22).
- Rektum hariç tüm kolon Haustra coli'lerle boğum boğumdur.
- Lümen içine baktığımızda ince barsaklardaki mukozal villuslar kolonda görülmez (15).

İnen ve çıkan kolon kısmen retroperitonealdir. Transvers kolon ve sigmoid kolon ise intraperitonealdir (15,22).

Kolon mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza/adventisyadan ibarettir. Mukoza kendi içerisinde epitel, lamina propria ve muskularis mukozadan oluşur. Submukozada kan damarları, lenf damarları ve Meissner pleksusu içeren bağ dokusu bulunur. Muskularis propria iki düz kas tabakasından oluşur: dışarıdan longitudinal, içeriden sirküler. Myenterik (Auerbach) pleksus bu kas katmanlarının arasındadır. Cajal'ın interstisyel hücreleri muskularis propria içinde bulunur ve peristaltizmde rol oynar. Subseroza fibroadipoz dokudan oluşur ve kübik mezotel hücrelerden oluşan seroza ile kaplıdır. Gevşek bir şekilde düzenlenmiş fibroblastlar ve kollajenden oluşur (15,23,24).



Şekil 2.1. Anorektal bölge anatomisi (The ASCRS of Colon and Rectal Surgery) (23).

vii. Rektum ve Anüs: GİS'in en distal anatomik bölümüdür. Sigmoid bileşkeden başlar ve anorektal bölgede sonlanır. Rektum anatomik olmayan 3 ayrı bölümden oluşmaktadır- üst, orta ve alt. Haustrasyonları olmadığı için Latince düz barsak anlamına gelen rectum intestinum adı verilmiştir. Anorektal bileşke, dışarıdan puborektal kas ve pelvik taban kasları, içeriden “dentat line” hizası olarak kabul edilir (15,23).

İnternal anal sfinkter rektumun iç sirküler kaslarının uzantısı olarak bilinir ve devamlı kontraktsiyon halinde kasılıdır. External anal sfinkter, internal anal sfinkterin etrafında radyal biçimde sarılıdır, tonik kasılı pozisyonundadır.

M. iliokoksigeus, m. iskiokoksigeus, m. pubokoksigeus, m. puborektalis, derin ve yüzeyel eksternal sfinkter kasları anüsün çevresinde birleşen parasagital kas lifleri ile birlikte eksternal anal sfinkteri oluşturur. Genelde huni görünümünde olan bu kaslar defekasyonu kontrol eder.

Sigmoid kolondan gelen dışkı defekasyon öncesi rektumda depolanır, rektumun distansiyonu ile internal ve eksternal anal sfinkterler gevşer (rektoanal inhibitör refleks), rektum kasılır ve kısalır böylece defekasyon gerçekleşir. Bu refleks HH' da bozulmuştur (15,23,25).

Anal kanal tanım olarak cerrahi ve anatomik olarak ikiye ayrılır. Cerrahi anal kanal levatör ani hizasında başlar, “anal verge” de biter. Anatomik anal kanal ise anorektal bileşkeden (anorektal ring) başlar “anal verge” de biter. Rektum hemoroidal arter ve ven ile kan akımını sağlamaktadır.

Dentat hatt rektumun kolumnar epiteli ile anal kanalın çok katlı yassı epiteli arasındaki çizgidir. Bu hatt bize rektal biyopsi işleminde yol göstericidir (15,23).

2.1.3. Fizyoloji

Gıdanın sindirimi, besin maddelerinin emilimi, dışkının atılması insanın sağlığı ve refahı için eşsiz önem arz etmektedir. Bu sistem sindirimin bir işlemden diğerine geçişinde karmaşık kontrollere sahip dört ayrı alt işlem olarak düşünülebilir. İnsan anatomisi açısından bu dört işlem ağız (oral işlemler), mide (gastrik işlemler), ince barsak (barsak işlemleri) ve kalın barsak fermentasyonuna karşılık gelir. Dört işlemin kesinlikle seri olarak devam etmesi fizyolojik açıdan önemlidir. Normal koşullar altında ters akış ve geri dönüşüm yoktur (26). Barsak hareketliliği, enterik ganglionlar nöral ve Cajal'ın interstisyel hücreleri gibi nöral olmayan mekanizmalar dahil olmak üzere birbirine bağlı mekanizmalar tarafından kontrol edilir (27).

GİS ayrıca, lümendeki patojenleri tanıma ve bunlara yanıt verme yoluyla bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olarak da rol oynar (28). Sindirim GIS' in farklı bölümlerinde gerçekleşir ve içeriğin bölümler arasında hareket etmesini gerektirir. Bu hareket kas kasılması ve gevşemesinin koordinasyonu, yani aktif ve pasif peristaltizm ile yerine yetirilmektedir. GIS' in hareketliliğinden sorumlu hücreler olarak düz kas hücreleri, enterik nöronlar ve Cajal'ın interstisyel hücreleri ön planda yer alır. Mevcut yeni çalışmalar Cajal'ın kalp pili hücreleri gibi davrandığını göstermektedir (29).

2.2. Enterik Sinir Sistemi

2.2.1. Tanımı

Sindirim sistemi yiyeceği ilk gördüğümüz veya kokusunu aldığımız andan itibaren onu en sonda vücuttan atıldığı ana kadar geçen sürede çok karmaşık entegre sistemle yönetmektedir. Bu organizasyonu için sistemin bir “beyin” e ihtiyacı vardır. Barsağın beyni (ikinci beyin) olarak adlandırdığımız bu sistem “Enterik Sinir Sistemi” olarak bilinmektedir (30). Bazen de evrimsel olarak MSS den önce geliştiği için birinci beyin olarak da bilinmektedir (31).

Bu süreçleri önemli ölçüde kontrol eden ESS, barsak duvarındaki nöron ve glia ağından ibaret olup, barsak fonksiyonlarını çok yönlü kontrol etmektedir (11,12) Enterik sinir sistemi (ESS), periferik sinir sisteminin en büyük bölümüdür. Aynı zamandan merkezi sinir sisteminin bileşenleri ve işlevleri ile çok benzerdir (32).

ESS, sindirim fonksiyonunu kontrol etmek için sempatik ganglionlardan geçen sinir yolları, MSS refleksi ve komuta merkezleriyle birlikte çalışır. ESS ile MSS arasında ve ESS ile sempatik prevertebral ganglionlar arasında iki yönlü bilgi akışı vardır (11). ESS otonom olmayıp, MSS e entegre şekilde çalışmaktadır (33).

ESS eksik (aganglionozis) veya kusurlu olduğunda (NID, ...) bu hastalıkların ortaya çıkardığı kabızlık, kusma, karın şişliği, karın ağrısı, büyüme, gelişme geriliği gelişir (12). Tutulan segmentlerde aktivasyonun var olup, inhibisyonun ortadan kalkması nedeniyle kasılan barsak segmenti gevşeyemez ve devamlı kasılı durur. Buda pasajın durmasına neden olur. Bu inhibisyonda vazoaktif intestinal peptit ve nitrik oksitin yokluğu sorumlu tutulmaktadır (34).

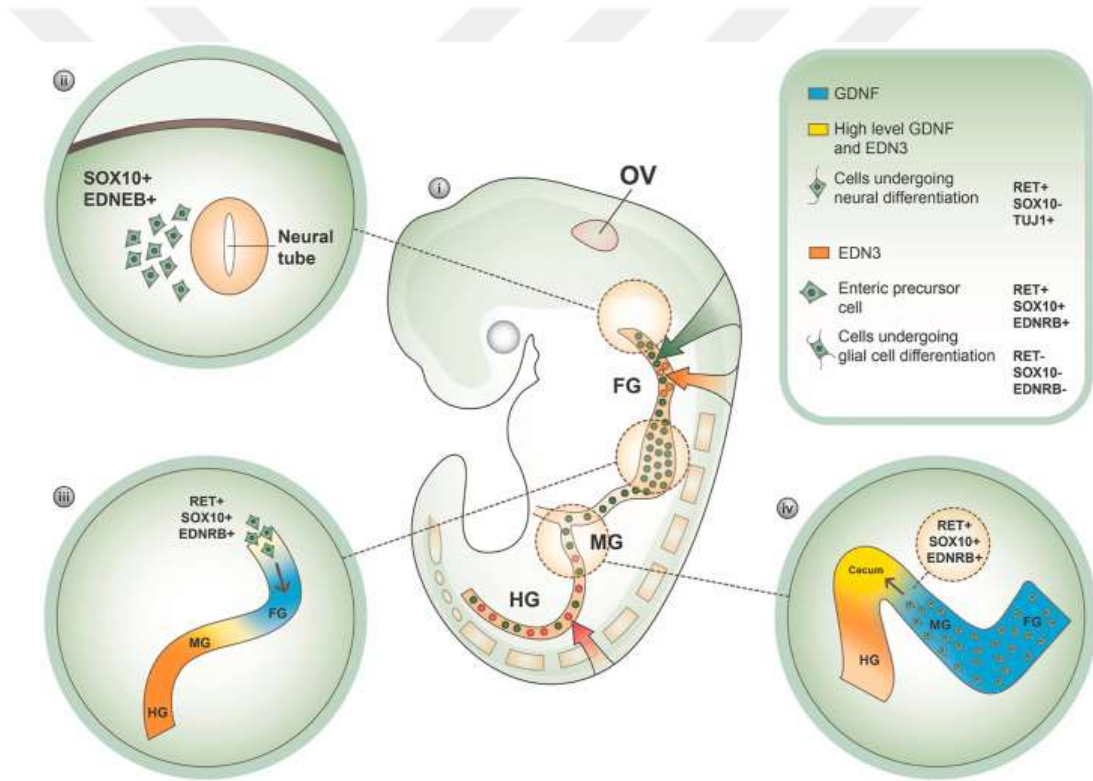
Yapılan deneysel çalışmaları ve HH araştırmaları sayesinde ESS'nin gelişimi hakkında ayrıntılı bir bilgi sağlanmıştır (12).

2.2.2. Embriyoloji

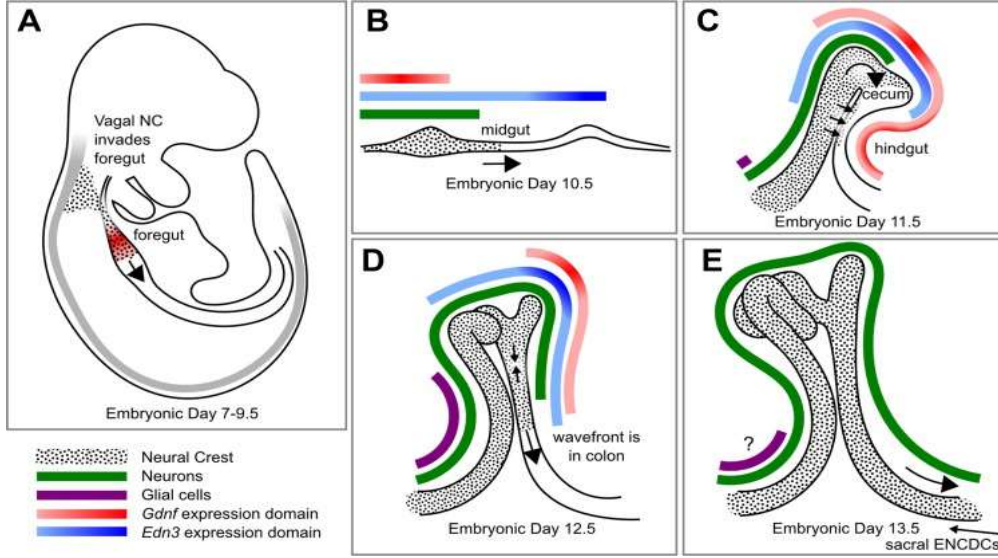
Farklı canlılarda farklı zamanlarda oluşumu başlayan ESS, insanda 4. haftada rostrokaudal aksta ön barsağı tuttuktan sonra barsak boyunca yolculuğa başlar (12). TGFβ ailesinden olan glial hücre hattından türetilen nörotrofik faktör (GDNF), bunun yanı sıra RET ve tirozin kinazın ESS'nin gelişim sürecinde önemli rol oynamaktadır (32,34). Hatta GDNF'nin eksik veya tamamen olmaması farklı

hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda aganglianozisle sonuçlanmaktadır (32). Daha da netleştirmek gerekirse GDNF, ESS'nin pregenitör hücrelerine kılavuz olmakla yetişkinlerde enterik nöronların sayını belirler (32). GDNF ayrıca göç eden pregenitörler için mitojenik olup, gelişimin sonraki aşamalarında farklılaşacak olan nöronlar için trofik görev üstlenmektedir (12,32). 4. haftada başlayan krest göçü 7-10. haftada kolonda sonlanmış olur (32). ESS'nin gelişim ve farklılaşması postnatal 1. yaşına kadar devam etmektedir (34).

Motilitenin ilk sinyalleri 25. gebelik haftasında belirirken, ESS ile efektör organlar arasındaki kontakt gebeliğin 26.cı haftasından başlamaktadır (34).

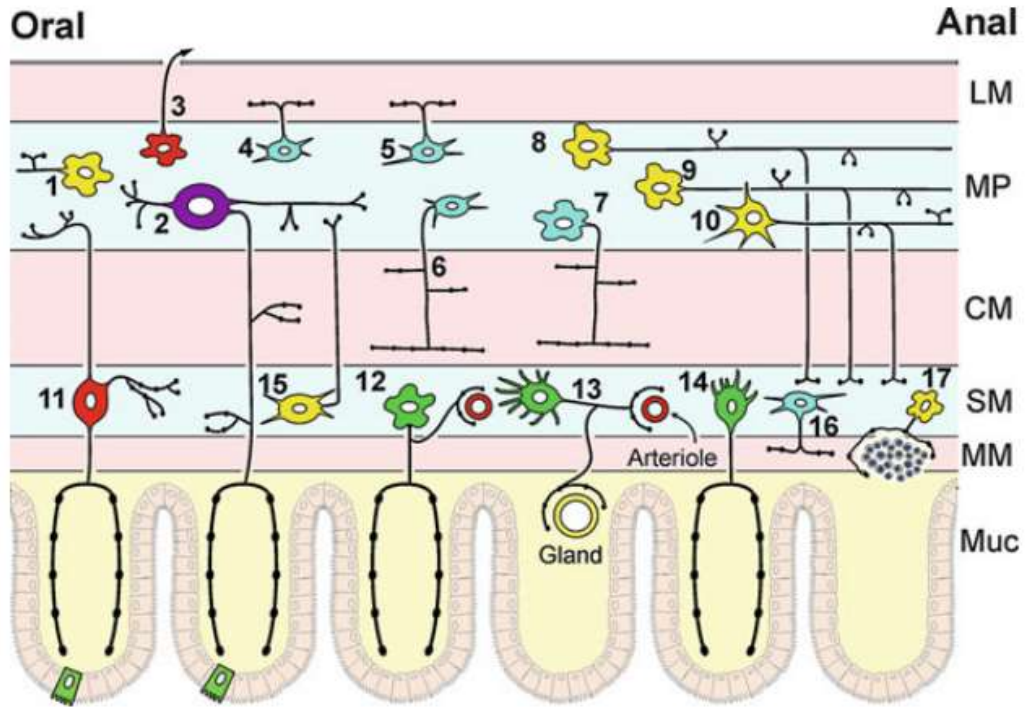


Şekil 2.2. Enterik nöral krest hücrelerinin göçü (Diposarosa'dan (35)).



Şekil 2.3. Fare gastrointestinal sisteminin enterik nöral krest (NC) türevi hücrelerin kolonizasyonu (Lake'den 12).

Nöroenterik ganglion hücreleri barsak visseral organ haline geldikten sonra onun duvarına yerleşip derin katmanlara doğru inerek otonom sinir sistemini oluşturan ganglion hücrelerine dönüşürler. Bu dönüşüm yerleştikten sonra da devam eder. Barsağa ulaşan bu hücreler önce Auerbach pleksusunu, daha sonra submukozal pleksus olan Myenterik pleksusu oluşturmak üzere farklılaşırlar(36). Ganglion hücreleri genelde vagal nöral krestten köken almaktadır, çok az bir kısmı ise sakral nöral krest kökenlidir (37).



Şekil 2.4. ESS'deki nöron tipleri (Furness'den 11).

(**LM-** longitudinal kas, **MP-** myenterik plexus, **CM-** dairesel kas, **SM-** submukozal plexus, **Muc-** mukozası. 1-Artan internöronlar, 2-Miyenterik intrinsik primer afferent nöronlar (İPAN), 3-Barsak fugal nöronlar, 4-Uyarıcı longitudinal kas motor nöronları, 5-İnhibitör longitudinal kas motor nöronları, 6-Uyarıcı dairesel kas motor nöronları, 7-İnhibitör dairesel kas motor nöronları, 8-İnen internöronlar (lokal refleks), 9-İnen internöronlar (sekretomotor ve motilite refleksi), 10-İnen internöronlar (göç eden miyoelektrik kompleks), 11-Submukozal İPAN, 12-Kolinergik olmayan sekretomotor/vazodilatör nöronlar, 13- Kolinergik sekretomotor/vazodilatör nöron, 14-Kolinergik sekretomotor (vazodilatör olmayan) nöronlar, 15-Myenterik pleksusa çıkıntı yapan uni-aksonal nöronlar, 16-muskularis mukozasına giden motor nöron, 17-Peyer plaklarının innervasyonu, 18-Gösterilmemiş, enteroendokrin hücrelere motor nöronlar.)

ESS'nin organizasyonu barsak duvarı içinde kesin olarak iki ganglion hücre ağının kurulmasını gerektirir. Nöronlar ve glialar, ganglionlara kümelenir, daha sonra nöronlar hedefleri innerve etmeden önce başlangıçta fasiküllenen nöritleri uzatır. ESS morfogenezini kontrol eden moleküller nispeten az anlaşılmıştır, ancak birkaç klasik morfogenin ESS gelişiminde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Bazı spesifik trofik faktörler de enterik nöronların alt kümeleri için kritiktir, ancak bunların yokluğu intestinal aganglionezise veya farklı görünümlü ganglionlara neden olmaz (12,30,33).

2.2.3. ESS'nin Genel Yapısı

ESS öncülleri nöral tüpün vagal ve sakral segmentlerinden başlangıç alırlar. Vagal nöral krest, ESS'nin ana kaynağı olarak kabul edilir. Sakral nöral krest ise az miktarda bulunmuş olup, barsakların distaline katkı sağlar (12).

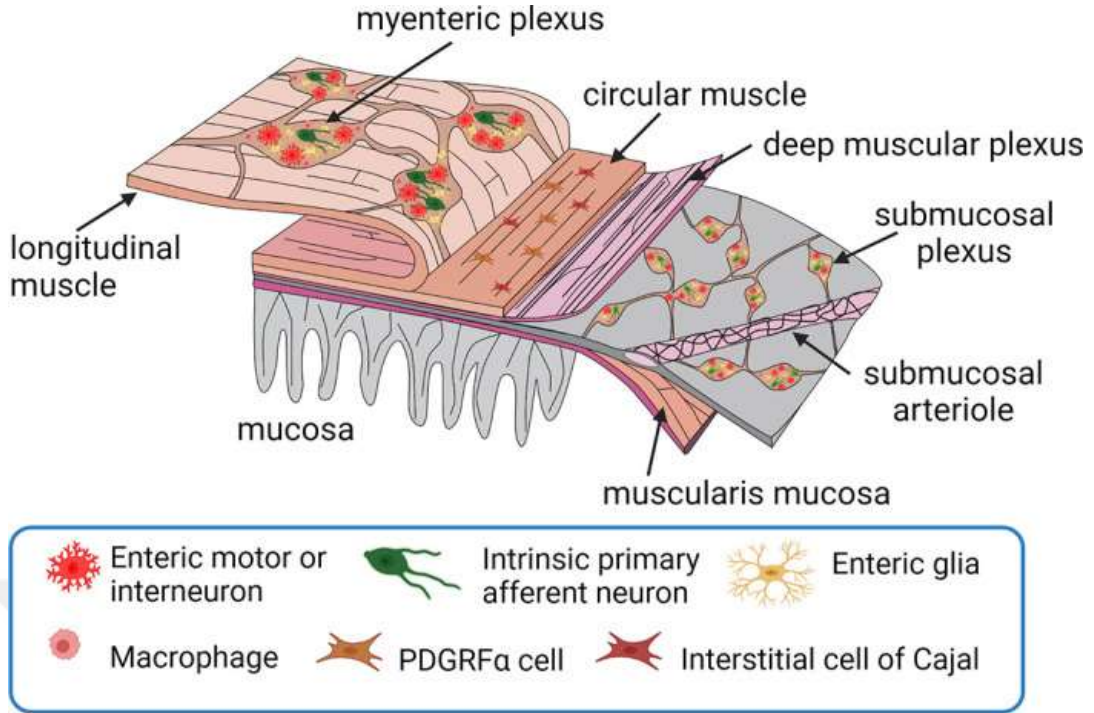
ESS özofagustan anüse kadar olan Gİ yolda ganglion ve sinir hücreleri ile devamlı bir ağ oluşturur (11,12,30,34).

ESS' de genel olarak 2 ağ mevcuttur.

1. Submukozada yerleşmiş olan submukozal ağ (Meissner pleksusu)
2. Longitudinal ve sirküler kas tabakaları arasında yerleşmiş olan myenterik ağ (Auerbach pleksusu) (34)

Bazı kaynaklara göre submukozada Henle pleksusu da mevcuttur. Derin submukozal Henle pleksusu, submukozanın sirküler kas tabakasında bulunmaktadır (38).

Bahsedilen bu pleksuslar barsaklarda tam anlamıyla mevcut olsa da özofagus ve midede nöronların nerdeyse tamamı sadece myenterik pleksusta toplanmıştır (30). İnsandaki ESS, 200-600 milyon nörondan ibaret olup (sempatik ve parasempatik ganglionların toplamından daha fazla), bundan 3-5 kat daha fazla enterik glial hücre bulunmaktadır (11,39). Bu konudaki çalışmalar, ışık mikroskobu ile 100 X büyütme ile bir sahada olması gereken normal ganglion sayısı 0.68 ± 0.28 ve bu ganglion içindeki hücre sayısı da 4 ± 2 olduğu belirtilmektedir (40).



Şekil 2.5. Enterik sinir sisteminin genel organizasyonu (Sharkey'den 30).

Furness ve ark. tarafından 2020'de Burnstockta yapılan laboratuvar çalışmalarında nöronları birincil (duyusal) afferent, motor ve internöronlar olarak 3 ana grupta farklılaştırmışlar (39). Myenterik ağ gastrointestinal hareketlerden sorumlu iken, submukozal ağ gastrointestinal salgıları ve lokal kan akımını kontrol eder (34).

2.3 Hirschsprung Hastalığı

2.3.1. Tanımı

HH distal barsağın myenterik ve submukozal plexuslarındaki ganglion hücrelerinin yokluğuyla birlikte ortaya çıkan spazm, peristaltizmin kaybolması ve fonksiyonel barsak obstrüksiyonu ile kendini gösteren enterik sinir sisteminin gelişimsel bir bozukluğudur (41). Bunun sonucunda hastada intestinal obstrüksiyon ve onun neden olduğu semptomlar ortaya çıkar (1).

2.3.2 Tarihçesi

Konjenital Megakolon (KM) olarak da bilinen HH ilk kez 17. Yüzyılda Frederick Ruysch tarafından 5 yaşında ölen bir çocukta tanımlandı(1). Hastalık klinik açıdan ilk kez 1888'de Kopenhag'lı bir çocuk doktoru olan Prof. Harald Hirschsprung tarafından dışkılama zorluğu çeken, hastalığın klasik klinik ve anatomik özelliklerini taşıyan iki yenidoğanda tanımlanmıştır. Burda kolonun konjenital dilatasyonu şeklinde adlandırılmıştı. 1900 yıllara kadar HH ile kazanılmış megakolon karıştırılıyordu. 1901 yılda Tittel aurbach ve meissner pleksuslardaki ganglionlarda anormallik görmesi ile tablo daha da aydınlandı. Swenson 1948' de bu hastalığa yönelik kendi ismiyle anılan ilk operasyonu yapmıştır (3).

2.3.3 Epidemiyolojisi

HH' nin görülme sıklığının 5000 canlı doğumda bir olduğu tahmin edilmektedir (1,38). Bunun yanı sıra Kaliforniya Doğum Kusurları İzleme Programı' nın 15 senelik çalışmasında (1983-1998) Asyalılarda 10.000 canlı doğumda 2,8 çocuk, afroamerikalılarda 10.000 canlı doğumda 2,1 çocuk, beyaz ırkta 10.000 canlı doğumda 1,5 çocukta ve ispanlarda 10.000 canlı doğumda 1 çocuk HH olduğu bulunmuştur (42). Genel olarak erkek: kadın oranı 4:1 dir. Ancak, kısa segment HH için erkek: kadın oranı 4,2-4,4, uzun segment HH için 1,2-1,9 dir. HH olan birinin kardeşinde hastalık görülme riski normal popülasyona göre 200 kat daha fazladır (28).

HH' ın %30 kadarında ayrıca velokardiyofasiyal defektler, konjenital kalp hastalıkları, gastrointestinal sistem malformasyonları, MSS anormallikleri, genitoüriner sorunlar, kraniyofasiyal malformasyonlar ve spina bifida gibi anormallikler görülmektedir. Ek olarak, HH vakalarının %5-15'i Down sendromu ile ilişkilidir (38).

Artan farkındalık ve gelişmiş tanı yöntemleriyle birlikte, HH tanı konulma yaşı önemli ölçüde azaldı. Bu nedenle hastalık çoğunlukla yenidoğan döneminde teşhis edilmektedir (41).

2.3.4. Etiyopatogenezi

Embriyonik dönemde nöral elemanların enterik sistem boyunca göç etmeleri, barsak duvarından girip submukoza ve kas tabakaları arasında dağılarak ESS'ye ait ganglion hücrelerini oluşturmalarıyla sonuçlanır. Ancak HH' da bu süreç bozulmuştur. Bu ganglion hücrelerinin yokluğu HH'deki temel patolojidir. Bu süreçte nöronal göçün herhangi bir nedenle duraklaması, o segment distalindeki barsakların aganglioneozisi ile sonuçlanır. Duraklama işlemi ne kadar erken olursa aganglionik segment o kadar uzun olur (2,41,43).

Bu durumu açıklayan iki ana teori vardır. Bunlardan ilki ve yaygın kabul göreni ganglion hücrelerinin hedeflerine ulaşamamasıdır (ganglion göçünün duraklaması). Diğer teori ise, ganglion hücrelerinin hedef dokuya ulaşmasına rağmen, burada tutunma, çoğalma ve hayatta kalma mekanizmalarında bozukluk meydana gelmesi ile sonuçlanmıştır (41).

HH patogenezi için yapılan araştırmalar içinde nöral krest hücre gelişimini düzenleyen RET, GDNF, GFR α 1, NRTN, PHOX2b, SOX10, SHH, EDNRB, ET3, ZFHX1B genler tanımlanmıştır (38).

İkinci ana teoriyi destekleyen çalışmalarda, uygun mikroçevrede etkili ekstrasellüler matriks moleküllerinin, sağlıklı şekilde buralara ulaşan ganglion hücrelerinin yaşamına belirgin derecede etki ettiğini ortaya koyulmuştur. Bu moleküllerden en önemlileri – tip 4 kollajen, laminin, proteoglikanlar ve fibronektindir. Bu süreçte aynı zamanda nöral hücre adezyon molekülleri olan NCAM ve L1CAM de önemli rol almaktadır (44). Bu moleküllerin aganglionik segmentlerde anormal aktivitede olduğu gösterilmiştir (1,43).

Normal sağlıklı bir barsak segmenti sempatik sistemin inhibitör, parasempatik sistemin ise uyarıcı etkisi ile innerve edilir (45).

HH' daki ana sorun parasempatik sistemin yetersizliği ile ilişkilidir. Submukozal ve myenterik pleksuslarda ganglionların yokluğu kolinerjik sinir liflerinde asetilkolinesteraz aktivitesini artırmaktadır (46,47). Aganglionik barsak segmentinin kolinerjik etki yoğunluğunun nedeni ektramural sakral innervasyondur (47).

Sakral parasempatik pleksustan başlayan kolinerjik akson yumağı barsak duvarında direkt düz kas hücrelerini etkileyerek onları kasarlar. Aganglionik

segment koordinasyonsuz bir motiliteye sahip olup, nonadrenerjik ve non kolinerjik aktivite bulunmadığı için devamlı kasılı fazda durmaktadır. Bazen bu koordinasyonsuz motilite nedeniyle dışkı distale geçebildiği için geç yaşlarda bulgu veren HH ile de karşılaşa biliriz (46,47).

Tablo 2.1. HH’da etkili genlerin fonksiyonu (Butler Tjaden’den 38).

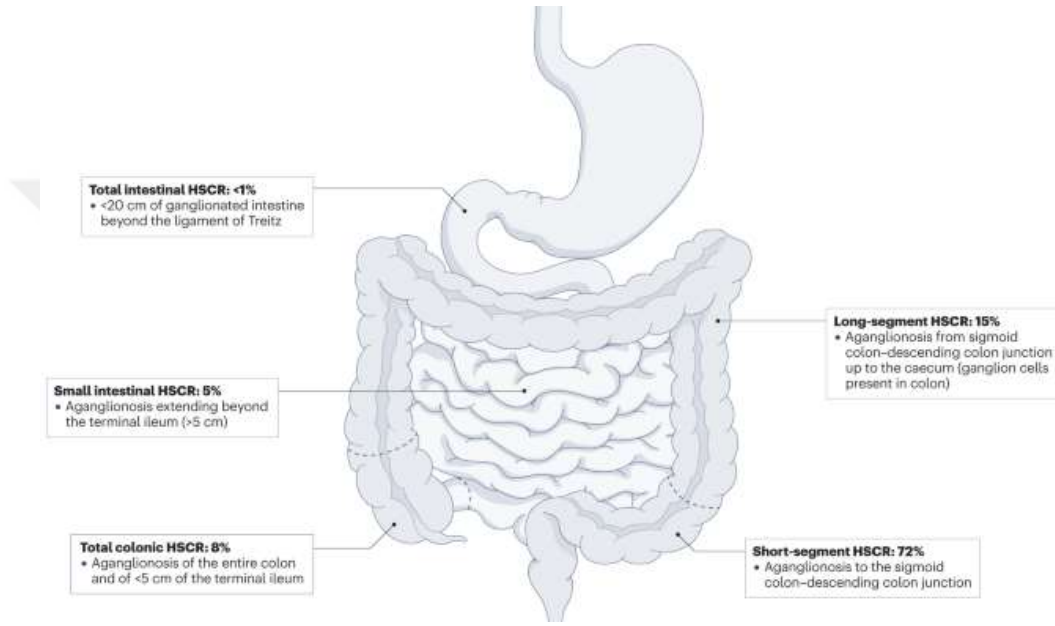
Gen	Göç	Yayılma	Farklılaşma	Hayatta Kalma/Hücre Ölümü
RET	GDNF'ye ilgi duyar	Yayılmayı teşvik eder	Nöral farklılaşmayı teşvik eder	ENCC'yi ve enterik nöronların yaşamını teşvik eder
GDNF	RET+ ve GFR α 1+ ENCC'leri çekmek için eğim oluşturur	Yayılmayı teşvik eder	Nöral farklılaşmayı teşvik eder	Hayatta kalmayı teşvik eder
GFRα-1	GDNF'ye çekilir, mezenterden geçmek için gereklidir			Enterik nöronların hayatta kalmasını teşvik eder
EDNRB	Normal göç için gereklidir	Proliferatif durumu korur		
EDN3/ET3	Normal göç için gereklidir, ortamı koruyabilir		Nöronal farklılaşmayı engeller	
ZFHX1B/SIP1/ SMADIP1	Sinirsel spesifikasyon, Epitel-mezenkimal geçişi ayarlar			
PHOX2b	Göç eden ENCC'lerde ifade edilir			
SHH	GDNF'ye karşı çıkar, göçü azaltır	Yayılmayı teşvik eder	GDNF'ye olan cevabı etkileyerek nöronal farklılaşmayı engeller	
SOX10		ESS progenitör durumunu korur		
NRTN/NTN		Yayılmayı teşvik eder	Nöral farklılaşmayı teşvik eder	Hayatta kalmayı teşvik eder

Tanı yöntemi olarak da kullanılan asetilkolinesteraz, yapılan çalışmalarda HH’da kolonun aganglionik segmentindeki düzeyi, kolonun ganglionik segmentindeki düzeyine kıyasla 3 kat daha fazla tespit edilmiştir (47).

2.3.5. Klinik

Konjenital megakolon yenidoğan döneminde barsak obstrüksiyonunun en yaygın nedenlerinden biri olup, hastaların büyük çoğunluğu bu dönemde tanı almaktadır (48). Ancak bazı vakalarda gelişen kabızlıklar konservatif izlendiğinden tanı alma zamanı yetişkin dönemine kadar uzayabilir (1,5,48).

Hastalığın klinik olarak belirtileri aynı zamanda tutulan segmentin uzunluğuna da bağlıdır (2):



Şekil 2.6. HH da tutulan segmentlerin oranı (Montalva'dan 2).

HH yenidoğan döneminde %80-90 semptom vermektedir (1,5). Başlıca semptomu 24-48 saati geçen mekonyum çıkarılmasıdır (1,2). Genelde yenidoğanların %95 i ilk 24 saatte mekonyumunu yapar. Diğer bulgulara karın distansiyonu, beslenme intoleransı safralı kusma, enterokolit, intestinal perforasyon ve geç dönemde sepsis görülebilir (5).

Benzer semptomlar olabileceği için ayırıcı tanıda mutlak dikkat edilmesi gereken diğer hastalıklar ise şunlardır (1,2,5):

- İntestinal atrezi
- Malrotasyon
- Mekonyum ileusu (kistik fibrozis)
- Anorektal malformasyon
- Elektrolit bozuklukları

- Hipotiroidizm ve s.

HH seyrinde en morbid ve mortal seyreden patoloji hirschsprung ilişkili enterokolittir (HİEK) (2). HİEK oluşumunda intestinal içeriğin birikimi sonucu barsak duvarında kan akımının bozulması, mukozal hasar, hızlı bakteri artışı, immun sistem zayıflaması sonucu ortaya çıkan inflamasyon suçlanmaktadır (2,16). HİEK' in klasik bulgularında kusma, ateş, ishal, karın şişkinliği en sık rastlanan semptomlardır. HİEK özellikle Down sendromlu ve uzun segmentli HH'li yenidoğanlar da hastalığın ilk belirtisi olabilir. Bu nedenle, enterokolit geliştiren term bir yeni doğanda HSCR'den şüphelenilmelidir, çünkü bu hastaların %20'sine kadarında altta yatan HSCR olabilir (2).

2.3.6. Tanı

HH' nın ~ %80' i yenidoğan döneminde tanı almaktadır (2). HH tanısında kullanılan başlıca tetkiklere ayakta direkt karın grafisi, opaklı kolon grafisi, anorektal manometri ve rektal biyopsi dahildir (2,5,41).

Ayakta direkt karın grafisinde direkt tanıya yönelik spesifik bulgular olmasada genel olarak dilate barsak ansları, hava sıvı seviyeleri, geç yaşlarda ise dışkı dolu barsak segmentleri görülmektedir (2).

Anorektal manometri HH'da özellikli bir tetkik olup, rektal distansiyona yanıt olarak iç anal sfinkterin refleksif gevşemesini kontrol etmede kullanılır. Bu refleksin yokluğu HH' nı destekleyen bulgudur (2,5,41). Ancak, rektoanal inhibitör refleksin (RAIR) yokluğu HH' nı teşhis etmek için yeterli değildir çünkü ~ %74' lük pozitif bir öngörü değeri vardır (2).

Kontrastlı lavmanlı kolon grafisi de tek başına tanı koymada yetersiz olmakla birlikte hem HH tanısının desteklemesinde hem de barsak tutulumunun uzunluğunun değerlendirilmesinde vazgeçilmezdir. Bu çekim tekniğinden önce barsak hazırlığına gerek yoktur. Ancak, çekimden 2 gün önce ve 2 gün sonra rektal lavman yapılamaması tekniğin anlamlılığını artırmaktadır. Bu teknikte gösterilen transizyonel zonun tanı doğrulandıktan sonra operasyon planlamasındaki yeri önemlidir. Etkilenen segmentin proksimalindeki barsak dilate iken aganglionik segment daralmış olarak bulunur. Aganglionik segmentin fasikülasyonu/testere dışı

düzensizliği sıklıkla görülür. Ek olarak, uygulanan kontrast maddenin boşaltımı gecikmiş olması anlamlı kabul edilir (1,2,5,49).

Hastanın kliniğinin veya anlatılan bu tetkiklerde HH açısından şüpheli durum olursa tanıyı doğrulamak için rektal biyopsi yapılmalıdır. Yapılacak tam kat rektal biyopsi HH'da altın standart kabul edilmektedir. Dentat line'nin 1-2 cm proksimalinden alınan tam kat rektal biyopsi materyalinde Auerbach ve Meissner pleksuslarında ganglion hücrelerinin görülmemesi (aganglionezis) tanıyı kesinleştirir. HH'nın morfolojik tanısı enzim histokimyası da kullanılarak yapılabilir (1,2,49,50).

Hematoksilen-eozin (H&E), Asetilkolinesteraz (AChE), Laktat dehidrojenaz (LDH), Süksinat dehidrojenaz (SDH), Nitrik Oksit (NO) ve NADPH-Diaforaz 12 enzimleri kullanılarak histokimyasal boyamalar yapılabilmektedir (1,2,49,50).

2.3.7. Tedavi

Hastalığın tedavisi kesin olarak cerrahidir. Zaman- zaman yeni teknikler bulunmuş olsada, HH' ndaki cerrahinin temel ilkeleri hep değişmez kalmaktadır. Anal sfinkterler korunarak çıkarılan aganglionik segmentin yerine normal ganglionik segment getirilmektedir (2,48). Mevcut teknikler ile cerrahi tek aşamalı-stoma yapılmadan veya stoma yapılarak 2 ya da 3 aşamalı olarak ameliyat edilir (1,2).

Günümüzde kullanılan temel cerrahi teknikler şunlardır:

Swenson prosedürü bu hastalığın tedavisinde ilk geliştirilmiş klasik cerrahi yöntemdir. Aganglionik segment çıkarılır ve normal barsak distal rektal uca anastomoz yapılır. Dezavantajları- rektumun büyük bir kısmı çıkarıldığından nörovasküler hasar riski vardır.

Duhamel prosedürü aganglionik barsak segmentinin rektum hariç tamamı çıkarılarak, ganglionik barsak segmentinin rektorektal geçirilerek rektal güdüğe yan yan anastomoz yapılır. Rektum korunarak nörovasküler bütünlük sağlanır, sfinkter fonksiyonları daha iyi korunur. Lakin anastomoz bölgesinde dışkı birikimi ve enterokolite neden olabilir.

Soave prosedüründe temel prensip rektumun mukoza ve submukozası soyulduktan sonra ganglionik barsak segmenti, aganglionik rektal kas kılıfının içerisinden anüse anastomoz edilir. Rektum çevresinde diseksiyon yapılmadığı için sinir hasarı izlenmemektedir.

Bu tekniklerle beraber laparoskopi kullanımı morbiditeyi, hastane yatış zamanını ve kolostomi ihtiyacını azaltmaktadır.

Dezavantajları: Anastomoz darlığı ve enterokolit riski olabilir.

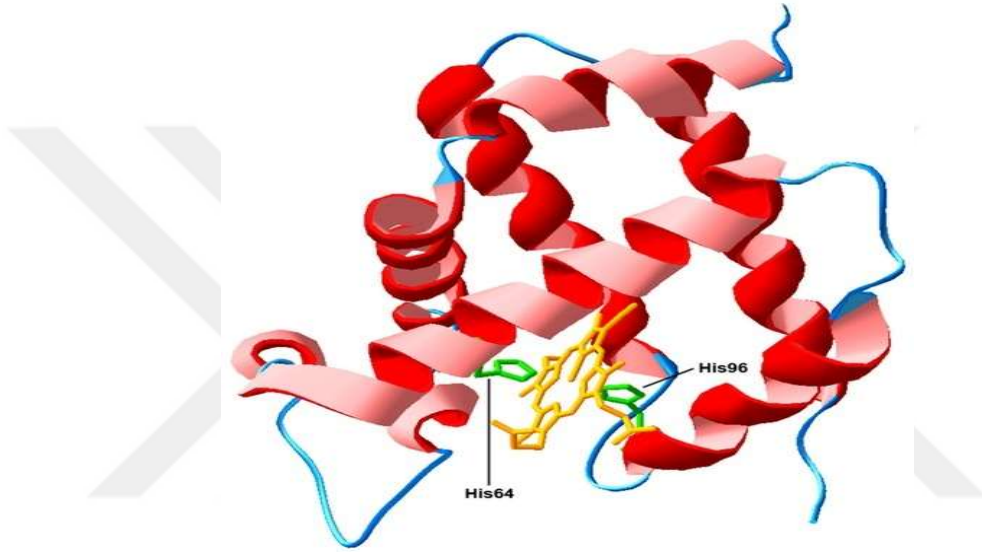
Transanal Endorektal Pull-Through (TEPT)- Soave operasyonunun modifikasyonu olarak Ortega-Salgado tarafından 1998’de, Langer tarafından 1999’da tanımlanmıştır. Tek seanslı yapılması, abdominal yaklaşım olmaması nedeniyle intraabdominal yapışıklık yaratmaması, yenidoğan döneminde barsakta inflamasyon olmadan rahat yapılabilmesi teknik olarak öne çıkmasına neden olmuştur.

HH cerrahi tedavisinde robot destekli yaklaşım uygulanabilir. Ancak aletlerin boyutu ve uzun vadeli işlevsel sonuçları karşılaştırmak için takip süresinin çok kısa olması nedeniyle bebeklerde sınırlı fayda sağlayabilir. Günümüzde minimal invaziv teknikler (özellikle TEPT ve laparoskopik teknikler) daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, her hastanın klinik durumu ve cerrahin deneyimi en uygun yöntemin belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu yöntemlerden herhangi birinin diğerlerinden daha iyi olduğu kanıtlanmamıştır (2,5,41,48,49).

2.4. Ngb, Cygb ve Nln’nin Genel Bilgileri

Ngb nöronlarda bol miktarda eksprese olan ve hipoksida artış gösteren globin ailesinin hemoglobin ve myoglobinden sonra keşf edilen 3. üyesidir (9). Öncelikle retina olmakla, tüm nöronal dokularda tespit edildiği için Ngb ismini aldı (51). Daha önce yapılan çalışmalar endojen nöroprotektif olan Ngb’nin hipoksik stres sonrası tetiklenerek sinir hücrelerinin hayatta kalabilmelerine katkı sağladığı gösterilmiştir (9). Araştırmalar sonucu hipoksi veya iskemiden sonra Ngb inhibisyonunun nöronal sağkalımı azalttığı, aşırı ekspresyonuyla ise sağkalımın arttığı gösterilmiştir. Ngb’nin aşırı ekspresyonunun anti apoptotik bir rol oynadığına dair çeşitli hipotezler mevcuttur. Ngb hipoksik ve iskemi koşullarında

hasara neden olan reaktif oksijen radikalleri ve azot artıklarını temizlemek için işlev görmektedir (51). Özellikle, yüksek Ngb seviyeleri nörolojik hastalıkların şiddeti ve nöron ölümüyle ters orantılıdır (10). Yapılan bazı çalışmalarda Ngb ve mitokondri arasında yakın bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. Birincil kortikal nöronlarda, Ngb'nin aşırı ekspresyonu hipoksiden sonra mitokondriyal işlevleri korumaktadır. Dahası, Ngb'nin aşırı ekspresyonu indüklenen mitokondriyal işlev bozukluklarını zayıflatarak genel hücre sağ kalımını artırır. (9,10,51)

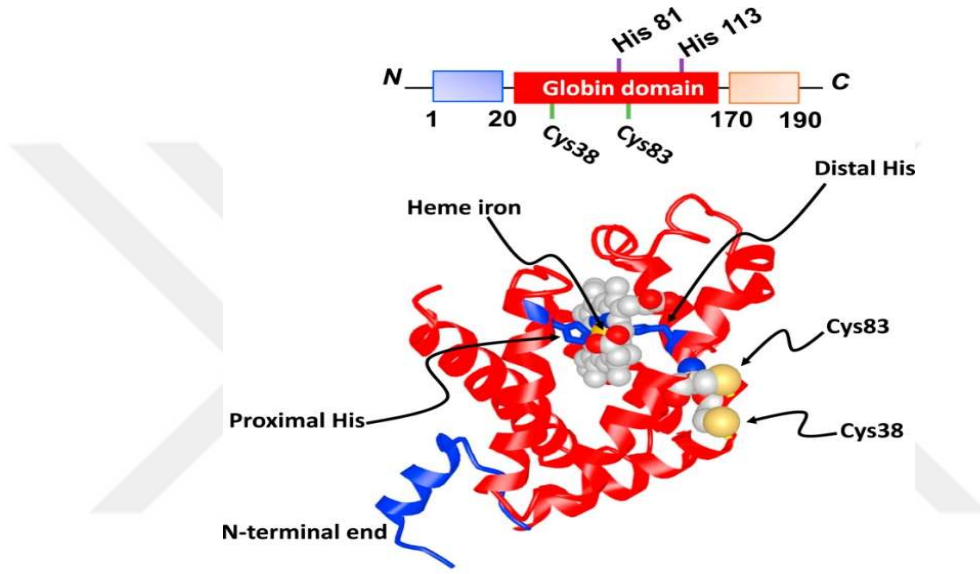


Şekil 2.7. Ngb'nin görünümü (<https://www.mdpi.com/1422-0067/17/11/1817>)

Globin ailesinin Ngb'den sonra keşfedilen 4.üyesi Cygb'dir. Cygb insan dokularında yaygın olarak eksprese olmaktadır. Lakin hücresel düzeyde düşük seviyede tespit edilmesi onun son zamanlara kadar keşfedilmesini engellemiş olabilir (51). Ngb'nin aksine Cygb pH'tan bağımsız yüksek düzeyde oksijen affinitesine sahiptir. Bu özelliği ile globin ailesinin ilk iki üyesine (hemoglobin ve miyoglobin) daha çok benzemektedir (51). Ngb gibi Cygb de oksijen türlerini katabalize etme yeteneği ile hücresel hasarı engellemektedir. Yapılan çalışmalarla Cygb'nin dokularda aşırı ekspresyonu kimyasal olarak indüklenen reaktif oksijen radikallerini azalttığı ve oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir (6). Günümüzde hala Cygb'nin değişen düzeyde ekspresyonunun mekanizması aydınlatılamamıştır.

Cygb'nin apoptozdaki rolü p53 ile etkilelimi sonrası ortaya çıkmaktadır. Tüm araştırmalar sonucu Cygb'nin azot oksit seviyelerini doğrudan düzenlenmesi yoluyla vasküler reaktiviteyi düzenlemede de rol oynadığı ortaya koyulmuştur.

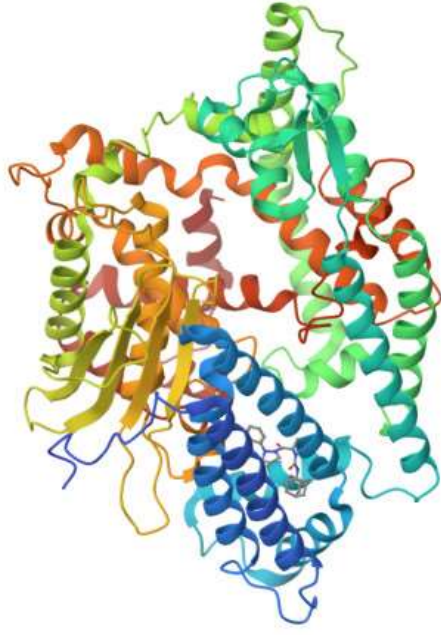
Son olarak Pongsuchart ve arkadaşları Cygb'nin kanser ile ilişkisini ortaya koydu. Yapılan çalışmada osteosarkomlu dokuda hücre duvarında düşük düzeyde eksprese olan cygb metastazı engellerken, fazla ekspresyonunun metastazı artırdığı düşünülmektedir (52).



Şekil 2.8. Cygb'nin görünümü (Mathai'den 52).

Nln Frederic Checler ve meslektaşları tarafından keşfedilen M3 peptidaz ailesinden bir monomerik çinko endopeptidazıdır. Nln çalışmamızdaki diğer endopeptidazlar gibi genel olarak beyin hücrelerinde, sitozol ve mitokondride daha fazla eksprese olmakla beraber hücre tipine bağlı olarak plazma membranında da bulunur. Nln aynı anda birkaç nörotoksik ajanı etkisizleştirerek serebroprotektif işlem yapabilmektedir(8). Nln biyokimyasal olarak iyi karakterize edilmiştir. Nörotensin, bradikinin, anjiyotensin I ve II, P maddesi, hemopressin, dinorfin A, metorfamid ve somatostatin bilinen endojen substratlarıdır. Bu kadar çeşitli substrata rağmen Nln'nin çalışma mekanizması hala aydınlatılamamıştır.

Yapılan yeni çalışmalarla Nln aktivatörlerinin artırılması ilerleyen zamanda felcin ve diğer nöronal hasara bağlı gelişen hastalıkların tedavisinde çözüm olabilir (8).



Şekil 2.9. Nln'nin görünümü (<https://www.rcsb.org/structure/4FXY>).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Retrospektif olarak yapılan bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 18.08.2021 tarihli KAEK-599 sayılı (Ek 1) kararı ile onaylanmıştı. Çalışmamıza (TTU-2022-6148 numaralı) Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 05.12.2022 tarihli kararı ile yeterli bütçe desteği sağlanmıştır.

Projenin immünohistokimyasal değerlendirmeleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında uzman patolog tarafından kör olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı' da 2014- 2023 yılları arasında 0-18 yaş aralığında HH nedeniyle ve HH dışında kolonik rezeksiyon veya biyopsi yapılan hastalar, hastane bilgi sistemi kullanılarak elektronik hasta dosyaları üzerinden tarandı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri şu şekilde belirlendi.

HH grubu için:

- HH nedeniyle opere edilmiş ve tanısı patoloji birimi tarafından onaylanmış olmak
- Aynı hastadan alınan örneklerde her 3 zonun (ganglionik, geçiş, aganglionik) bulunması
- Ameliyatının son 10 yıl içerisinde yapılmış olması
- Biyopsi alınırken yaşının 18' in altında olması

Kontrol grubu için:

- 0-18 yaş arasında olmak
- HH, malignite, inflamatuvar ve iskemik barsak hastalıkları dışı bir nedenle ameliyat edilmiş olmak

3.2. Gruplar

HH grubu: Grupta 12 hasta mevcut olup, alınan örnek zonlarına göre 3 alt grup oluşturuldu.

Ganglionik zon grubu: 12 hastanın hepsinin ganglionik zonuna ait patoloji preparatı mevcuttu.

Geçiş zon grubu: 12 hastanın sadece 8' inde geçiş zonuna ait preparat mevcuttu.

Aganglionik zon grubu: 12 hastanın hepsinin aganglionik zonuna ait patoloji preparatı mevcuttu.

Kontrol grubu: HH dışında kolon rezeksiyonu veya biyopsisi alınan 12 hasta kontrol grubuna dahil edildi. Her grupta epitel, düz kas, plexus ve ganglion hücreleri ayrı ayrı değerlendirildi.

3.3. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Anti- NGB, poliklonal (ATLAS ANTIBODIES, HPA058596, İsveç)

Anti- NLN, poliklonal (ATLAS ANTIBODIES, HPA031862, İsveç)

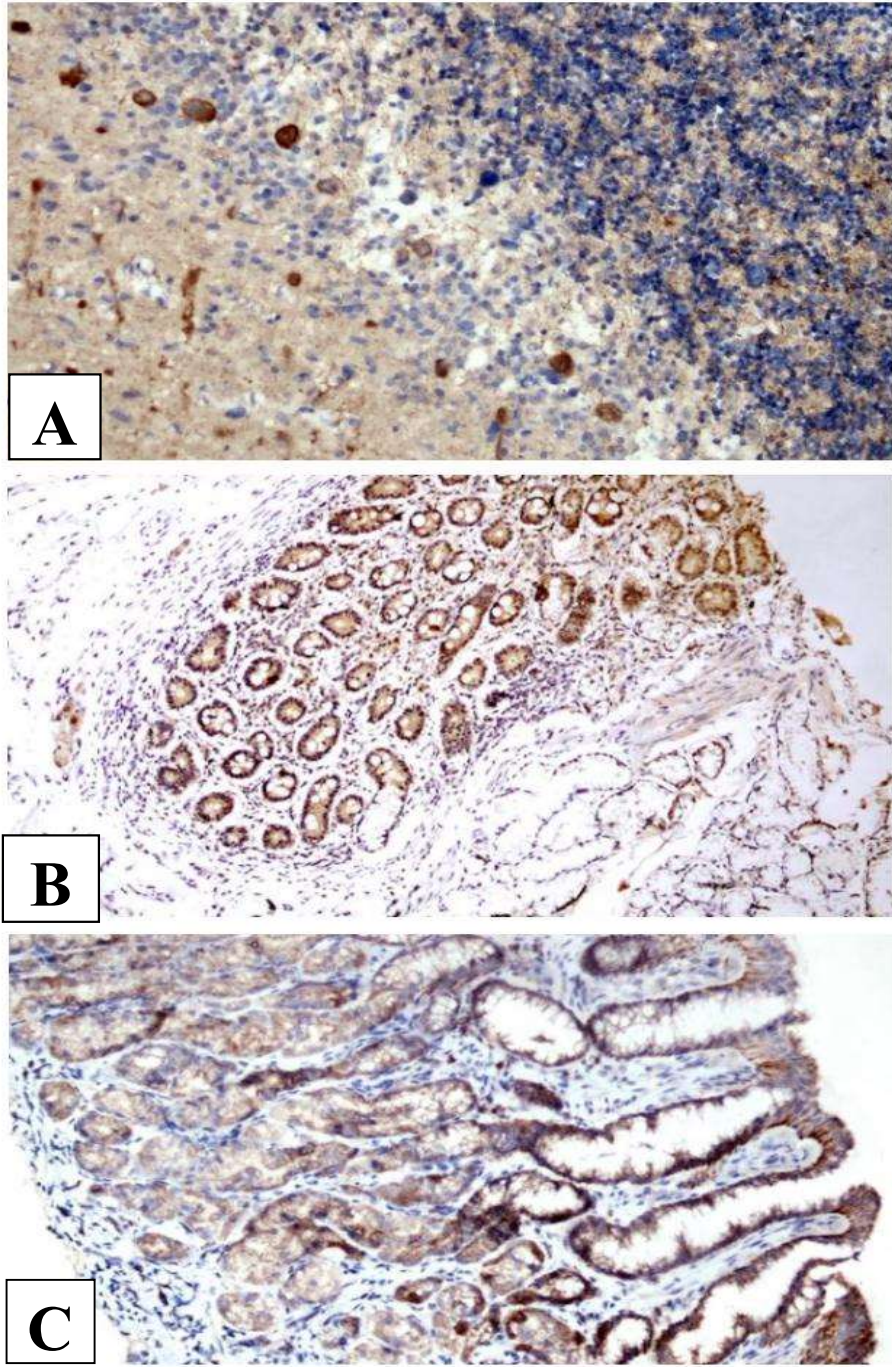
Cytoglobin Antibody, monoklonal (SANTA CRUZ, SC SC-365246, ABD)

DAB DETECTION KİT (dm847, Dako Omnis, Danimarka)

DAKO OMNIS- otomatik immunhistokimya cihazı (Danimarka)

3.4. İmmünohistokimyasal İnceleme

Çalışmaya alınan hastaların parafin blokları Patoloji Anabilim Dalı Arşivinden temin edildi. Preparatlar önce herhangi bir işleme alınmadan, Patoloji Anabilim Dalı mikroskopu ile (Olympus Bx53) tekrar değerlendirilerek tanıları doğrulandı. Daha sonra preparatlar mikrotom cihazları kullanılarak 4 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler tam otomatik Dako Omnis boyama makinesinde standart immunhistokimya prosedürü kullanılmak üzere işlendi.



Şekil 3.1. Antikorların pozitif kontrol dokularında boyanması.

(A- Ngb purkinje hücresinde (X200), B- Cygb duodenumda (X100), C- Nln midede (X200) boyanması).

Makinede uygulanan immünohistokimya prosedürü:

1. İki seri sırasıyla ksilolde 10 dakika, %100 alkolde 5 dakika, %85' lik alkolde 5 dakika ve %75' lik alkolde 5 dakika bekletilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı.

2. Kesitler, distile su ile yıkandı.

3. Kesitler, 90 °C sıcaklıkta antijen retrieval solüsyonda önce 20 dakika ve devamında iki kere 5' er dakika süre ile kaynatıldı.

4. Kaynatma işleminin tamamlanmasının devamında kesitlere 30 dakika soğutma işlemi uygulandı.

5. Kesitler distile su ve PBS solüsyonu ile yıkandı.

6. Kesitlere H₂O₂ (Hidrojen peroksit) solüsyonunda 10 dakika süreyle endojen peroksit blokajı uygulandı.

7. Endojen peroksit blokajı sonrasında kesitlere, distile su ve PBS solüsyonu ile yıkama yapıldı.

8. MLH1 (G168-15, thermo) 1/25, Anti MSH2 (epr210172, abcam) 1/1000, PMS2 (163C1251, thermo) 1/300, MSH6 (3E1, mab, cell signaling) 1/200, P53 (Pab240, thermo) 1/200, AMF (bs-10419r, bioss) 1/400, AMFR (bs-6511r, bioss) 1/150 oranlarında dilüe edilip spesifik primer antikorlar, kesitler üzerine uyguladı. Nemli ortamda 1 saat inkübasyona alındı.

9. İnkübasyon sonrasında kesitler üzerine sekonder antikor uygulanarak kesitler 10 dakika bekletildi.

10. Kesitler distile su ve PBS ile yıkandı.

11. Kesitler üzerine HRP (Streptavidin Peroksidaz) uygulanarak 10 dakika boyunca beklenildi. Sonrasında kesitler, distile su ve PBS ile yıkandı.

12. DAB (Diamino Benzidine Solüsyonu) solüsyonu kesitlere uygulanarak 2 dakika beklenildi. Sonrasında distile su ve PBS ile yıkandı.

13. Kesitler şale içine alınarak Hematoksilen solüsyonunda 2 dakika bekletildi. Sonrasında musluk suyunda yıkandı.

14. Kesitler, %80 alkolde 5 dakika, %96 alkolde 5 dakika, %100 alkolde 5 dakika ve iki seri ksilolde 5'er dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı.

15. Kesitler entellan aracılığıyla lamel ile kapatılıp ışık mikroskopunda değerlendirilerek, olgulara özel antikor skorları kayıt altına alındı.

3.5. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ngb, Cygb ve Nln immünohistokimyasal boyama sonuçları değerlendirilirken barsak dokusuna ait preparatların epitel, düz kas, pleksus (Auerbach ve Meissner) ve ganglionları uzman patolog tarafından incelendi.

Ngb, Cygb, Nln'nin pozitif boyanması ganglion hücrelerinin sitoplazmik boyanması olarak tanımlandı. İmmünohistokimyanın değerlendirilme kriteri olarak belirlenen kriterlere göre dokuların Ngb, Cygb ve Nln antikoru ile boyanma değerleri 0 ile +3 arasında skorlanarak değerlendirildi. 0: Negatif (boyanma yok); 1+: Hafif derecede boyanma, 2+: orta derecede boyanma, 3+: Şiddetli boyanma. Laminin immünohistokimyasal boyanmasında, Auerbach ve Meissner pleksusunu çevreleyen bazal membran boyanması değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Mevcut hasta gruplarındaki preparatların immünohistokimyasal değerlendirilmesi histolojik olarak epitel, düz kas, ganglion ve pleksus düzeyinde ayrı ayrı yapılmıştır.

Aganglionik zon grubu ile kontrol grubu ve ganglionik zon grubu ile aganglionik zon gruplarına göre boyanmanın şiddeti değerlerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ve MS-Excel 2024 programları kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmanın HH grubunda HH nedeniyle ameliyat edilen ve cerrahi tedavisi sonlanan 12 hasta, kontrol grubunda HH dışında başka bir nedenle ameliyat edilen 12 hasta değerlendirilmiştir.

HH grubunda 5 E, 7 K, en küçük hastamız 1 aylık, en büyüğü 130 aylık iken biyopsi alınmıştır. Bu grubun yaş ortalaması 31 ay iken, ortanca yaşı 14 aydır.

Kontrol grubunda 6 E, 6 K hasta, en küçüğü 1 aylık en büyüğü 33 aylık iken biyopsi alınmıştır. Bu grubunda yaş ortalaması 17 ay hesaplanırken, ortanca yaşı 20 aydır.

Ngb'nin immünohistokimyasal boyanma sonuçları.

Ngb'nin aganglionik zon ve kontrol grubunun pleksusta boyanma şiddeti açısından değerlendirilmesinde istatistiksel farklılık tespit edilmiştir ($p<0.001$). Aganglionik zon grubunda boyanma şiddetinin medyan değeri 0.0, kontrol grubunda boyanma şiddetinin medyan değeri 1.5 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aganglionik zon ve kontrol grubunun ganglion hücresinde boyanma şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.001$). Aganglionik zon grubunda boyanma şiddeti medyan değeri 0.0, kontrol grubunda boyanma şiddeti medyan değeri 1.0'dir.

Tablo 4.1. Ngb'nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin karşılaştırılması.

		Aganglionik zon	Kontrol	Test İstatistiği	
		Ort±SS	Ort±SS		
		Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)	z	p
Nöroglobin	Epitel	0.00±0.00 0.0 (0-0)	0.00±0.00 0.0 (0-0)	z=0.001	0.999
	Düz Kas	0.00±0.00 0.0 (0.0)	0.00±0.00 0.0 (0-0)	z=0.001	0.999
	Pleksus	0.17±0.39 0.0 (0-1)	1.58±0.90 1.5 (0-3)	z=3.703	<0.001*
	Ganglion Hücresi	0.00±0.00	1.83±1.03	z=4.529	<0.001*

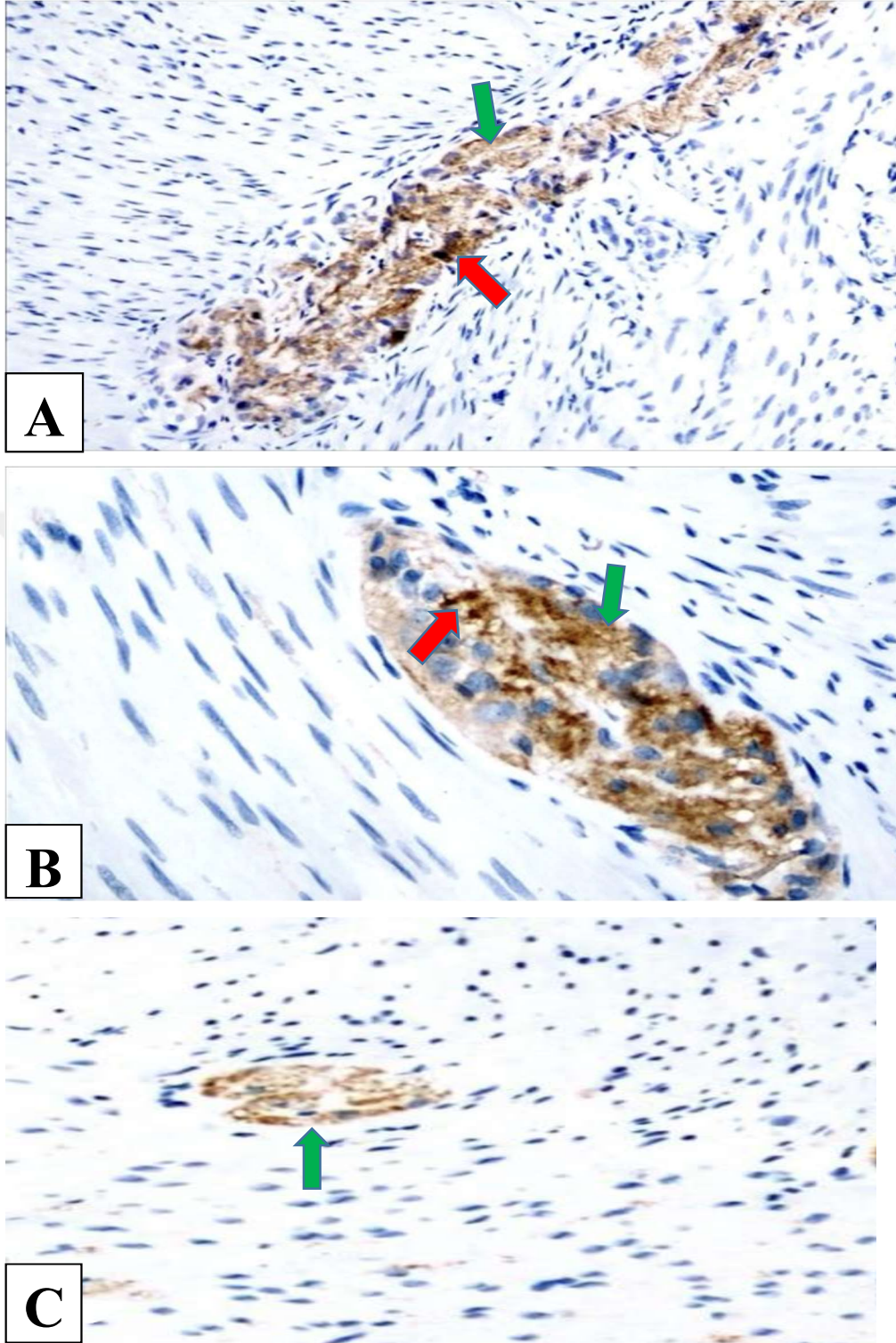
*($p<0.05$)

NGB'nin immünohistokimyasal boyanması ganglionik zon grubunda ganglion düzeyinde değerlendirildiğinde, 5 hastanın şiddetli, 5 hastanın orta şiddetli, 2 hastanın da hafif boyandığı gözlemlendi.

Kontrol grubunda aynı değerlendirilme yapıldığında, 5 hastanın şiddetli, 7 hastanın hafif düzeyde boyandığı izlendi.

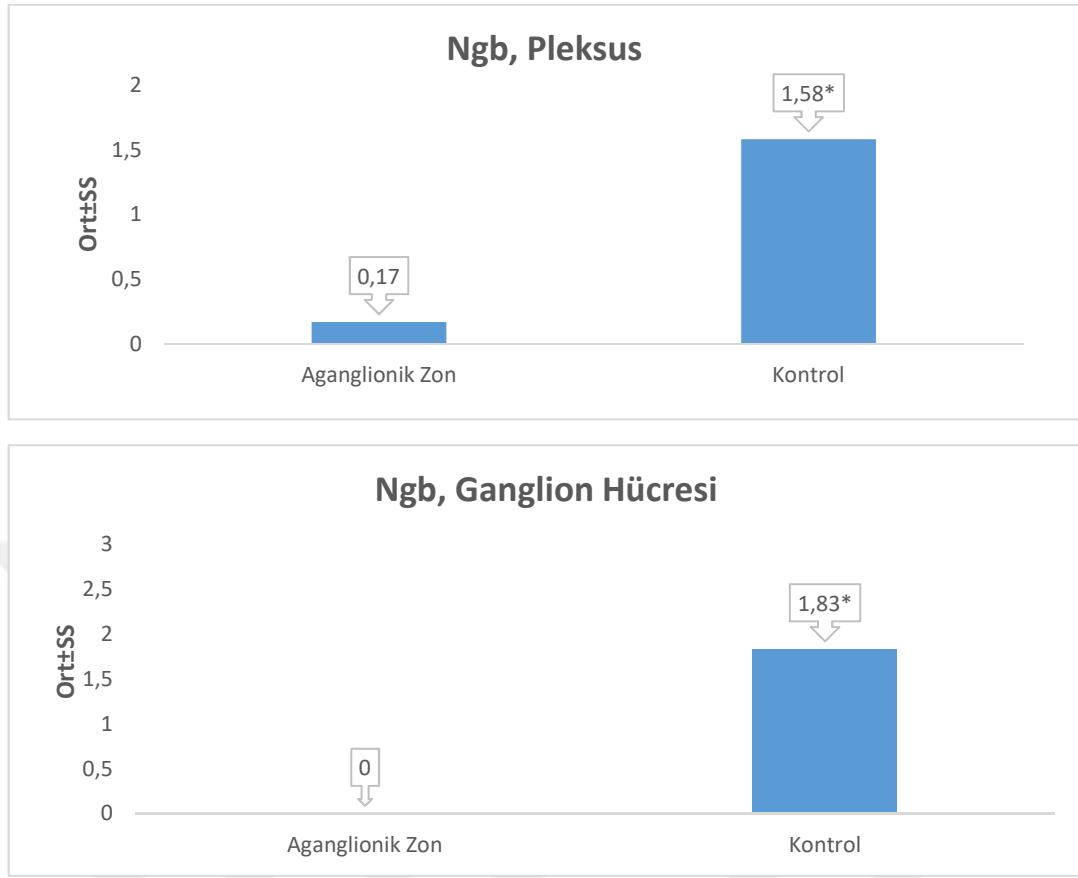
Aganglionik zon grubunda ise değerlendirilme yapıldığı zaman 12 hastanın hiçbirinde pleksusta ganglion boyanması izlenmedi.





Şekil 4.1. Ng2'nin immünohistokimyasal boyanması.

Kontrol grubunda (A) (x200) ve ganglionik zon grubunda (B) (x400) plexus ve ganglionun şiddetli boyanması, (C) aganglionik zon grubunda plexusun zayıf boyanması (x100). (Yeşil ok plexusu, kırmızı ok ganglionu göstermektedir).



*(p<0.05)

Şekil 4.2. Ng2'nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.

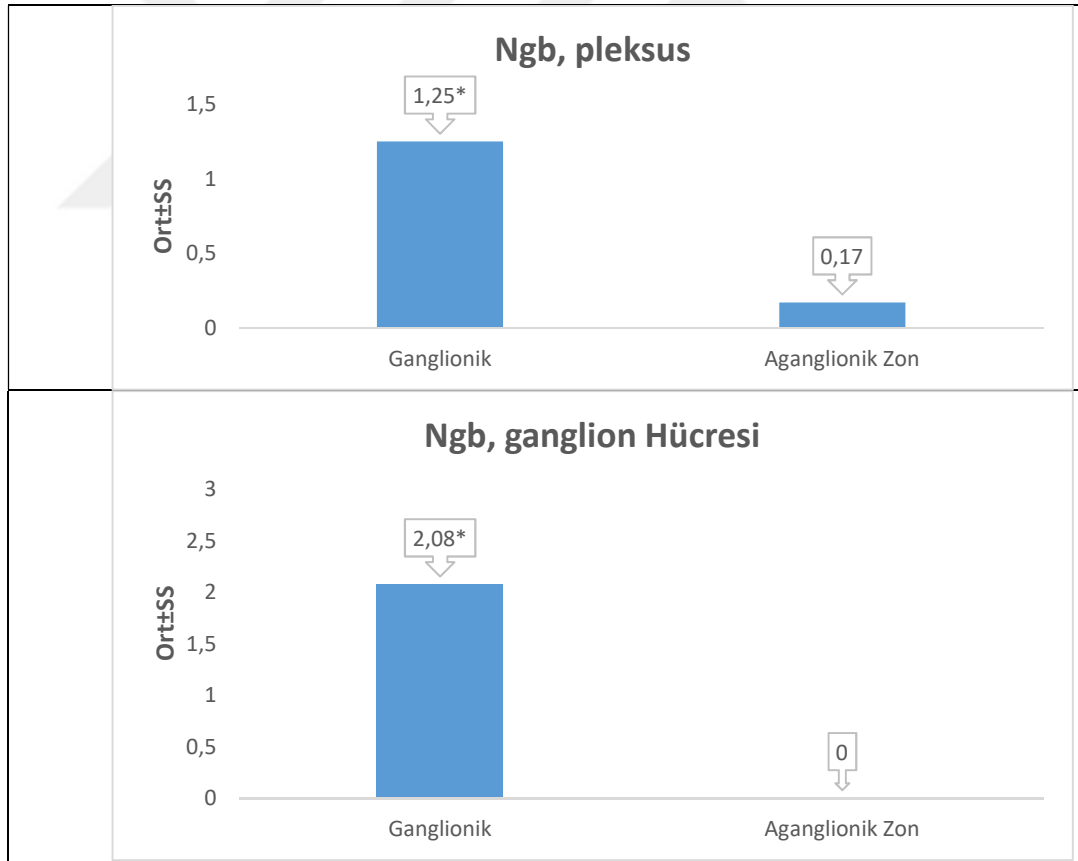
HH alt gruplarının kendi aralarında yapılan değerlendirilmede ganglionik ve aganglionik zon gruplarının pleksusta Ng2 açısından boyanma şiddeti de istatistiksel olarak anlamlı farklılıkla sonuçlanmıştır (p<0.001). Ganglionik zon grubunda pleksusta boyanma şiddeti medyan değeri 1.0, aganglionik zon grubunda boyanma şiddetinin medyan değeri 0.0 olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber ganglionik ve aganglionik zon gruplarının Ng2 açısından ganglion hücresinde boyanma şiddeti de istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir (p<0.001). Ganglionik zon grubunda ganglion hücresinde boyanma şiddeti medyan değeri 2.0 iken, aganglionik zon grubunda boyanma şiddetinin medyan değeri 0.0'dır.

Ng2'de epitel ve düz kas hücresinde boyanma şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0.05).

Tablo 4.2. Ngb'nin ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarının boyanma şiddetinin karşılaştırılması.

		Ganglionik zon	Aganglionik zon	Test istatistiği	
		n (%)	n (%)	χ^2	p
Nöroglobin	Epitel				
	Negatif	12 (100.0)	12 (100.0)	-	
	Düz Kas				
	Negatif	12 (100.0)	12 (100.0)	-	
	Pleksus				
	Negatif	0 (0.0)	10 (83.3)	$\chi^2=17.143$	<0.001*
	Pozitif	12 (100.0)	2 (16.7)		
	Ganglion Hücresi				
	Negatif	0 (0.0)	12 (100.0)	$\chi^2=24.000$	<0.001*
	Pozitif	12 (100.0)	0 (0.0)		

*(p<0.05)



*(p<0.05)

Şekil 4.3. Ngb'nin ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.

Cygb'nin immünohistokimyasal boyama sonuçları.

Aganglionik zon ve kontrol gruplarının Cygb açısından boyanmasının şiddeti değerlendirildiğinde epitel, düz kas ve pleksus'da boyanma şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Lakin bu grupların ganglionda Cygb açısından boyanması değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmektedir ($z=3.391$, $p=0.005$). Aganglionik zon grubunda boyanma şiddetinin medyan değeri 0.0, kontrol grubunda boyanma şiddetinin medyan değeri 1.0'dir.

Tablo 4.3. Cygb'nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin karşılaştırılması.

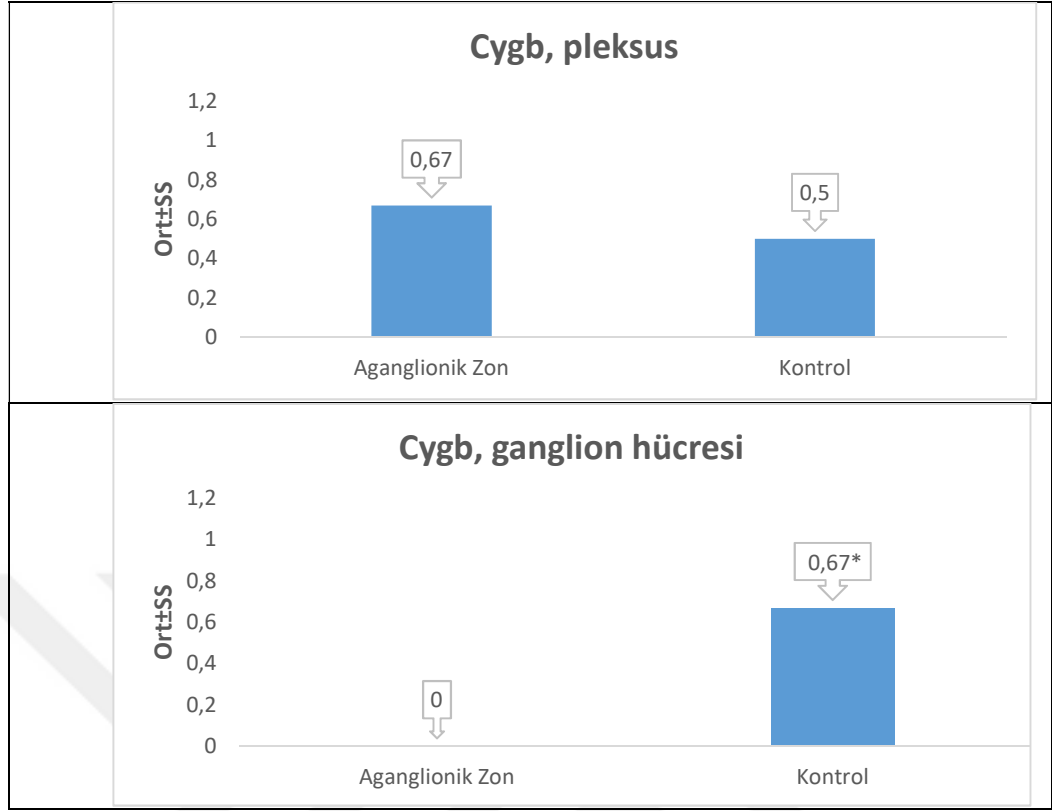
		Aganglionik	Kontrol	Test İstatistiği	
		Ort±SS Medyan (Min- Max)	Ort±SS Medyan (Min-Max)	z	p
Sitogloblin	Epitel	0.83±0.72	0.83±0.39	z=0.139	0.932
		1.0 (0-2)	1.0 (0-1)		
	Düz Kas	0.75±1.14	1.17±0.72	z=1.590	0.143
		0.0 (0-3)	1.0 (0-2)		
	Pleksus	0.67±0.49	0.50±0.52	z=0.811	0.514
		1.0 (0-1)	0.5 (0-1)		
	Ganglion Hücresi	0.0±0.00	0.67±0.49	z=3.391	0.005*
		0.0 (0.0)	1.0 (0-1)		

*($p<0.05$)

Cygb'nin immunhistokimyasal boyanması ganglionik zon grubunda ganglion düzeyinde değerlendirildiğinde 1 hastanın orta düzeyde, 10 hastanın hafif, 1 hastada da boyanma izlenmediği görüldü.

Kontrol grubunda aynı değerlendirilme yapıldığında, 9 hastada hafif düzeyde boyanma izlendi, 3 hastada ise boyanma izlenmedi.

Aganglionik zon grubunda ise değerlendirilme yapıldığı zaman 12 hastanın hiçbirinde ganglion düzeyinde boyanma izlenmemiştir.



*(p<0.05)

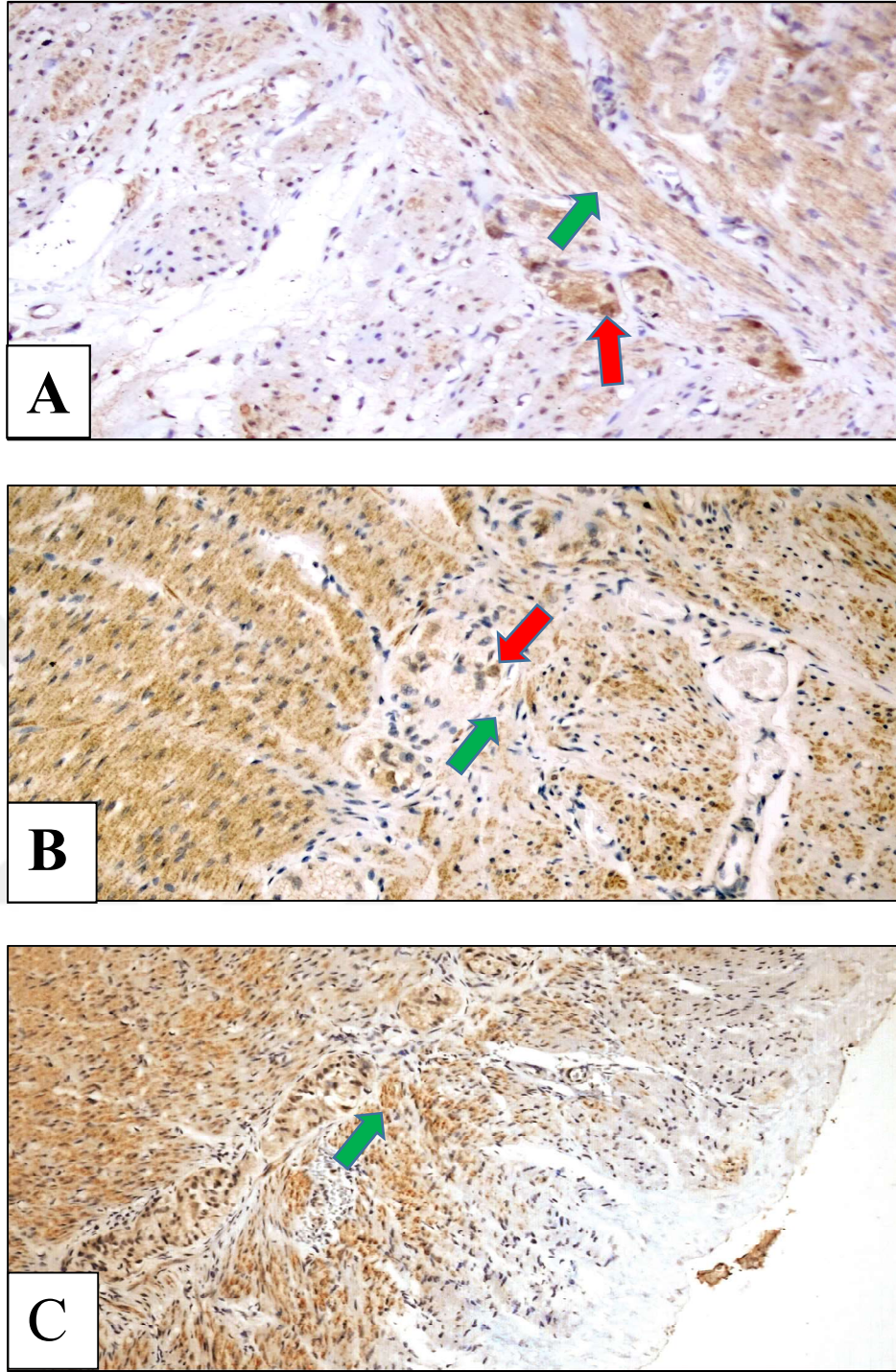
Şekil 4.4. Cygb'nin aganglionik zon ve kontrol gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.

HH'nın Ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarının Cygb ile boyanma şiddeti karşılaştırıldığında ganglion düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaktadır ($z=4.000$, $p<0.001$). Ganglionik zon grubunda ganglion hücresinde boyanma şiddeti medyan değeri 1.0 iken, Aganglionik zon grubunda boyanma şiddeti medyan değeri 0.0'dır.

Tablo 4.4. Cygb'nin ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarında boyanmanın şiddetinin karşılaştırılması.

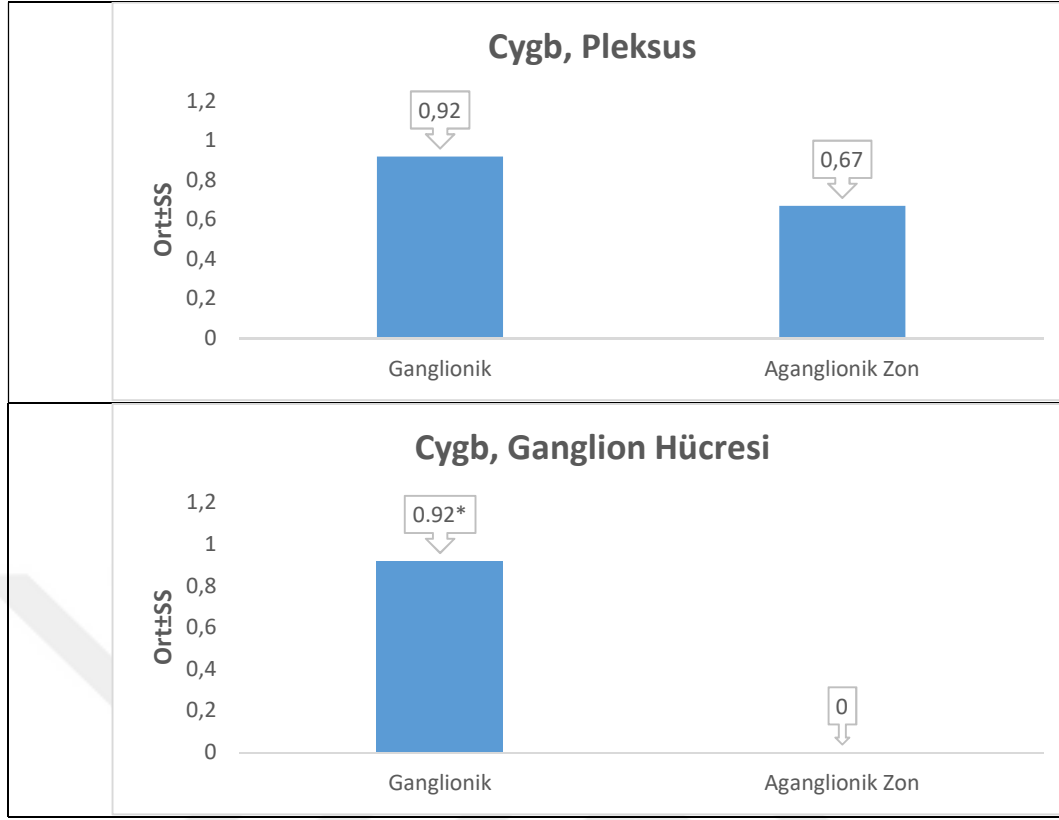
		Ganglionik zon	Aganglionik zon	Test İstatistiği	
		Ort±SS Medyan (Min-Max)	Ort±SS Medyan (Min-Max)	z	p
Sitogloblin	Epitel	0.42±0.67 0.0 (0-2)	0.83±0.72 1.0 (0-2)	z=1.529	0.178
	Düz Kas	0.92±0.79 1.0 (0-3)	0.75±1.14 0.0 (0-3)	z=1.108	0.319
	Pleksus	0.92±0.29 1.0 (0-1)	0.67±0.49 1.0 (0-1)	z=1.476	0.319
	Ganglion Hücresi	0.92±0.51 1.0 (0-2)	0.0±0.00 0.0 (0.0)	z=4.000	<0.001

***(p<0.05)**



Şekil 4.5. Cygb'nin immünohistokimyasal boyanması (x 200).

Kontrol grubunda(A) (x200) ve ganglionik zon grubunda (B) (x200) ganglionun şiddetli boyanması, aganglionik zon grubunda (C) (x200) ganglionun ve pleksusun boyanmaması. (Yeşil ok pleksusu, kırmızı ok ganglionu göstermektedir).



*(p<0.05)

Şekil 4.6. Cygb'nin aganglionik zon ve ganglionik zon gruplarının boyanma şiddetinin grafiği.

Nln'nin dokularda immünohistokimyasal boyanmaması nedeniyle veri elde edilemedi.

Çalışma yapıldığı sırada transizyonel zon grubu için preparat sayısı yetersiz ve sonuçlar homojen olmadığı için değerlendirilmeye alınmadı.

5. TARTIŞMA

HH genellikle distal kolonun, bazen tüm kolonun, nadiren de tüm barsakların miyenterik ve submukozal plexuslarında ganglion hücrelerinin yokluğu ile karakterize barsağın inervasyon bozukluğudur (2,53). Etiyolojisi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, genel kabul görmüş teoride hastalığın temel sorunu olan aganglionezis, gebeliğin 4-12 haftaları arasındaki gerçekleşmesi gereken nöral krest göçündeki bozuklukla ilişkilendirilmektedir (53,54). Etiyolojiyi aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalardan ortaya çıkan diğer teori de ise hastalarda ganglionların kraniokaudal göçünün sorunsuz olduğu, ancak daha sonra ganglionların yetersiz mikroçevreye bağlı olarak gelişemediklerini ve nekroza gittiğini göstermişler (54,55).

Moleküler genetiğin son zamanlardaki gelişmeleri hastalıkla ilişkili genlerin ortaya çıkmasına ve bu genlerin hem etiyoloji hem de hastalığın kalıtım şeklinin aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Ailesel vakalarının nerdeyse yarısında ve sporadik vakaların ~%20'nde RET protoonkogeni ön plana çıkmaktadır. HH'nda vakalarının %70'i izole bir hastalık olarak ortaya çıkmakta olup, %30'nda ek anomalilerle beraber seyretmektedir. Trizomi 21 (Down sendromu) vakalarının %10'nda HH'na rastlanmaktadır (2,5,54).

Bu çalışmadaki amacımız Ngb, Cygb ve Nln'nin HH'da barsak segmentindeki ekspresyonunu değerlendirerek literatüre yeni bir katkı sağlamaktır. Daha çok HH'da etiyolojiyi aydınlatmaya yönelik olarak tasarladığımız bu çalışma intrauterin dönemde ganglionların nöral göç sonrası mikroçevre sorunlarından iskemi veya hipoksinin rolünü değerlendirmektir.

Literatüre baktığımızda çalışmamız, HH'da Ngb, Cygb ve Nln'nin barsaktaki ekspresyonunu değerlendiren ilk çalışmadır.

Ngb tipik bir miyoglobin benzerliği olan, globin ailesinin hemoglobin ve miyoglobinden sonra bulunan 3.üyesidir. Esas olarak merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi nöronlarında ve bazı endokrin dokularda eksprese edilir. Beyinde hipoksik ve iskemik koşullar altında yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Hücresel hasarın başlıca nedeni olan reaktif oksijen radikalleri ve azot türlerini temizlemeğe çalışır. Diğer dokular arasında, Ngb ekspresyonu kemik, karaciğer,

sigmoid kolon, rektum ve böbrekte en yüksek düzeyde bulunmakta olup, cilt, kas ve akciğerde ise düşük düzeyde veya yok denecek kadar azdır (51).

Shang ve ark. 2022 de yaptığı deneyde farenin beyin dokusunun hipoksi sonrası yüksek eksprese olan Ngb seviyeleri anlamlı bulunmuştur. Bu çalışma Ngb ekspresyonunun kortikal gelişim sırasında ve hafif hipoksik stres altında protein düzeyinde çok ayrıntılı olarak incelendi. Sonuç olarak fare kortikogenezinde hem fizyolojik hem de egzersiz hipoksisi koşullarında Ngb'in nöroprotektif rolünü daha da açıkladı (9).

Jiang ve ark. 2019 da yayımlanan çalışmasında hipoglisemi atağı geçiren 100 yenidoğan çocukta serum Ngb düzeyleri değerlendirilmiştir. Hastalar kliniği ve elektroensefalografi bulgularıyla bu gruplara ayrılmışlar (56):

Semptomatik hipoglisemik beyin hasarı grubu (n=22), asemptomatik hipoglisemik beyin hasarı grubu (n=37) ve hipoglisemik beyin hasarı olmayan grup (n=41). Yapılan ölçümlerde hipoglisemik beyin hasarı olmayan grupla karşılaştırıldığında, asemptomatik hipoglisemik beyin hasarı grubunda kan şekeri ve modifiye ensefalografi skorları anlamlı derecede düşük, Ngb seviyeleri anlamlı derecede yüksek ve hipoglisemi süresi anlamlı derecede uzundu ($p<0,05$). Sonuç olarak elektroensefalografi skoru gibi serum Ngb de hipoglisemili yenidoğanlarda beyin hasarının değerlendirilmesinde spesifik bir gösterge olarak kullanılabilir ve klinik pratikte belirli bir değere sahip olduğu bildirilmiştir (56).

Cygb yaygın bir şekilde tüm dokularda eksprese edilmekte olan hemoglobin, miyoglobin ve Ngb'den sonra keşfedilen globin ailesinin 4. üyesidir. Superoksit dismutaz aktivitesine sahip olduğu gösterilen globin ailesinin tek üyesidir(6). Cygb oksidatif strese karşı koruma sağlarken, bunun mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Bu nedenden dolayı Cygb'nin süperoksit metabolizması üzerindeki etkisi bilinmemektedir (6).

Cygb ve Ngb'in in vitro ve in vivo hipoksik veya iskemik koşullar altında yüksek ekspresyonu, hücre sağkalımını artırır ve oksidatif hasarın önlenmesinde rolü olduğunu düşündürür (51). Cygb'nin aminoasit zinciri görüntüsünde hem distal hem de proksimal ucunda histidin imidazol gruplarını mevcuttur. Bu imidazol grupları herhangi dış ligand (oksijen, azotmonoksit, karbonmonoksit) bağlanması

halinde yerinden kopmaktadır. Bu olay Cygb'nin hem hücrel hipoksiye hem de oksidatif strese karşı koyabildiği öne sürmektedir (52) .

Fordel ve ark. 2004 de yaptığı çalışmada Cygb'nin hipoksiye maruz kalan dokularda ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir (57). Fareler üzerinde yapılan çalışmada beyin, iskelet, kalp kası ve karaciğer dokularında Cygb'nin ve Ngb değerlendirilmiştir. Bunun için fareler farklı hipoksik düzeylerde farklı sürelerde takip edilmiş olup, alınan örnekler anlık PCR ile değerlendirilmiş, Cygb ve Ngb'nin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (57).

Okayasu ve ark. 2011'de yayımlanan çalışmasında ülseratif kolitli ve kolon kanseri olan hastaların barsak duvarında yapılan çalışmada Cygb'nin değişken korelasyonu mevcut olup, bunun hastalığının ve patolojinin durumuna bağlı değişkenlik gösterebileceğini ifade etmektedirler (58). Çalışmada Cygb serbest radikal temizleyici olarak ve kollajen oluşumunda, oksidatif stres ve hipoksiye karşı koruma sağlayan iki fazlı bir işleve sahip olduğu savunulmaktadır (58).

Bizim çalışmamızda Ngb ve Cygb ganglionik zon ve kontrol grubunda benzer şekilde eksprese olup, aganglionik zon grubunda plexus ve ganglion düzeyinde düşük seviyede boyanması 2 şekilde ifade edilebilir.

Birincisi ganglionik barsak segmentine göç eden ganglionların tutunabilmesi için uygun mikroçevre oluşmamıştır. Gelişen inflamasyon sonucu eksprese olması gereken Ngb, ekspresyonu tetikleyen yolların yetersizliği nedeniyle gereken düzeyde oluşamadığını düşünmekteyiz.

İkincisi uygun mikroçevre şartlarının oluşmaması sonucu gelişen inflamatuvar süreçte fazla salınan inflamatuvar mediatörleri nötralize etmek için tüketimin artması nedeniyle yetersiz ekspresyona neden olmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Ngb'nin aşırı ekspresyonunu destekleyen çalışmalarda serbest oksijen radikalleri ve NO'nun hipoksik alanlarda aşırı birikimini engellemektedir. Yaptığımız çalışmanın ilerleyen zamanda daha da anlamlı hale gelmesi için eş zamanlı olarak Ngb ve Cygb ile beraber, serbest oksijen radikalleri ve NO' nun dokudaki ekspresyonunu da değerlendirmek anlamlı olabilir. Yapılacak çalışmalarda hipoksiye bağlı aganglionik segmentte radikallerin ekspresyonunun sonuçları etiyoloji için yeni fikir ve katkı sağlayabilir.

Nln metallopeptidazların M3 ailesine ait bir çinko endopeptidazıdır. Çeşitli biyoaktif peptitleri işleme görevi bulunur. Nln merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunmaktadır. Nln'nin aktivasyonunun, oksidatif stresi, eksitotoksisiteyi, nöroinflamasyonu ve beyin ödemi azaltarak deneysel felç modellerinde koruyucu bir mekanizma olduğu gösterilmiştir.

Literatüre baktığımızda Nln ile ilgili intestinal sistemde herhangi bir değerlendirilmeye rastlanmamaktadır. Mevcut çalışmalar genellikle farelerin beyin dokusunda yapılmıştır (59).

Rashid ve ark'nın 2013 de yaptığı çalışmada orta serebral arter tıkanıklığı modeli ile iskemi reperfüzyon sonrası etkilenen fare beyinde farklı bölgelerinde Nln yüksek düzeyde eksprese olması istatistiksel olarak da anlamlı saptanmıştır (59). Bu çalışmada, ilk kez, inmede orta serebral arter tıkanıklığı modelinde fokal iskemi-reperfüzyondan etkilenen fare beyinin değerlendirilmesini içermiştir. Bu peptidazın çeşitli peptiderjik iletim sistemlerini etkileyerek beyin inmeye verdiği yanıtı ve inme sonrası iyileşmeyi düzenleyen süreçlerde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (59). Ek olarak, bu çalışma, inmeden sonra en az 7 gün boyunca iskemi sonrası fare beyin zarlarında Nln sürdürülebilir işlevsel yüksek ekspresyonunun düzenlenmesini belgelemektedir (59).

Bizim tez çalışmamızda değerlendirilen Ngb, Cygb ve Nln'den sadece Nln immünohistokimyasal boyama sonuçları tüm deneklerde boyanma göstermemiş olup, sadece HH ganglionik zon grubunda 3 hastada pleksusta hafif şiddette boyanmıştır. Bu da istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Mevcut durumun daha da detaylı değerlendirilmesi için daha büyük bir hasta grubuyla çalışılması gerekebilir.

6. SONUÇLAR

HH'da etiyolojiyi aydınlatmaya yönelik immünohistokimyasal boyama yöntemiyle yapılan çalışmada Ngb, Cygb ve Nln'in ekspresyonu değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular literatürle kıyaslandığında aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

- 1) HH'nın etiyolojisi net olarak aydınlatılmamış olup, bilinen teoriler dışında hipoksinin etiyolojideki yeri ve etkisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmamızda ganglionik ve aganglionik barsak segmentleri değerlendirildi. Ngb ve Cygb aganglionik segmentin epitel ve düz kaslarında normal düzeyde saptandı. Lakin Ngb pleksus ve ganglionlarda boyanmadı. Cygb ise pleksusta boyanıp, ganglionlarda boyanmadı. Bu sonuçlar ya ekspresyon için gereken yolların bozukluğu ya da tüketimin artışına bağlı olarak yorumlanmaktadır.
- 2) Mevcut tez çalışması immünohistokimyasal boyama ile yapılmış olup, bu aynı zamanda HH da tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Çalışmadaki gruplar arasında ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılıklar olduğunu saptadık. Bu yöntemle endopeptidazların ekspresyon düzeyleri HH için kıymetli bir tanı yöntemi olabilir.
- 3) Çalışmamızdaki endopeptidazların aganglionik segmentlerde düşük düzeyde ekspresyonunun daha da detaylı değerlendirilmesinin uygun olduğu görüşündeyiz. Bunun için endopeptidazlarla beraber eş zamanlı serbest oksijen radikalleri ve diğer azot artıkları değerlendirilmelidir.
- 4) Çalışmada ekspresyonu değerlendirilen Ngb, Cygb ve Nln'nin nöroprotektif olmasına rağmen, Ngb ve Cygb ganglionik segmentin epitel ve düz kaslarında belirgin boyanmış olup, pleksus ve ganglionlarda negatif boyama göstermekteydi. Ancak Nln'e baktığımızda ise o barsağın herhangi katmanında boyanma göstermemektedir.
- 5) Ngb, Cygb ve Nln'nin hipoksik hasar sonrası ekspresyonu artan yeni nesil peptidazlar olup, bu ajanların HH'nda daha geniş serilerle değerlendirilmesi anlamlılık kazanabilir.

7. ÖZET

Amaç: HH distal barsağın miyenterik ve submukozal pleksuslarında ganglion hücrelerinin yokluğu ile karakterize ESS gelişimsel bir bozukluğudur. Genel kabul görmüş teoride hastalığın temel sorunu olan aganglionezis, gebeliğin 4-12 haftaları arasındaki gerçekleşmesi gereken nöral krest göçündeki bozuklukla ilişkilendirilmektedir. Etiyolojiyi aydınlatan diğer teori ise hastalarda ganglionların kraniokaudal göçünün sorunsuz olduğu, ancak daha sonra ganglionların yetersiz mikroçevreye bağlı olarak gelişemediklerini ve hayatta kalamadıklarını göstermişler. Bu çalışmadaki amacımız literatürde daha önce araştırma konusu olmayan Ngb, Cygb, Nln'nin HH'da barsak segmentindeki ekspresyonunu değerlendirerek literatüre yeni bir katkı sağlamaktır.

Gereç ve Yöntem: Merkezimizde ameliyat edilmiş ve histopatolojik olarak HH tanısı almış 12 hasta ve kontrol grubunda HH dışı nedenlerle ameliyat edilmiş 12 hastaya ait patoloji materyalleri retrospektif olarak değerlendirildi. Dokular immünohistokimyasal yöntemlerle boyanarak Ngb, Cygb ve Nln'nin barsak duvarındaki ekspresyonu değerlendirilerek karşılaştırıldı.

Bulgular: Ngb'nin aganglionik zon ve kontrol grubunun pleksusta boyanma şiddeti açısından değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. HH alt gruplarının kendi aralarında yapılan değerlendirilmede ganglionik ve aganglionik zon gruplarının pleksusta Ngb açısından boyanma şiddeti de istatistiksel olarak anlamlı farklılıkla sonuçlanmıştır. HH'nin ganglionik zon ve aganglionik zon gruplarının, aynı zamanda HH aganglionik zon grubu ile kontrol grubunun Cygb ile boyanma şiddeti karşılaştırıldığında ganglion düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaktadır. Bu çalışmada Nln ile immünohistokimyasal boyamada dokuların boyanmadığı izlenmiş olup, anlamlı sonuç alınamamıştır.

Sonuçlar: HH'da etiyolojiyi değerlendirilen bu çalışmada endopeptidazlardaki düşük ekspresyonun nedeni, ekspresyon için gereken yolakların bozukluğu ya da tüketimin artışına bağlı azalması olarak yorumlanmaktadır.

Çalışmamız histokimyasal boyama ile yapılmış olup, bu aynı zamanda HH da tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Çalışmadaki gruplar arasında ekspresyon

düzeylelerinde anlamlı farklılıkları olduğunu saptadık. Bu yöntemle endopeptidazların ekspresyon düzeyleri HH için kıymetli bir tanı yöntemi olabilir. Ngb, Cygb, Nln'nin hipoksik hasar üzerine ekspresyonu artan yeni nesil peptidazlar olup, onların HH'nda daha geniş serilerle değerlendirilmesi anlamlılık kazanabilir.

Anahtar kelimeler: Hirschsprung hastalığı, immünohistokimyasal, nöroglobin, sitoglobin, nörolizin



8. ABSTRACT

Aim: Hirschsprung's disease (HD) is a developmental disorder characterized by the absence of ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses of the distal bowel. According to the widely accepted theory, the fundamental pathology of the disease aganglionosis- is associated with a disruption in neural crest cell migration, which is expected to occur between the 4th and 12th weeks of gestation. An alternative etiological theory suggests that although the cranio-caudal migration of ganglion cells occurs normally, these cells fail to develop or survive due to an inadequate microenvironment. The aim of this study is to contribute novel findings to the existing literature by evaluating the expression of neuroglobin (Ngb), cytoglobin (Cygb) and neurolysin (Nln) in intestinal segments of patients with HD, which has not been previously explored.

Material and Method: Pathological specimens from 12 patients who underwent surgery at our center and were histopathologically diagnosed with HD, as well as 12 patients operated for non-HD related conditions (control group), were retrospectively analyzed. The tissues were stained using immunohistochemical methods to assess and compare the expression levels of Ngb, Cygb, and Nln in the intestinal wall.

Results: A statistically significant difference was identified in the staining intensity of Ngb within the plexus when comparing the aganglionic zone and the control group. In the subgroup analysis of HD, a statistically significant difference in Ngb staining intensity was also observed between the ganglionic and aganglionic zones. Furthermore, when comparing the Cygb staining intensity at the ganglion level between the ganglionic and aganglionic zones of HD, as well as between the HD aganglionic zone and the control group, statistically significant differences were found. In contrast, immunohistochemical staining with Nln revealed no detectable staining in the tissues, and thus no meaningful results could be obtained.

Conclusion: In this study evaluating the etiology of HD, the reduced expression of endopeptidases is interpreted as a consequence of either disruptions in the pathways required for expression or decreased levels due to increased consumption. The study was conducted using histochemical staining, which also serves as a diagnostic

method in HD. We identified statistically significant differences in expression levels among the study groups. Accordingly, evaluating endopeptidase expression levels using this method may represent a valuable diagnostic tool for HD.

Keywords: Hirschsprung's disease, immunohistochemical, neuroglobin, cytoglobin, neurolysin



9. KAYNAKLAR

1. Langer JC. Pediatric Surgery, Hirschsprung disease. In Elsevier; 2012. p. 1265–78.
2. Montalva L, Cheng LS, Kapur R, Langer JC, Berrebi D, Kyrklund K, et al. Hirschsprung disease. Nat Rev Dis Primers. 2023 Oct 12;9(1):54.
3. Burulday B. Hirschsprung Hastalığı Tanısıyla Transanal Endorektal Pull Through Ameliyatı Yapılan Olguların Uzun Dönem Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Gaziantep, 2020.
4. Martucciello G, Pini Prato A, Puri P, Holschneider AM, Meier-Ruge W, Jasonni V, et al. Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: A report from the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies. J Pediatr Surg. 2005 Oct;40(10):1527–31.
5. Demircan M, Gürünlüoğlu K. Hirschsprung hastalığı. Yazıcı M, editör. Yenidoğanın Cerrahi Hastalıkları. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2019. p.54-62. Yenidoğanın Cerrahi Hastalıkları. 2019. 54–62 p.
6. Zweier JL, Hemann C, Kundu T, Ewees MG, Khaleel SA, Samouilov A, et al. Cytochrome has potent superoxide dismutase function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Dec 28;118(52).
7. Blanco S, Martínez-Lara E, Siles E, Peinado MÁ. New Strategies for Stroke Therapy: Nanoencapsulated Neuroglobin. Pharmaceutics. 2022 Aug 19;14(8):1737.
8. Esfahani SH, Abbruscato TJ, Trippier PC, Karamyan VT. Small molecule neurolysin activators, potential multi-mechanism agents for ischemic stroke therapy. Expert Opin Ther Targets. 2022 May 4;26(5):401–4.
9. Shang L, Mao D, Li Z, Gao X, Deng J. Neuroglobin Is Involved in the Hypoxic Stress Response in the Brain. Biomed Res Int. 2022; 2022:8263373.
10. Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs T, et al. Neuroglobin and cytochrome in search of their role in the vertebrate globin family. J Inorg Biochem. 2005 Jan;99(1):110–9.
11. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. In 2014. p. 39–71.

12. Lake JJ, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Jul 1;305(1): G1-24.
13. Indrio F, Neu J, Pettoello-Mantovani M, Marchese F, Martini S, Salatto A, et al. Development of the Gastrointestinal Tract in Newborns as a Challenge for an Appropriate Nutrition: A Narrative Review. *Nutrients*. 2022 Mar 28;14(7).
14. Chaudhry SR, Bordoni B. *Anatomy, Thorax, Esophagus*. 2025.
15. John E. Skandalakis. *Cerrahi Anatomi- Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri*. Vol. 1,2. 2008.
16. Wilson DJ, Bordoni B. *Embryology, Bowel*. 2025.
17. Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: Twenty years of progress. *Gastroenterology*. 1999 Mar;116(3):702–31.
18. Anmol Bhatia RAŞBB. Bhatia A, Shatanof RA, Bordoni B. *Embryology, Gastrointestinal*. 2023 May 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. PMID: 30725857.
19. Chaudhry SR, Liman MNP, Omole AE, Peterson DC. *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Stomach*. 2025.
20. Collins JT, Nguyen A, Badireddy M. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine*. 2025.
21. Lopez PP, Gogna S, Khorasani-Zadeh A. *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Duodenum*. 2025.
22. Standring S. The Anatomy of the Large Intestine. In 2019. p. 27–89.
23. Maher A, Abbas M. *ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery, Anatomy and Embryology of the Colon, Rectum, and Anus*. 4th edition. 2022.
24. Miller L, Roland BC, Whitson M, Passi M, Cheung M, Vegesna A. *Clinical and Translational Aspects of Normal and Abnormal Motility in the Esophagus, Small Intestine and Colon. Physiology of the Gastrointestinal Tract, Sixth Edition*. 2018 Jan 1; 1:485–516.
25. Solan P, Davis B. *Anorectal Anatomy and Imaging Techniques*. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2025 May 6];42(4):701–12.
26. Boland M. Human digestion – a processing perspective. *J Sci Food Agric*. 2016 May 5;96(7):2275–83.

27. Huizinga JD, Lammers WJEP. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009 Jan;296(1): G1–8.
28. Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational Research*. 2013 Jul;162(1):1–15.
29. Foong D, Zhou J, Zarrouk A, Ho V, O'Connor MD. Understanding the Biology of Human Interstitial Cells of Cajal in Gastrointestinal Motility. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 25;21(12).
30. Sharkey KA, Mawe GM. The enteric nervous system. *Physiol Rev*. 2023 Apr 1;103(2):1487–564.
31. Furness JB, Stebbing MJ. The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterology & Motility*. 2018 Feb 11;30(2).
32. Niesler B, Kuerten S, Demir IE, Schäfer KH. Disorders of the enteric nervous system — a holistic view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jun 29;18(6):393–410.
33. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 May 6;9(5):286–94.
34. Deniz M. Enterik Sinir Sistemi; *Harran Üni Tıp Fak Der*. 2004;2.
35. Diposarosa R, Bustam NA, Sahiratmadja E, Susanto PS, Sribudiani Y. Literature review: enteric nervous system development, genetic and epigenetic regulation in the etiology of Hirschsprung's disease. *Heliyon*. 2021 Jun;7(6):e07308.
36. Arliss J, Holgersen LO. Neonatal appendiceal perforation and Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1990 Jun;25(6):694–5.
37. Teitelbaum DH, Coran AG. Hirschsprung's Disease and Related Neuromuscular Disorders of the Intestine. In: *Pediatric Surgery*. Elsevier; 2006. p. 1514–59.
38. Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational Research*. 2013 Jul;162(1):1–15.
39. Fleming MA, Ehsan L, Moore SR, Levin DE. The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target. *Gastroenterol Res Pract*. 2020; 2020:8024171.
40. Holschneider A, Meier-Ruge W, Ure B. Hirschsprung's Disease and Allied Disorders- A Review. *European Journal of Pediatric Surgery*. 1994 Oct 25;4(05):260–6.

41. Langer JC. Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr*. 2013 Jun;25(3):368–74.
42. Haricharan RN, Georgeson KE. Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg*. 2008 Nov 1;17(4):266–75.
43. Başaklar AC. Hirschsprung Hastalığı. Başaklar AC (ed). *Bebek ve çocukların cerrahi ve ürolojik hastalıkları*. Birinci baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. 605-54.
44. Ji Y, Tam PKH, Tang CSM. Roles of Enteric Neural Stem Cell Niche and Enteric Nervous System Development in Hirschsprung Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 7;22(18).
45. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 2000 Jul 3;81(1–3):87–96.
46. Elema JD, de Vries JA, Vos LJ. Intensity and proximal extension of acetylcholinesterase activity in the mucosa of the rectosigmoid in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1973 Jun;8(3):361–8.
47. Ikawa H, Yokoyama J, Morikawa Y, Hayashi A, Katsumata K. A quantitative study of acetylcholine in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1980 Feb;15(1):48–52.
48. Doodnath R, Puri P. A systematic review and meta-analysis of Hirschsprung's disease presenting after childhood. *Pediatr Surg Int*. 2010 Nov 20;26(11):1107–10.
49. Ikeda K, Goto S. Diagnosis and Treatment of Hirschsprung's Disease in Japan. *Ann Surg*. 1984 Apr;199(4):400–5.
50. Meier-Ruge WA, Bruder E. Current Concepts of Enzyme Histochemistry in Modern Pathology. *Pathobiology*. 2008;75(4):233–43.
51. Emara M, Turner AR, Allalunis-Turner J. Hypoxic regulation of cytoglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues. *Cancer Cell Int*. 2010 Dec 9;10(1):33.
52. Mathai C, Jourdeuil FL, Lopez-Soler RI, Jourdeuil D. Emerging perspectives on cytoglobin, beyond NO dioxygenase and peroxidase. *Redox Biol*. 2020 May; 32:101468.
53. Szyłberg L, Marszałek A. Diagnosis of Hirschsprung's disease with particular emphasis on histopathology. A systematic review of current literature. *Prz Gastroenterol*. 2014;9(5):264–9.
54. Puri P, Ohshiro K, Wester T. Hirschsprung's Disease: A Search for Etiology. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 1998 Aug 1 [cited 2025 May 10];7(3):140–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055858698700095>

55. Dede M. Histopatolojik Tanılı Rektosigmoid Hirschsprung Hastalığı Olgularında Bcl-2 Ve Laminin Ekspresyonunun Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi Ve Hirschsprung Enterokoliti İle İlişkilendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Bursa, 2023.
56. Jiang FY, Liu HP, Chen LT, Song ZR, Xu S, Guo YX, Zhou L, Wang YK, Shu GH. Clinical value of serum neuroglobin in evaluating hypoglycemic brain injury in neonates. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2019 Jun;6:573–9.
57. Fordel E, Geuens E, Dewilde S, Rottiers P, Carmeliet P, Grooten J, et al. Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jun;319(2):342–8.
58. Okayasu I, Mikami T, Yoshida T, Hana K, Yokozawa M, Sada M, Fujiwara M, Kawada N. Cytoglobin expression of rectal subepithelial myofibroblasts: significant alterations of cytoglobin+ stromal cells in long-standing ulcerative colitis. *Histol Histopathol*. 2011 Dec 26;679–88.
59. Rashid M, Wangler NJ, Yang L, Shah K, Arumugam T V., Abbruscato TJ, et al. Functional up-regulation of endopeptidase neurolysin during post-acute and early recovery phases of experimental stroke in mouse brain. *J Neurochem*. 2014 Apr 19;129(1):179–89.

10. EKLER

