

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

NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİ
OLUŞTURULAN RATLARDA PROFİLAKTİK OLARAK
KULLANILAN RESVERATROL VE MELATONİNİN
GASTROİNTESTİNAL SİSTEME, OKSİDATİF STRESE
ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. TAMER ÖZSARI

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. İLKNUR KILIÇ

Prof. Dr. Hacer ERGİN danışmanlığında Dr.Hülya HALİS tarafından yapılan "Nedeni Bilinmeyen Ciddi Hiperbilirubinemisi, Coombs(-) ABO Uyuşmazlığı ve Ciddi Hiperbilirubinemisi Olan Yenidoğanlarda Üridin Difosfoglukuronil Transferaz Enzim Geninde Promoter Polimorfizmi ve Ekzon-1 Mutasyonlarının Araştırılması" konulu tezi jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

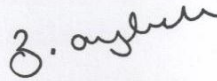
Başkan : Prof. Dr. Serap SEMİZ

Üye : Prof. Dr. Hacer ERGİN

Üye : Prof. Dr. İlknur KILIÇ

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

05/01/2010


Prof. Dr. Zafer AYBEK
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimimi artırmamda büyük destek, ilgi ve yardımını gördüğüm, ayrıca tezimin planlanması ve yürütülmesi sırasında bana yol gösteren çok değerli tez hocam Prof. Dr. İlknur KILIÇ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ihtisas eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve eğitimimde emeği geçen başta Anabilim Dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Serap SEMİZ ve diğer öğretim üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. Hacer ERĐİN, Prof. Dr. Aziz POLAT, Doç. Dr. Ahmet AKÇAY, Doç. Dr. Dolunay GÜRSES, Yrd. Doç. Mine CİNBIŐ, Yrd. Doç. Dr. Özmert ÖZDEMİR Uzm Dr Yasemin IŞık BALCI, Uzm Dr Mehmet AKIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Neslihan YALÇIN'a, Biyokimya Anabilim dalından Doç. Dr. Süleyman DEMİR'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma, beni destekleyen sevgili eşim ile beni yetiőtiren ve her konuda yanımda olduklarını hep hissettiren çok değerli aileme sonsuz tesekkür.

Dr. Tamer ÖZSARI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
NEKROTİZAN ENTEROKOLİT	3
PATOGENEZİ	4
Prematürite	4
Olgunlaşmamış Barsak Hareketleri ve Sindirimi	4
Olgunlaşmamış Barsak İmmunitesi	5
İntestinal Bariyer	6
Olgunlaşmamış Barsak Dolaşımı	6
Anormal Bakteriyel Kolonizasyon.....	7
Hipoksik İskemik Hasar /Mediatörler	7
Enteral Beslenme.....	8
Bakteriyel Kolonizasyon ve Sepsis	9
KLİNİK BULGULARI	10
LABORATUAR BULGULARI	10
RADYOLOJİ BULGULARI	10
EVRELEME.....	11
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ.....	11
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ETKİLERİ	12
Membran Lipidlerine Etki	13
Proteinler Üzerine Etki	13
DNA Üzerine Etki	13
Karbonhidratlar Üzerine Etki.....	14
ANTİOKSİDAN SİSTEM.....	14
RESVERATROL VE ETKİLERİ.....	15
MELATONİN VE ETKİLERİ.....	15
GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
ÇALIŞMA GRUPLARI	16
HİPOKSİ/REOKSİJENİZASYON YÖNTEMİ İLE NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİ OLUŞTURULMASI	17
Histopatolojik Değerlendirme.....	18
Biyokimyasal Değerlendirme	19
Malondialdehit (MDA) Ölçümü	19
Redükte Glutatyon (GSH) Ölçümü.....	19
İstatistiksel Analizler	19
BULGULAR	20
TARTIŞMA	27

SONUÇLAR	38
ÖZET	39
YABANCI DİL ÖZETİ.....	39
KAYNAKLAR	40
EKLER.....	55

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo-1 Nekrotizan enterokolitte modifiye Bell evrelemesi.....	11
Tablo-2 Serbest oksijen radikalleri kaynakları	12
Tablo-3 Serbest oksijen radikalleri.....	12
Tablo-4 Histopatolojik evrelemede kullanılan mikroskopik hasar skorlaması.....	18
Tablo-5 Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının birinci, ikinci ve üçüncü gün vücut ağırlıkları (ortalama \pm SD deviasyon) ve dağılımı	20
Tablo-6 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarının histopatolojik değerlendirme (evre) skorları.....	23
Tablo-7 Biyokimyasal olarak çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (yaş gram doku başına) glutasyon redüktaz (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ve bunların (ortalama ve dağılımı) istatistiksel değerlendirilmesi	24
Tablo-8 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının birinci gün vücut ağırlıkları (gr).....	54
Tablo-9 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının ikinci gün vücut ağırlıkları (gr).....	54
Tablo-10 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının üçüncü gün vücut ağırlıkları (gr).....	55
Tablo-11 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının intestinal sistem histopatolojik değerlendirme (evre) skorları.....	55
Tablo-12 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (nmol/gr) malondialdehit (MDA)düzeyleri	56
Tablo-13 Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki μ mol/g redükte glutasyon (GSH) düzeyleri.....	56

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Sayfa No

Şekil-1: Nekrotizan enterokolit gelişimine neden olan başlıca etkenler	3
Şekil-2: Serbest oksijen radikalleri ve enzimatik detoksifikasyonu ..	14
Şekil-3,4,5,6: Hava geçirmez kapalı bir ortamda hipoksi/reoksijenizasyon yöntemi uygulanışı	17
Şekil-7: Rat yavrularına 4.gün yapılan median laparotomi ile örneklerin alınması	18
Şekil-8: Rat yavru barsağının terminal ileal segmentinin nekroze olmamış ve nekroze olmuş resmi	18
Şekil-9: Kontrol grubu. Normal histoloji, evre 1. (H&E, x1/200)	21
Şekil-10: NEK grubu, (H&E, x1/200). Villus epitel hücre nekrozu, evre 3. Tam villüs nekrozu, evre 4.....	21
Şekil-11: Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, evre 2. Resveratrol+NEK grubu, (H&E, x1/200)	22
Şekil-12: Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, evre 2. Melatonin + NEK grubu, (H&E, x1/200)	22
Şekil-13: Grupların histopatolojik değerlendirilmesi	23
Şekil-14: Gruplara göre GSH düzeyleri.....	25
Şekil-15: Gruplara göre MDA düzeyleri	26

KISALTMALAR

NEK	:	Nekrotizan enterokolit
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör alfa
PAF	:	<i>Platelet activating factor</i>
MDA	:	Malondialdehit
SOD	:	Süperoksid dismutaz
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
H/R	:	Hipoksi-reoksijenasyon
TLR	:	<i>Toll like receptor</i>
LPS	:	Lipopolisakkarit
LTA	:	Lipoteikoik asit
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
RNA	:	Ribonükleik asit
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa - B
H&E	:	Hemotoksilen-eosin
GSH	:	Redükte glutatyon
GSH-Px	:	Glutatyon peroksidaz
G-6-PD	:	Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
(O₂⁻)	:	Süperoksit
IL-1	:	İnterlökin-1
IL-6	:	İnterlökin-6

IL-12	:	İnterlökın-12
IL-18	:	İnterlökın-18
ip	:	İntraperitoneal
TBA	:	<i>Thiobarbituric acid</i>
NADP	:	Nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
NADPH	:	İndirgenmiş Nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
SPSS	:	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
OH⁻	:	Hidroksil radikali
LTB4	:	Lökotrien B4
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
ROO⁻	:	Peroksil radikali

GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit, farklı etyolojilere ve önemli mortalite hızına sahip, genellikle prematüre yenidoğanları etkileyen, barsakların kısmi veya tam iskemisi ile karakterli önemli bir gastrointestinal hastalıktır. Nekrotizan enterokolit gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen başlıca risk faktörleri; prematürite, hipoksi, enteral beslenme, enfeksiyon, iskemi, sitokinler ve farmakolojik ajanlardır. Nekrotizan enterokolit konusunda yapılan çok sayıdaki deneysel çalışmalara ve klinik araştırmalara rağmen, etyoloji ve patogenez tam olarak anlaşılamamıştır. Bilinen tek şey tetiği çeken mekanizma ne olursa olsun, hastalığın barsak duvarında dolaşım bozukluğu, nekroz ve bakteriyel invazyonla karakterize olduğudur (1-6).

Nekrotizan enterokolit patogenezindeki en önemli faktörün mezenter iskemisi olduğu ileri sürülmektedir. Diving refleksi (kalp ve beynin selektif olarak refleksi dolaşım şantlarıyla perfüzyonunun sağlanması) selektif olarak splenik iskemiyeye yol açar. Prematüre bebekler, hipoksi, asidoz, hipotansiyon, hipotermi, umbilikal kateterizasyon gibi yenidoğanın barsak hasarının patogenezinde rol oynayan önemli faktörlere maruz kalır. Mezenterik kan akımının kısıtlandığı durumlarda reperfüzyonun ardından ksantin oksidaz, hipoksantin ve moleküler oksijen arasındaki etkileşimler sonucu ortamda süperoksit radikalleri denilen maddeler artmaktadır (7,8). İskemi sonrası gelişen reperfüzyon evresinde, yapımı artan serbest oksijen radikalleri, tümör nekrotizan faktör-alfa, trombosit aktive edici faktör gibi enflamatuvar mediatörlerin intestinal mukozal zedelenmeyi daha da arttırarak ülserasyon ve nekroz oluşturdukları düşünülmektedir (9-12).

Resveratrol (3,4',5- *trihydroxystilbene*) stilbenlerin alt grubu olup bitkiyi fungal enfeksiyonlardan koruyan polifenol yapıda antioksidan ve antiinflamatuvar bir maddedir (13). Resveratrol'un doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri, koenzim Q ile yarışmak ve reaktif oksijen ürünleri oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmaktır. Diğerleri, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, sonucusu ise lipid

peroksidasyonunun inhibisyonudur. Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir (14).

Melatonin, elektrondan zengin bir moleküldür ve direkt antioksidan özelliği vardır (15). Oldukça toksik olan hidroksil radikalleri başta olmak üzere, diğer serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasardan makromolekülleri özellikle de deoksiribonükleik asit'i koruyabilir. Melatoninin, hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, güçlü bir radikal süpürücü hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali ve peroksinitrit anyonuna etkilidir. Antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, redükte glutatyon, glutatyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz stimülasyonu ve nitrik oksit sentaz inhibisyonu özelliğinin olması, iskemi reperfüzyon hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (16,17). Melatoninin, E vitaminine göre en az iki kat, glutatyona göre beş kat daha etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (18).

Tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber iskemik hasara uğramış bir barsak zemininde geliştiği düşünülen nekrotizan enterokolit'te, bebeklerin sıklıkla zamanından önce doğmuş ya da düşük doğum ağırlıklı, bağışıklık sistemleri yeterince gelişmemiş yenidoğanlar olması nedeniyle, uygulanacak tedavi konusu halen tartışmalıdır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda resveratrolun ve melatoninin serbest oksijen radikallerini tuttuğu gösterilmiştir. Barsaklarda oluşan hasar, antioksidan maddeler ile düzeltilebilir. Bu çalışma hipoksi-reoksijenizasyon modeli ile oluşturulan intestinal hasarda profilaktik olarak verilen resveratrol ve melatoninin etkilerini araştırmak amacı ile yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

Nekrotizan entrokolit (NEK) yenidoğan periyodunda en sık görülen gastrointestinal acil problemdir (1-4,19). Yapılan birçok çalışmaya rağmen etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Birçok etken öne sürülmüştür. Tetiği çeken etkenden bağımsız olarak, bu etkenlerin tek başlarına veya birlikte aynı yol üzerinden etki ederek NEK'e yol açtıkları düşünülmektedir (1-4).

Ancak genel olarak kabul görmüş dört önemli etken vardır.

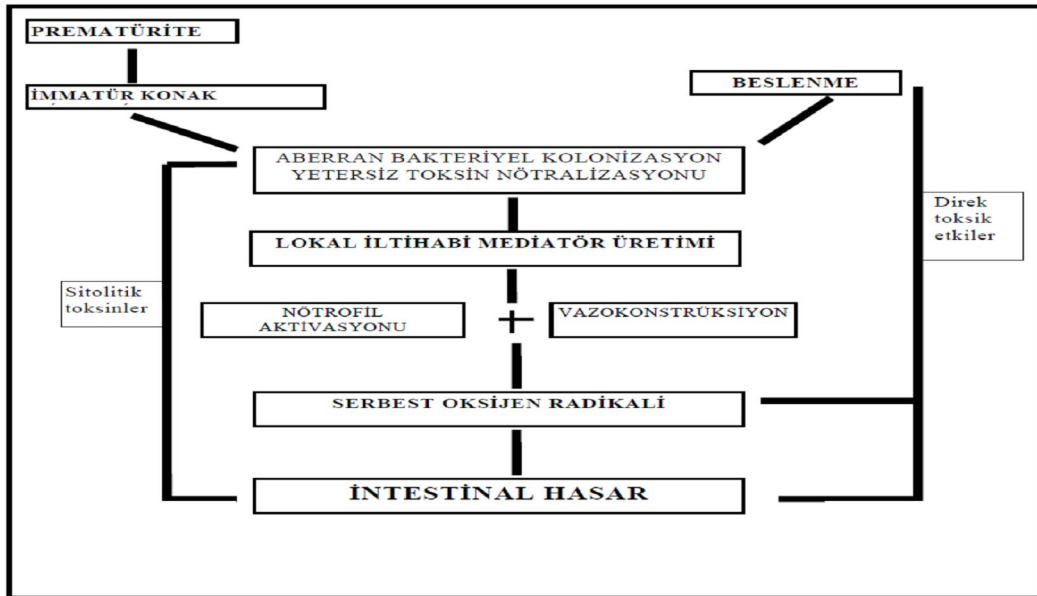
1-Prematürelilik

2-Hipoksi, iskemi ve yeniden kanlanma hasarı

3-Hastalığa yol açan mikroorganizmaların varlığı

4-Ağızdan beslenmenin başlamasıdır

Bu etkenlerden bir veya daha fazlasının koruyucu işlevde yetersizliğe yol açarak, NEK'e ilerleyebilen mukozal hasara neden olduğu düşünülmektedir (1-4) (Şekil-1).



Şekil - 1: Nekrotizan enterokolit gelişimine neden olan başlıca etkenler

NEK: Nekrotizan enterokolit

(Doç.Dr Abdullah Ceylan'dan izin alınarak kullanılmıştır.)

PATOGENEZİ

Prematürite

NEK çoğunlukla düşük doğum ağırlıklı prematürelerin bir hastalığıdır (1-4,19). Prematürelerde mide asit üretimi ve barsaktaki koruyucu mukus seviyesi düşüktür, mukozal geçirgenlik fazladır ve normal koordine peristaltik aktivite gelişmemiştir (20-22). Prematürelerdeki oral gıda intoleransı, enterik sinir sistemi ganglion hücrelerinin gelişimiyle düzelir. Barsak motilitesinde görev alan, sinir pleksuslarıyla düz kas hücreleri arasında iletişimi sağlayan interstisyel kaja hücrelerinin yetersiz gelişimi nedeniyle, barsaklardaki gıdayı ilerletici kasılmalar yetersizdir. Gıda ilerletilmesi yeterli olmadığından barsak tıkanıklığına eğilim vardır, bu durum barsakta genişleme ve mukozada iskemi gelişimiyle sonuçlanabilir (21). Esas olarak prematüre bebeklerde görülmekle birlikte, NEK gelişen bebeklerin % 10'unu zamanında doğan bebekler oluşturmaktadır (21,23,24). NEK gelişimi doğum ağırlığı ile ters orantılıdır ve prematürelerde daha matür bebeklere kıyasla daha geç görülmektedir (3,4,17,19,23). Savunulan diğer görüş ise gestasyonel yaşın düşük doğum ağırlığından daha önemli olduğudur. Özellikle 30-32 hafta arasında doğan yenidoğanlar NEK gelişimi açısından yüksek riske sahiptir (25,26). Gebelik yaşı 35-36 haftayı geçince riskte önemli bir azalma olur. Bu da NEK gelişiminde barsak olgunlaşmasının birincil rol oynadığını düşündürmektedir (27).

Olgunlaşmamış Barsak Hareketleri ve Sindirimi

Pretermelerde ince barsağın hareketleri ve barsakta iletimi sağlayan motor aktivite termlere göre daha az gelişmiştir (28). Barsak hareketleri gebeliğin 30. haftasından önce yetersiz, barsaklardaki itici dalgaların yayılımı daha azdır. Barsak duvarındaki kas tabakalarının yetersizliği, peristaltik dalgalarda uyum bozukluğu, antiperistaltik dalga sayısının yüksek oluşu, barsaktaki hormonal salgıların azlığı pretermelerde barsak geçiş zamanını uzatır (20). Bunu gecikmiş gastroanal geçiş zamanından anlayabiliriz (29). Tüm bu nedenlerden dolayı pretermelerin yarısı ilk mekonyumunu doğum sonrası 48. saatten sonra çıkarır (20). Motilin ve pankreatik polipeptid barsakta iletimi sağlayıcı motor aktiviteyi uyaran faktörlerdir. Fetusta bağırsağın nöroendokrin gelişimi 25. haftada tamamlandığı halde preterm yenidoğanlarda motilin ve pankreatik polipeptidin salgı şeklinin olgunlaşmamış

olmasından dolayı iletimi sağlayıcı motor aktivite 32-36. haftalardan önce görülmez (3,29). Ağızdan beslenme ile motilin seviyesinin 3 katına kadar arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla preterm bebeklerin ilk günlerden itibaren çok az da olsa ağızdan beslenmelerinin bakteriyel çoğalma ve göçü azaltarak NEK gelişme riskini azalttığı tespit edilmiştir (29). Eritromisin 32 haftadan büyük yenidoğanlarda motilin reseptörlerine bağlanarak iletimi sağlayıcı motor aktiviteyi artırır. Ancak NEK açısından daha riskli olan 32 haftadan küçük pretermelerde etkisiz olduğu gösterilmiştir (30).

Olgunlaşmamış Barsak İmmunitesi

Preterm bebeklerde barsak immün sisteminin iyi gelişmemiş olması barsak bakterilerine karşı direnci azaltmaktadır. NEK klasik olarak prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hastalığı olduğundan barsağın koruyucu faktörlerinin immatüritesinden kaynaklanıyor olması akla yatkın gelmektedir. Preterm yenidoğanların barsak bariyeri hem fizyolojik hem de immunolojik olarak olgunlaşmamıştır. Bu bariyer, lümendeki bakterilerin sisteme ulaşmasını engelleyecek karmaşık anatomik ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Bariyerin spesifik kanadında yer alan immün sistem komponentleri B ve T hücreleri ve immünglobülinlerdir. Yenidoğan bebeklerde intestinal B ve T lenfositleri düşük sayıdadır. Prematür bebeklerin barsaklarındaki sekretuar IgA, IgG ve IgM düzeyleri düşüktür. IgA, bakterileri bağlayarak onların barsak mukozasına yapışmalarını önleyen barsağın koruyucu mukozal baryerinin oluşmasında hayati bir öneme sahiptir (31). Bazı invitro çalışmalar sonucunda olgunlaşmamış barsak hücrelerinin patojenik uyarılara aşırı iltihabi cevap göstermeye meyilli oldukları gösterilmiştir. Araştırmacılar bunun nedeninin gelişimsel olarak henüz yeterli düzeye erişmemiş olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B) inhibitörü ve bunun sonucunda daha fazla NF- κ B aktivitesi oluşturması sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir Bu modelde artmış iltihabi cevap, artmış hücresel enflamasyona ve kontrolsüz hücre hasarına neden olabilir.

İntestinal Bariyer

Bozulmuş barsak bariyeri NEK oluşumunda önemli bir faktördür. Barsak bariyeri, vücudun enterik bakteriler tarafından istila edilmesini önleyen işlevsel ve anatomik bir savunma sistemidir (20). Eğer barsak epitel bariyerin yapısal veya

biyokimyasal bileşenleri tam olarak olgunlaşmamışsa bakteriler daha derin dokulara ilerleyebilir ve iltihaba neden olabilirler. Barsak epitelini yararlı bakteriler ile birlikte ortak olarak var olmalı ve olası patojenlere karşı koruma sağlamalıdır. Barsak epitel hücreleri gebeliğin 10. haftasından itibaren şekillenen sıkı bağlantı yapıları tarafından birbirlerine bağlanırlar. Barsak fonksiyonları bu bağların tam olarak gelişmesine bağlıdır. Fetal barsak salgı ve emilim işlevleri amniyon sıvısının etkisi altında 26. haftadan terme kadar geçen sürede kademeli olarak olgunlaşmaya başladığından preterm yenidoğanlarda bu işlevler tam olarak gelişmemiştir. Özelleşmiş enterositler müsin salgırlar ve barsak mukozası üstünde kalın koruyucu bir tabaka oluştururlar. Bu mukus tabakası bakterilerin epitel hücrelerine doğrudan bağlanmasına engel olur, yapışan bakterileri bir araya toplar ve uzaklaştırılmalarını artırır. Pretermde tam olarak işlev görmeyen barsak epitel bariyer işlevlerinden bir diğeri de biyokimyasal savunma işlevidir. Küçük barsak kriptlerinin tabanına yerleşmiş paneth hücreleri özelleşmiş salgılayıcı enterositler olup lizozim, fosfolipaz A₂ ve küçük antimikrobiyal peptidler salgırlar. Bu salgılar bakteriyel toplulukların yapısını ve dağılımını etkilemektedir. Barsak hücrelerince üretilen iki önemli antimikrobiyal peptid sınıfı vardır. Bunlar “defensin” ler (α ve β) ve “*cathelicidin*” lerdir. Mikrobik uyarıya yanıt olarak Paneth hücreleri “ α defensin” salgırlar. Barsak epitel hücreleri ise genel olarak “ β defensin” ler salgırlar. Bu antimikrobiyal peptidler bakteriler, virüsler, mantarlar, protozoalar ve spiroketler de dahil olmak üzere geniş bir mikroorganizma grubuna karşı biyoaktivite gösterirler. Preterm yenidoğan barsağının bariyer işlevleri gelişmediğinden, patojen ve toksinleri barsak boşluğundan etkili bir şekilde uzaklaştıramaz (3).

Olgunlaşmamış Barsak Dolaşımı

Olgunlaşmamış barsağın hipoksiye cevabı ile ilgili yapılan hayvan çalışmalarında hipoksiye cevabın, uygun olmayan, uzamış vazokonstrüksiyon olduğu görülmüştür (32). Barsak dolaşımının olgunlaşmamış cevabı ile birlikte veya beslenme sonrası barsakta hipoksi-iskemi meydana gelebilir. Preterm yenidoğanların sıklıkla vazokonstrüksiyon, hipotansiyon ve tromboz atakları yaşamaları barsağın kan akımını azaltır ve barsak mukozasının hasar görme olasılığını artırır (33).

Anormal Bakteriyel Kolonizasyon

NEK'in in trauterin dönemde oluşmaması NEK patogeneğinde anormal bakteri kolonizasyonunun rolü olabileceğini düşündürmektedir. Prenatal dönemde steril olan intestinal sistemde in utero NEK vakası tanımlanmamıştır ve enflamatuvar barsak nekrozunun başlangıcı için önceden barsak kolonizasyonunun olması gerekmektedir (34). Kolonizasyonun başlıca nedenlerinden biri mideden az miktarda hidrojen salınımı ve düşük pankreatik proteolitik enzim aktivitesi olarak sayılabilen olgunlaşmamış fizyokimyasal barsak içi faktörlerdir. Düşük enterokinaz ve triptik aktivite sonucunda barsak hasarı yapma ihtimali olan toksinlerin hidrolizi yapılamaz. Böylece olgunlaşmamış sindirim, çevresel patojenlerin enterosite ulaşmasına ve patojenler tarafından kolonizasyonuna neden olur (3,20,28).

Hipoksik İskemik Hasar /Mediatörler

Son yıllarda NEK patogeneğinde iskemik mukozal hasarın moleküler düzeydeki bulguları yayınlanmaya başlamıştır (27). Bu çalışmalar iskemik zedelenme sonrası tekrar kanlanma ve oksijenizasyon ile ortamda serbest oksijen radikallerinin (SOR) ve çeşitli enflamatuvar mediatörlerin ortaya çıktığını göstermiştir (35). Reperfüzyon, iskemik dokunun oksijenlenmiş kan ile perfüze edilmesiyle, enerji desteğinin sağlanması ve hücrel homeostazisin yeniden restorasyonu demektir. İskemi sırasında, adenin trifosfat (ATP)'nin hızla metabolize olması nedeniyle ksantin ve hipoksantin seviyeleri artmaktadır. Ortamda nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (NADP)'ın indirgenmiş formu (NADPH) ve ksantin veya hipoksantin bulunduğunda, moleküler oksijenin ksantin oksidaz aracılığıyla süperoksit ve diğer serbest radikallere dönüşmesi söz konusudur (31).

Serbest oksijen radikalleri içinde hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^-) en önemli ve hasardan sorumlu olan radikallerdir. SOR'leri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, nötrofil aktivasyonu ve deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı oluşturarak hücre ölümüne, bölgesel hasar gelişimine ve sistemik bulgulara yol açarlar. Deneysel çalışmalarda SOR'nin oluşumunu ya da etkisini önleyen maddeler verildiğinde intestinal hasarın ve NEK gelişiminin azaldığı saptanmıştır (36-39). Hasarlanan barsak epitel hücreleri ve aktive nötrofillerden salınan enflamatuvar mediatörlerin başlıcaları; '*platelet activating factor*' (PAF),

tümör nekroz faktör (TNF- α), Nitrik Oksit (NO), İnterlökin-1 (İL-1), İnterlökin-6 (İL-6), İnterlökin-12 (İL-12), İnterlökin-18 (İL-18) olarak sayılabilir (40). Birçok çalışmada NEK'te bu sitokinlerin lokal ve sistemik olarak arttığı ve doku hasarında birincil rol oynadıkları saptanmıştır (5,41-43). Bu mediatörlerin intestinal mukoza zedelenmesini daha da artırarak ülserasyon ve nekroz oluşturdukları düşünülmektedir .

Enteral Beslenme

Enteral beslenmeye hızlı ve erken geçiş, enterik kan akımında ve mukozanın oksijen ihtiyacında artmaya neden olmaktadır. NEK gelişen bebeklerin %90-95'inde enteral beslenmenin major rol oynadığı görülmüştür (44). Tamamen sindirilemeyen mamalar, gastrointestinal sistemde bakteri proliferasyonu için substrat görevi yaparak NEK gelişimine zemin hazırlamaktadır. Yenidoğanlarda sindirilemeyen karbonhidrat, barsaktaki bakteriler tarafından fermente edilerek yağ asidi ve laktik aside dönüştürülür. Bu sırada karbon dioksit ve hidrojen gazı üretilir. Üretilmiş olan yağ asidi, distal ince barsak ve kolondan emilir. Patojen bakterilerin varlığında yağ asidi ve gaz üretimi artar, bu miktar emilim kapasitesini aşarsa, lümen içi pH düşer ve mukozada hasar oluşur (4,21). Besinlerin emilimi sırasında barsakları etkileyen metabolik ihtiyacın artması, hipoksik iskemik stres, immatür vasküler düzenleme kapasitesi, immatür immün sistem ve gastrointestinal dismotilite doku hipoksisine yol açar ve takiben bakteriyel invazyonun da eklenmesiyle nekrotizan enterokolit gelişir (45).

Hiperosmolar mamalarla beslenmenin yüksek volümlü ve hızlı beslemenin, özellikle prematüre bebeklerde NEK riskini arttırdığı bildirilmektedir. Berseth ve arkadaşlarının (46) çalışmasında, minimal enteral beslenenler ve volüm artışı yavaş yapılanlarda, hızlı volüm arttıranlara göre daha az NEK geliştiği gösterilmiştir.

Bakteriyel Kolonizasyon ve Sepsis

Bazı araştırmacılar, NEK'in patogenezinde infeksiyöz ajanların merkezi bir rol üstlendiklerini ve NEK'in, normal veya hasar görmüş barsağı tutan bir infeksiyöz hastalık olduğunu, çeşitli bakterilerin ve virüslerin bu hastalıkta primer ajanlar olduğunu ileri sürmüşlerdir (20). Nekrotizan enterokolit'in patogenezinde

bakterilerin rol aldığını destekleyen deliller de tespit edilmiştir (20). Örneğin hastalık esnasında yenidoğanda enfeksiyon ajanı ve hastalığın zaman zaman epidemiler şeklinde ortaya çıktığı tespit edilmiştir (20). Deneysel olarak endotoksin verilmesinden sonra ve *clostridium* suşlarının oral verilmesinden sonra NEK benzeri lezyonlar da oluşturulmuştur (47). Nekrotizan enterokolit'te sıkça görülen bir bulgu olan pnömatozis intestinalis, %30 hidrojen gazı içerir. Bu gaz ise sadece bakteriyel metabolizma sonucu üretilmektedir (33). Bakteriyel endotoksinlerin intestinal sistemde PAF, TNF- α , ve IL-1 üretimini aktive ederek enflamatuvar kaskadı uyardıkları ve intestinal hasar gelişimini sağladıkları gösterilmiştir (48). Bakteri ve bakteri hücre duvarı ürünleri gram negatiflerde lipopolisakkarit (LPS), gram pozitiflerde lipoteikoik asit (LTA) NEK 'in patogenezinde rol oynar (22,41). İnsan *toll-like* reseptörleri (TLR), büyük bir transmembran molekül ailesidir. LPS TLR-4'e, LTA TLR-2'ye bağlanır. Anne sütü ile beslenen ratlarda TLR-4 azalırken, mama ile beslenenler de artar. PAF uygulanan ratlarda TLR-2 ve TLR-4 üç katına çıkmaktadır. PAF seviyesi apoptoz yapamayacak kadar azken bile TLR'yi arttırarak, enflamasyon ve nekrozu başlatabilir (5,41).

Caplan ve arkadaşlarının (49) çalışmasında enteropatojen kolonizasyonunu önleyen ve intestinal olarak yararlı etkileri saptanan *Bifidobacterium infantis* verilen yenidoğan farelerde NEK insidansının azaldığı gösterilmiştir. Akısü ve arkadaşlarının (50) çalışmasında yavru farelere oral olarak probiyotik bir ajan olan *Saccharomyces boulardi* verilmiş, kontrol grubuna göre bu farelerde intestinal hasarın daha az olduğu, intestinal hasarda major rol oynayan PAF düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmıştır.

KLİNİK BULGULARI

Nekrotizan enterokolit'in klinik bulguları özgün değildir. Hafif karın şişliğinden, perforasyona kadar değişen çeşitli klinik tablolara neden olabilir. Letarji, ısı düzensizliği, apne, bradikardi, hipoglisemi ve şok görülür (24). Gastrointestinal sistemle ilgili karın şişliği, gaitada kan, beslenme sonrası yüksek gastrik rezidü, kusma ve ishal olur. İlerlemiş hastalıkta karında duyarlılık, barsak halkalarının muayenede ele gelmesi, batında kitle, karın duvarında ödem, eritem ve krepitasyon saptanır (20,21).

LABORATUAR BULGULARI

Nekrotizan enterokolitli hastalarda laboratuvar bulguları sepsis'i destekler niteliktedir. Lökosit sayısında artma ve daha sıklıkla da lökopeni olabilir. Vakaların yaklaşık %37'sinde beyaz küre sayısı $<1500 \text{ mm}^3$ olarak bulunmuştur. Koagülasyon bozuklukları hipo-hiperglisemi, metabolik asidoz ve elektrolit bozuklukları olabilir. Metabolik asidoz sıklıkla şokun bir bulgusudur. Bazı hastalarda C-reaktif protein düzeyinde artma görülür (1,51).

RADYOLOJİK BULGULARI

Nekrotizan enterokolit şüphesi olan vakalarda mutlaka radyolojik değerlendirme yapılmalıdır. En sık erken bulgu intestinal ileustur. Diğer erken dönem bulguları barsak anslarında dilatasyon, incelme ve hava-sıvı seviyesidir. Barsak duvarı içinde gaz görünümü (pnömatozis intestinalis) NEK'in patogonomik radyolojik bulgusudur. Gaz subseroza ile muskularis tabakası arasındadır ve patojen bakteriler tarafından üretilen hidrojene bağlı olarak oluşur (52,53). Ultrasonografi, kontrast radyografi ve manyetik rezonans görüntüleme kullanılabilen diğer tanı yöntemleridir.

EVRELEME

Nekrotizan enterokolit'in evrelemesi ilk defa 1973'de Bell (54) tarafından yapılmıştır. Bu evreleme tedavi ve takipte önemlidir. Buna göre birinci evre şüpheli olguları, ikinci evre NEK bulgularının kesin olduğu olguları, üçüncü evre ise ciddi olguları tanımlamaktadır (2,3). Daha sonra Walsh ve Kliegman (27) tarafından radyolojik bulgular evrelendirmeye eklenmiştir (Tablo-1).

Tablo - 1: Nekrotizan enterokolitte modifiye Bell evrelemesi

Nekrotizan Enterokolit Evreleri

Evre IA (şüpheli NEK)

Sistemik bulgular: Isı düzensizliği, apne, bradikardi, letarji

İntestinal bulgular: Gastrik rezidü, karın şişliği, kusma, gaitada gizli kan

Radyolojik bulgular: Normal veya barsaklarda hafif dilatasyon

Evre IB (şüpheli NEK)

Sistemik ve radyolojik bulgular: Evre IA ile aynı

İntestinal bulgular: Rektumda kan

Radyolojik bulgular: Barsaklarda hafif dilatasyon

Evre IIA (kesin NEK)

Sistemik ve intestinal bulgular: Evre IA bulgularına ek olarak barsak seslerinin olmaması, karında duyarlılık+/-

Radyolojik bulgular: Barsaklarda genişleme, ileus ve intramural hava

Evre IIB (kesin NEK)

Sistemik bulgular: Evre IIA bulgularına ek olarak hafif metabolik asidoz, hafif trombositopeni

İntestinal bulgular: Barsak sesleri yok, karında duyarlılık, karın duvarında selülit veya karında kitle+/-

Radyolojik bulgular: Evre IIA bulgularına ek olarak portal vende gaz ve asit +/-

Evre IIIA (ileri NEK)

Sistemik bulgular: Evre IIB bulgularına ek olarak hipotansiyon, bradikardi, ciddi apne, kombine metabolik ve respiratuvar asidoz, dissemine intervasküler koagülasyon, nötropeni

İntestinal bulgular: Karında şişme, duyarlılık, peritonit bulguları

Radyolojik bulgular: Evre IIB bulgularına ek olarak asit

Evre IIIB (ileri NEK)

Sistemik ve intestinal bulgular: Evre IIIA bulgularıyla aynı

Radyolojik bulgular: Evre IIIA bulgularına ek olarak pnömoperitoneum

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest radikaller dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük kimyasal bileşiklerdir. Eşleşmemiş elektrona sahip moleküller kararsız bir haldedir. Başka bir molekülle etkileşime girerek dış yörüngesindeki elektronu eşleme ve kararlı duruma getirme eğilimindedir. Böylece bu moleküller herhangi bir molekül ile etkileşime girerek elektron alırlar veya verirler (55,56). Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin kaynakları gösterilmiştir (Tablo- 2).

Tablo - 2: Serbest oksijen radikalleri kaynakları

Endojen kaynaklar	Eksojen kaynaklar
Mitokondriler (Solunum zinciri)	Radyasyon
Hücre zarı	İlaçlar
Sitokrom P-450	Sigara
Aktive lökositler (Fagositoz)	Alkol,uyuşturucu
Mikrozomal elektron taşıma zincir	Metal iyonları

Serbest radikallerin en önemlisi oksijenden türeyen SOR'dir. Çok reaktif olan bu yapılar, kararlı duruma geçme eğiliminde oldukları için, tek elektronlarını çiftlemek üzere başka moleküllerle reaksiyona girdiklerinde, onların yapılarını değiştirebilirler (56) (Tablo-3).

Tablo - 3: Serbest oksijen radikalleri

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit radikali	Hidrojen peroksit
Hidroksil radikal	Hipokbromoöz asit
Alkoksil radikal	Hipoklorik asit
Peroksil radikal	Ozon
Hidroperoksil	Singlet oksijen

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ETKİLERİ

Serbest oksijen radikalleri yapısal özellikleri nedeni ile lipid, protein ve nükleik asit gibi hücre bileşenlerini okside etme kapasitesine sahiptir. Özellikle hücre membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri oksidasyona duyarlıdır ve bunların oksidasyonu lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur.

Membran Lipidlerine Etki

Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar. Lipid peroksidasyonu, hücre zarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlatılmaktadır (56). Hidrojen

atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asidi lipid radikali halini alır. Yapıda molekül içi çift bağların yer değiştirmesi ve ardından moleküler oksijenle etkileşim sonucunda lipid peroksil radikali ortaya çıkar. Bunlar da yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedirler. Lipid hidroperoksitleri yıkılarak biyolojik olarak aktif yapılar olan aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşürler. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (56).

Proteinler Üzerine Etki

Serbest oksijen radikalleri proteinler üzerine olan hasar yapıcı etkilerini proteinlerde serbest radikal birikimi yaparak gösterir. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaktivitesi yüksek olduğundan fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelebilir. Bunlar da protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceği gibi, immun sistemi uyarabilecek antijenik değişiklikler de oluşturabilirler (56).

DNA Üzerine Etki

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona yol açarlar. Hidroksil gibi serbest radikal bileşikleri DNA bazları üzerinde dönüşümsüz değişikliklere neden olurlar. Bunlardan en önemlileri timin ile (OH[·])'nin oluşturduğu ürün olan timin glikol ve guanin ile (OH[·])'nin oluşturduğu ürün olan 8-hidroksi guanindir. Oluşan bu serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyonlara ve ölüme yol açarlar (56).

Karbonhidratlar Üzerine Etki

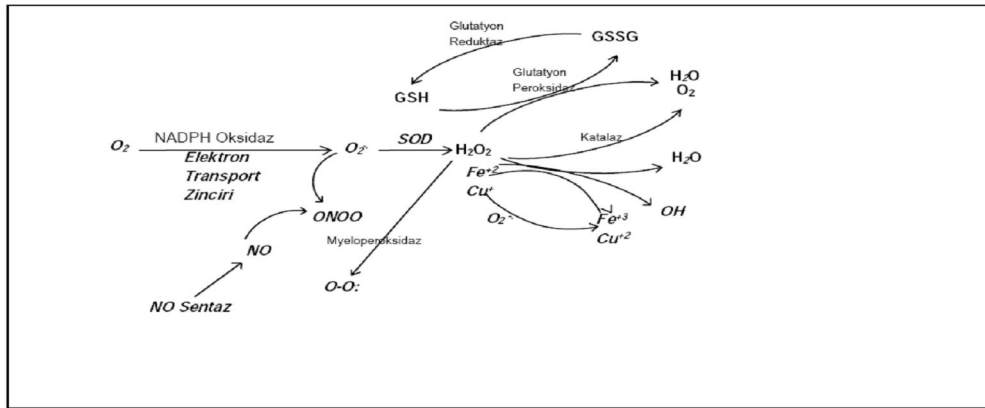
Özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Bir okzoaldehit olan gliokzil de DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterir. Yine süperoksit ve hidrojen peroksitin in vitro olarak hyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir (56).

ANTIOKSIDAN SİSTEM

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (57). Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olabilir.

A) Endojen (Doğal) antioksidanlar

1. Enzimler: Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz



Şekil - 2: Serbest oksijen radikalleri ve enzimatik detoksifikasyonu

(Prof.Dr. Ramazan Memişoğlu'dan izin alınarak kullanılmıştır.)

2. Enzim olmayanlar: Alfa-tokoferol, Beta-karoten, Askorbik asit, Ürat, Sistein, Seruloplazmin, Transferin, Laktoferrin, Miyoglobin, Hemoglobin, Ferritin, Albumin, Bilirubin, Glutatyon, Melatonin, Flavonoidler

B) Ekzojen antioksidanlar: Eksojen antioksidanlar vitaminler, ilaçlar, gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılırlar.

RESVERATROL VE ETKİLERİ

Resveratrol kuvvetli ve doğal bir antioksidandır. Serbest oksijen radikallerini nötralize ederek lipid peroksidasyonunu önlediği, süperoksit bağlı proenflamatuvar stimulusu baskıladığı endotelin bariyer fonksiyonunu koruduğu, nitrik oksit üzerinden vazodilatasyon yaptığı (58) trombosit agregasyonu inhibisyonu (59) lökositlerin aktivasyonunu engelleyerek antiinflamatuvar (60) etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Resveratrolün oksidatif stres altındaki mitokondri fonksiyonlarını membran stabilizasyonu ve antioksidan etkileri nedeniyle koruduğu gösterilmiştir (61).

MELATONİN VE ETKİLERİ

Melatonin hem yağda hem de suda çözünür özelliğe sahip olması nedeniyle, vücudun her hücresine, sitozole ve hücre içindeki diğer yapılara kolaylıkla girer ve bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir (14). En iyi bilinen antioksidanlar C ve E vitaminleri ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksid dismutaz (SOD) gibi enzimlerdir. Melatoninin E vitaminine göre en az iki kat, redükte glutatyon'a (GSH) göre beş kat daha etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (14,62,63). Ayrıca melatonin SOD, GSH, GSH-Px, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) gibi antioksidan enzimleri uyararak ve nitrik oksit sentaz (NOS) gibi prooksidatif enzimleri baskılayarak dolaylı antioksidan etki göstermektedir (13,18,64).

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu'na başvurularak onayı alınan bu deneysel çalışma, bir günlük ve ağırlıkları 5-8 gr olan yavru *Wistar*-albino ratlarda Mayıs-Aralık 2008 tarihlerinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nde yapıldı. Toplam 28 adet bir günlük rat yavruları randomize olarak her bir grupta yedi rat olacak şekilde toplam dört çalışma grubuna ayrıldı. Her bir grup parmaklıklı kafeslere annelerinin yanına yerleştirildi. Oda sıcaklığı 23-24 °C'de tutularak hayvanların normotermik olmaları sağlandı. Tüm rat yavruları annelerini emerek beslenirken, anne ratlar standart fare yemi olan % 21 protein içeren Pellet yem ile beslendi.

ÇALIŞMA GRUPLARI

Kontrol Grubu (Grup I, n:7): Üç gün süreyle günde bir kez 0.2 cc serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (ip) verildi.

NEK Grubu (Grup II, n:7): Üç gün süreyle günde bir kez 0.2 cc SF ip verildi ve dördüncü günde hipoksi/reoksijenizasyon (H/R) yöntemi ile NEK modeli oluşturuldu .

Resveratrol + NEK grubu (Grup III, n:7): Birinci günden itibaren üç gün süreyle 30 mg/kg/gün Resveratrol (R5010-100 mg flakon, *Sigma-Aldrich-USA*) tek dozda ip uygulandı ve dördüncü günde NEK modeli oluşturuldu (65).

Melatonin + NEK grubu (Grup IV, n:7): Birinci günden itibaren üç gün süreyle 10 mg/kg/gün Melatonin (M5250-1G *Sigma-Aldrich-USA*) tek dozda ip uygulandı ve dördüncü günde NEK modeli oluşturuldu (66).

HIPOKSI/REOKSİJENİZASYON YÖNTEMİ İLE NEK MODELİ OLUŞTURMA METODU

Doğum sonrası ilk üç gün annelerinin yanında anne sütü ile beslenen ve yukarıda tanımlanan ilaçların uygulandığı rat yavruları dördüncü günde hava geçirmez kapalı bir ortamda beş dakika süreyle %100 CO₂ solutularak hipoksiye sokuldu; hemen ardından beş dakika süreyle %100 O₂ solutularak reoksijenizasyon uygulandı (Şekil 3-6). Hipoksi periyodu sonrası tüm hayvanların siyanotik oldukları, gasping yaptıkları ve dışkılamalarının olduğu gözlemlendi.



Şekil - 3



Şekil - 4



Şekil - 5



Şekil - 6

Şekil 3-6: Hava geçirmez kapalı bir ortamda H/R yöntemi uygulaması

Günlük vücut ağırlığı takibi yapılan çalışma gruplarındaki tüm hayvanlar doğum sonrası 4. günde (96 saatlikken), NEK modeli oluşturulanlar, işlemten en az dört saat sonra servikal dislokasyon ile dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası 30 dakika içinde tüm rat yavrularının terminal ileumundan en az iki cm olacak şekilde rezeksiyon yapıldı (Şekil 7,8). Alınan barsak doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik inceleme için, bir kısmı ise biyokimyasal tetkikler için ayrıldı.



Şekil - 7: Rat yavrularına 4.gün yapılan median laparotomi ile örneklerin alınması.



Şekil - 8: Rat yavru barsağının terminal ileal segmentinin nekroze olmamış ve nekroze olmuş resmi.

Histopatolojik Değerlendirme

Alınan barsak örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında %10 formalin ile fiske edilerek parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5 mikrometrelik kesitler alınarak oluşturulan preparatlar hemotoksilen-eosin (H&E) boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda uzman bir patoloj tarafından 1'den 5'e kadar değişen mikroskopik hasar skorlamasına göre değerlendirildi (67) (Tablo-4). Çalışma sırasında patolojik preparatlar körleme yöntemi ile değerlendirildi.

Tablo - 4: Histopatolojik evrelemede kullanılan mikroskopik hasar skorlaması

Evre ler

Evre 1: Normal histoloji

Evre 2: Hidropik dejenerasyon ve yüzeysel epitel hücrelerinin seperasyonu

Evre 3: (Hafif) Villus epitel hücre nekrozu

Evre 4: (Orta) Tam villus nekrozu

Evre 5: (Şiddetli) Transmural nekroz

Biyokimyasal Değerlendirme

Terminal ileumdan alınan barsak doku örnekleri sıvı nitrojen ile dondurularak saklama kabında MDA, GSH analizi için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında bir biyokimya uzmanı tarafından değerlendirilinceye kadar -85 °C’de saklandı.

Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Çalışmamızda MDA ölçümü Ohkawa ve arkadaşlarının (68) yöntemine göre yapıldı. MDA, *thiobarbituric acid* (TBA) varlığında 532 nm’de ölçülebilen renkli bir kompleks yapmaktadır. Bu absorbans spektrofotometre ile ölçüldü. Sonuçlar barsak dokusunun gramı başına nmol/g olarak verildi.

Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyi Ölçümü

Çalışmamızda doku örneklerindeki GSH içeriğinin tespiti için metafosforik asit kullanılarak protein presipitasyonu ve 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona sokularak renk değişimi oluşturuldu. Ortaya çıkan renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar µmol/g olarak verildi (69).

İstatistiksel Analizler

Vücut ağırlıkları, histopatolojik ve biyokimyasal bulgular ortalama ve minimum-maksimum aralıklara göre verildi. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemede non-parametrik test (*Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi*) kullanıldı. Saptanan sonuçlar arasındaki farklılık için $p < 0.05$ olduğu durumlar istatistiksel bakımdan anlamlı olarak değerlendirildi. İstatistiksel verilerin bilgisayarda hesaplanmasında *statistical packages for social sciences* (SPSS) (*SPSS for Windows 10.0; SPSS, Chicago, Illinois, U.S.A*) yazılım programı kullanıldı.

BULGULAR

Deney boyunca annelerinin yanında kalan ve anne sütü ile beslenen yavru ratların üç günlük izleminde her bir grubun günlük vücut ağırlığı artışının olduğu ve gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı saptandı ($p > 0.05$) (Tablo 5).

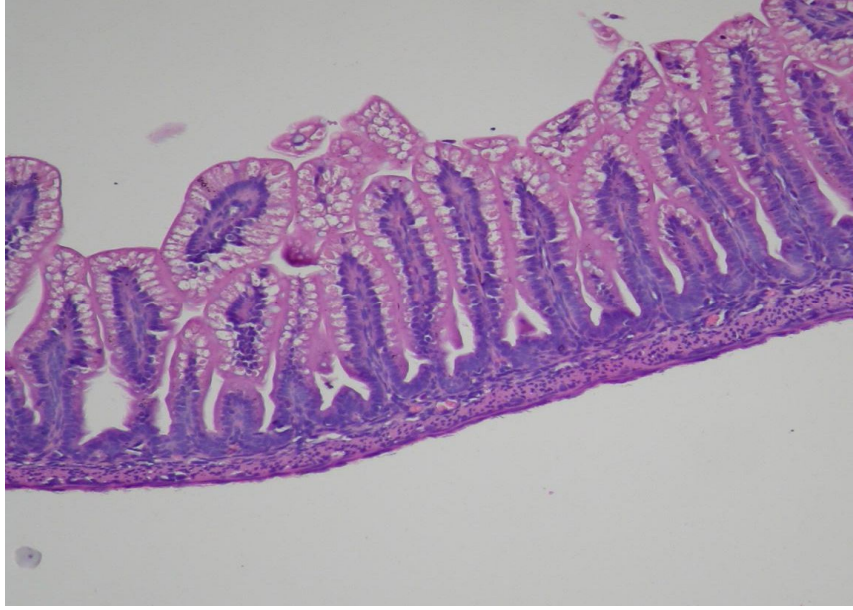
Tablo - 5: Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının birinci, ikinci ve üçüncü gün vücut ağırlıkları (ortalama \pm std deviasyon) ve dağılımı.

Gruplar* (Sayı)	1. gün	2. gün	3. gün
Kontrol (n:7)	5.8 \pm 0.38 (5.50-6.20)	6.6 \pm 0.39 (6.24-6.97)	7.6 \pm 0.60 (7.11-8.23)
NEK = H/R (n:7)	5.8 \pm 0.45 (5.42-6.26)	6.8 \pm 0.35 (6.53-7.20)	7.92 \pm 0.17 (7.76-8.0)
Resveratrol+NEK (n:7)	5.9 \pm 0.44 (5.53-6.35)	7.0 \pm 0.51 (6.61-7.56)	7.84 \pm 0.60 (7.29-8.40)
Melatonin+NEK (n:7)	5.6 \pm 0.27 (5.35-5.86)	6.7 \pm 0.31 (6.46-7.0)	7.53 \pm 0.54 (7.0 -8.0)

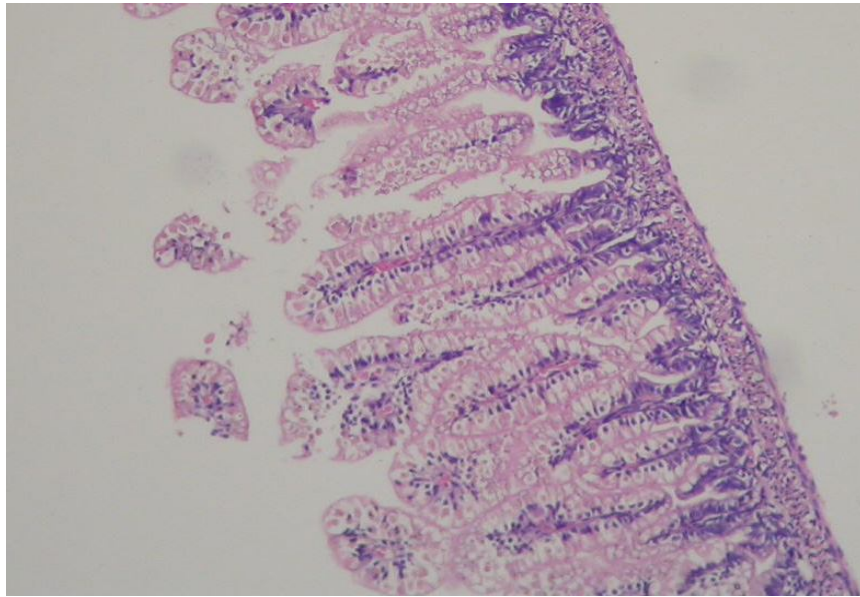
* Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Barsakların histopatolojik incelemesinde; kontrol grubunun tümü normal histopatolojik (evre 1) yapıya sahipken (Şekil-9), H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen rat yavrularının barsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar ile mikroskopik olarak hepsinde villüs epitel hücre nekrozu, tam villüs nekrozu (evre 3-4) hasarlanma olduğu (Şekil-10) saptandı. Resveratrol+NEK ve Melatonin+NEK grubu rat yavrularının barsaklarının histopatolojik incelemesi evre 2 ile evre 3 arasında değişmekteydi (Şekil 11,12). NEK grubu (H/R ve tedavi verilmeyen) ile

kontrol, Resveratrol+NEK ve Melatonin+NEK grupları arasında barsak histopatolojik incelemeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.01$). Bu bulgular ile H/R yöntemiyle rat yavrularının barsaklarında histopatolojik olarak evre 3-4 hasarlanma meydana geldiği, Resveratrol ve melatonin H/R modeli ile NEK oluşturulan rat yavrularının barsaklarında NEK'e karşı histopatolojik olarak koruyucu etkinliğe sahip olduğu görüldü.

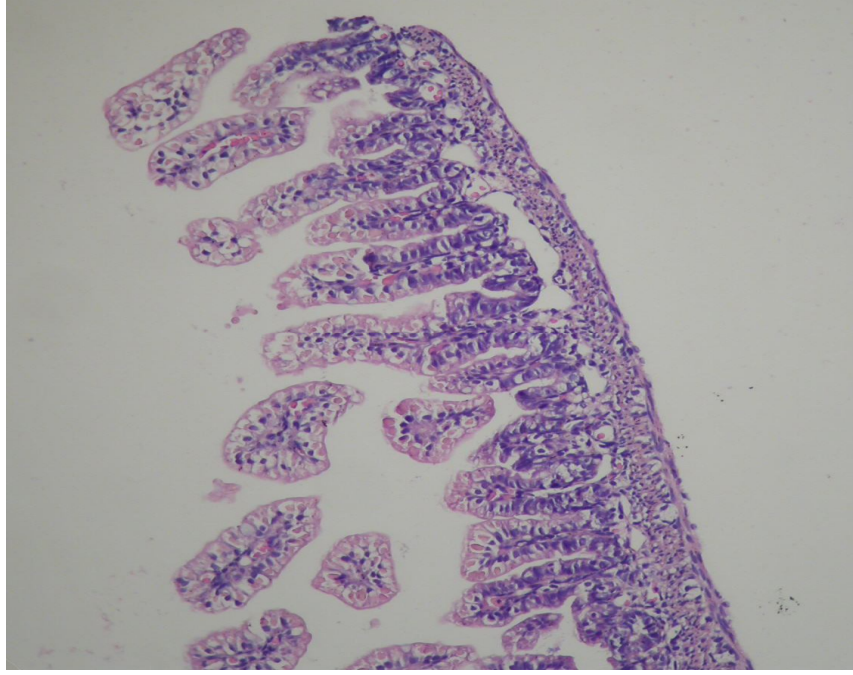


Şekil - 9: Kontrol grubu. Normal histoloji, evre 1. (H&E, x 1/200).

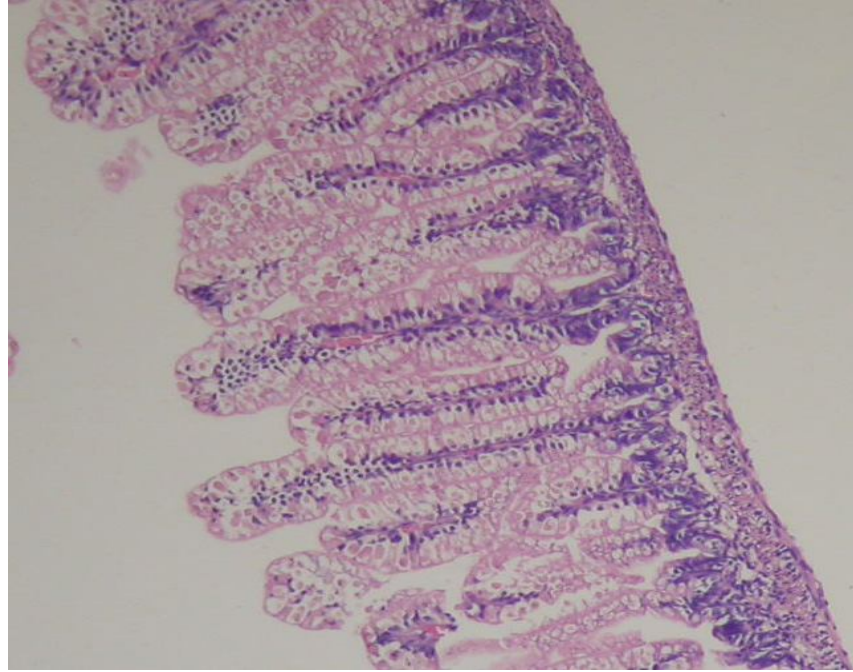


Şekil - 10: NEK grubu, (H&E, x1/200).

Villus epitel hücre nekrozu, evre 3. Tam villüs nekrozu, evre 4.



Şekil - 11: Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, evre 2.
Resveratrol + NEK grubu, (H&E, x1/200).



Şekil - 12: Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, evre 2.
Melatonin + NEK grubu, (H&E, x1/200).

Tablo - 6: Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavru barsaklarının histopatolojik değerlendirme (evre) skorları.

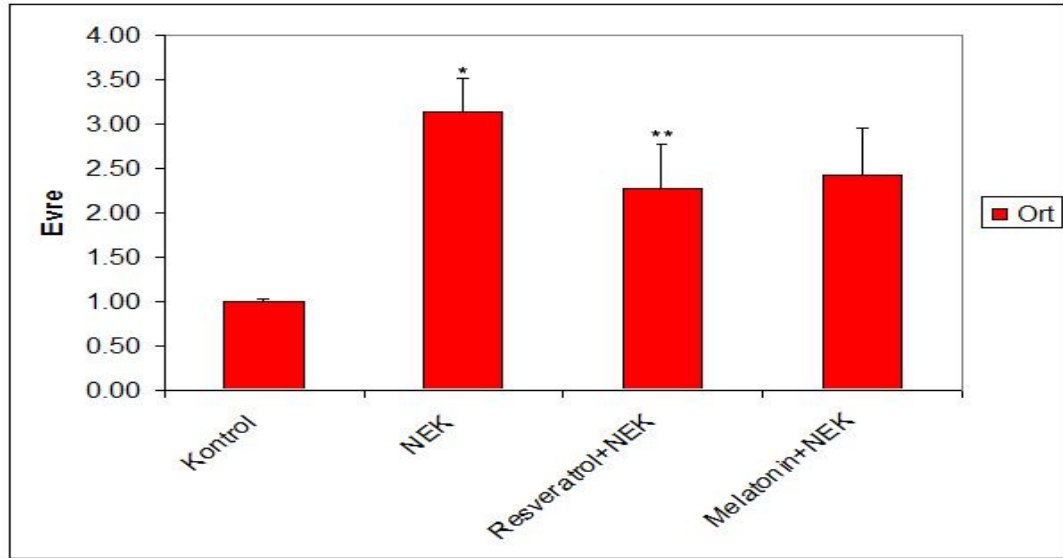
Gruplar	Histopatolojik Evre Ortalaması
Kontrol	1.0 (1-1)
NEK = H/R	3.14 (3-4) *
Resveratrol + NEK	2.28 (2-3) **
Melatonin + NEK	2.42 (2-3) ***

* NEK (H/R) grubu ile Kontrol, Resveratrol + NEK ve Melatonin + NEK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. $p < 0.001$

Resveratrol + NEK ve Melatonin + NEK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı $p > 0.05$

** Kontrol ve Resveratrol + NEK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. $p < 0.05$

*** Kontrol ve Melatonin + NEK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. $p < 0.01$



Şekil - 13: Grupların histopatolojik değerlendirilmesi

*NEK (H/R) grubu ile Kontrol, Resveratrol + NEK ve Melatonin + NEK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. $p < 0.001$

**Resveratrol + NEK ve Melatonin + NEK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı $p > 0.05$

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın barsak doku düzeyi değerlendirildiğinde, NEK grubunda en yüksek MDA düzeyi, kontrol grubunda ise

en düşük MDA düzeyi saptandı. Çalışmaya alınan diğer gruplar MDA bakımından karşılaştırıldığında NEK grubuna göre resveratrol ve melatonin grubunda barsak doku MDA düzeyleri düşüktü ve istatistiksel olarak bir farklılık vardı ($p<0.01$) (Tablo-7).

GSH barsak doku düzeyleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında NEK grubunda aktivitesinin düşük olduğu, resveratrol+NEK ve melatonin+NEK gruplarında GSH aktivitesinin NEK grubuna göre artmış olmakla birlikte aradaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Sırasıyla $p<0.01$, $p<0.05$) (Tablo 7).

Tablo-7: Biyokimyasal olarak çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (yaş gram doku başına) glutatyon redüktaz (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ve bunların (ortalama ve dağılımı) istatistiksel değerlendirilmesi.

Gruplar	MDA nmol/g	GSH μmol/g
Kontrol	18.1 ± 5.44 (13 - 23.1) ***	0.61 ± 0.04 (0.47-0.74) †††
NEK	49.2 ± 8.09 (41.7 - 56.7) *	0.26 ± 0.04 (0.22 - 0.30) **
Resveratrol + NEK	30.0 ± 19.4 (28.2 - 31.8) †	0.41± 0.043 (0.34-0.46) ††
Melatonin + NEK	30.9 ± 3,76 (27.5 - 34.3)	0.37±0.063 (0.30-0.44)

* : NEK (H/R) grubu ile Kontrol, Resveratrol + NEK ve Melatonin + NEK grupları MDA arasında fark saptandı. (Sırasıyla $p=0.002$, $p=0.002$ ve $p=0.002$).

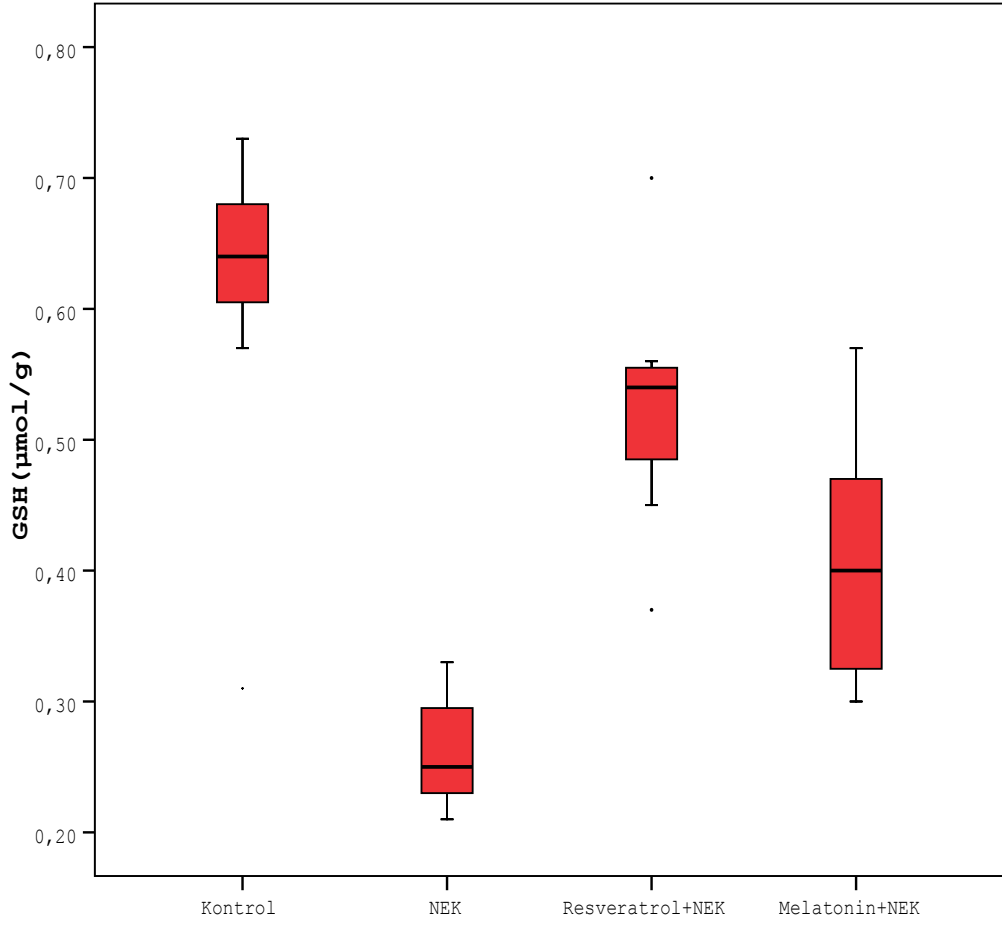
** : NEK grubu ile Kontrol, Resveratrol + NEK, Melatonin + NEK grupları GSH arasında fark saptandı (Sırasıyla $p=0.004$, $p=0.002$, $p=0.013$).

†: Resveratrol + NEK grubu ile Melatonin + NEK grupları MDA arasında fark bulunmadı.

††: Resveratrol + NEK grubu ile Melatonin + NEK grupları GSH arasında fark bulunmadı.

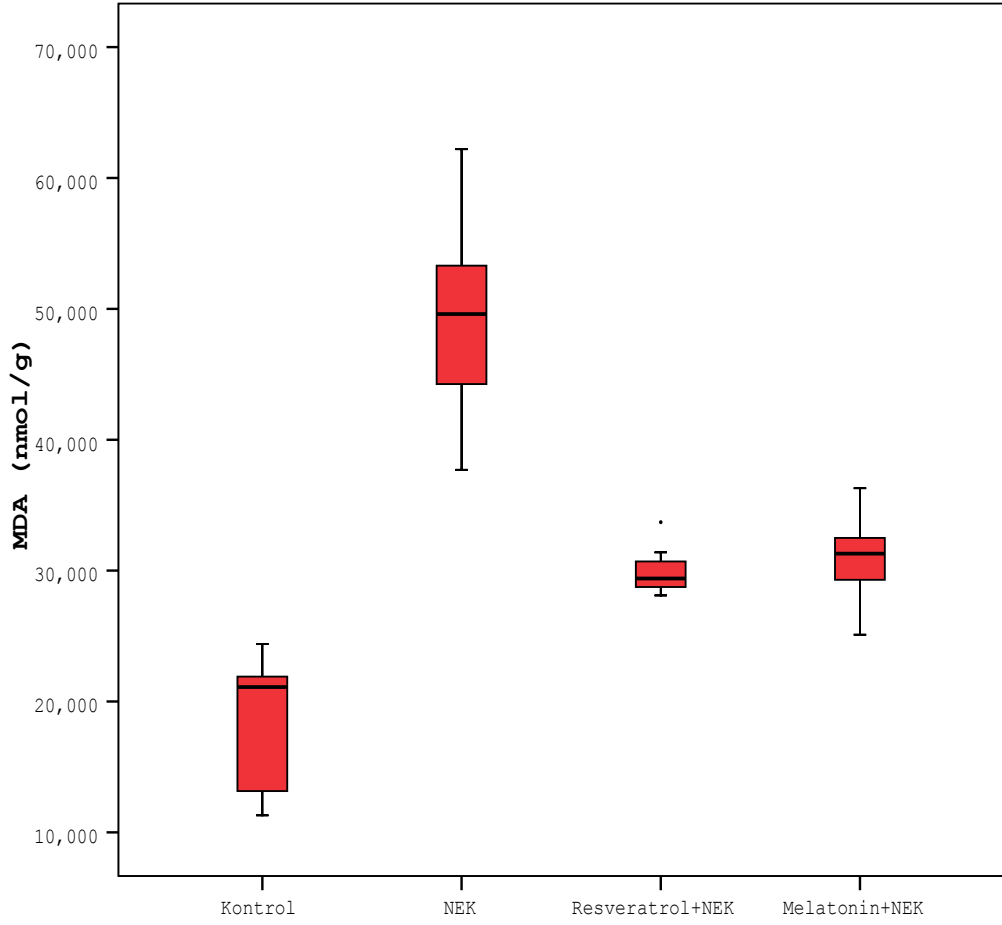
†††: Kontrol grubu ile Resveratrol + NEK, Melatonin + NEK grubu arasında GSH arasında fark var. ($p<0.05$)

***Kontrol grubu ile Resveratrol + NEK, Melatonin + NEK grubu arasında MDA arasında fark var. ($p<0.05$)



Şekil – 14: Gruplara göre GSH düzeyleri

NEK grubu ile Kontrol, Resveratrol + NEK, Melatonin + NEK grupları GSH arasında fark saptandı (Sırasıyla $p=0.004$, $p=0.002$, $p=0.013$)



Şekil – 15: Gruplara göre MDA düzeyleri

NEK grubu ile Kontrol, Resveratrol + NEK ve Melatonin + NEK grupları MDA arasında fark saptandı. (Sırasıyla $p=0.002$, $p=0.002$ ve $p=0.002$).

Barsak doku GSH düzeyleri değerlendirildiğinde, en düşük GSH düzeyi NEK grubunda saptandı. Resveratrol + NEK ve melatonin + NEK grubu GSH düzeyleri NEK grubuna göre belirgin yüksek bulundu. Bu istatistiksel olarak anlamlıydı (Resveratrol+NEK için $p<0.01$, Melatonin+NEK için $p<0.05$) (Tablo 7).

TARTIŞMA

Bu çalışmada H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan rat yavrularına, H/R öncesi profilaktik olarak resveratrol 30 mg/kg/gün, ip, melatonin 10 mg/kg/gün, ip uygulanarak, bu ilaçların histopatolojik, biyokimyasal olarak NEK'e karşı koruyucu etkinliği araştırıldı.

Nekrotizan enterokolit yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde yaklaşık olarak %1-7,7 oranında görülür. Esas olarak prematüre bebeklerde görülmekle birlikte, NEK gelişen bebeklerin %10'unu zamanında doğan bebekler oluşturmaktadır (21). Doğum ağırlığı ve gebelik yaşı azaldıkça, NEK insidansı artar (19,21). NEK çoğunlukla düşük doğum ağırlıklı prematürelerin hastalığıdır. NEK insidansı azalan doğum ağırlığı ve azalan gestasyon yaş ile orantılı olarak artmaktadır (17).

Wilson ve arkadaşları (70) 148 NEK'li hastayı değerlendirmişler ve en yüksek oranların 1000 gramın altındaki bebeklerde (% 42) olduğunu görmüşlerdir. Doğum ağırlığı 1000 - 1500 gram arasındaki bebeklerde % 39.0, 1501- 2000 arasındaki grupta % 3.8, 2500 gramın üstündeki bebeklerde ise % 0.11 oranında NEK saptamışlardır.

Hipoksinin gastrointestinal sistem motilitesi üzerine olumsuz etkilere neden olduğu da bilinmektedir. Hayvanlarda hipoksi oluşturularak yapılan bazı deneysel çalışmalarda hipoksinin intestinal intirinsik ritmi ve mide boşalmasını geciktirdiği, spontan barsak ve mide kontraksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir (71-73). Hayvan çalışmalarında intestinal iskemiye takiben reperfüzyon sonucu barsak nekrozu geliştiği gösterilmiştir (74).

Son dönemde oluşturulan deneysel hayvan modelleri, genellikle etyolojide en fazla suçlanan faktörler olan, prematürite, hipoksi, formüla mama ile beslenme, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı ve enfeksiyon temeline dayandırılmaktadır.

Bu modellerde oluşturulan barsak hasarlarında histopatolojik ve kimyasal olarak NEK benzeri değişiklikler ortaya konmuştur.

Barlow ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada hipoksi ve soğuk strese maruz bırakılan yenidoğan sıçanlarda NEK geliştiğini göstermişlerdir. Buna göre her gün 3-5 dakika hipoksi ve +7 C soğuk strese bırakılan sıçanların tamamında 4. günün sonunda NEK geliştiğini bildirmişlerdir (75).

Szabo ve arkadaşlarının 1985 yılında, Cohen ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptıkları çalışmalarda domuz yavrularında hipoksinin mukozal kan akımını azalttığı ve bunun mukozada iskemik değişiklikler oluşturduğu gösterildikten sonra Okur ve arkadaşları tarafından yenidoğan sıçanlarda geliştirilen hipoksi reoksijenizasyona dayalı deneysel NEK modeli birçok çalışmada kullanılmıştır (36,71,76,77,78).

Okur ve arkadaşları üç gün boyunca yenidoğan sıçanlarda önce beş dakika % 100 karbondioksit solutarak hipoksi, ardından beş dakika % 100 oksijen solutarak reoksijenizasyon sağladıklarını; bunun sonucunda tüm deneklerin barsak kesitlerinde ışık mikroskobu ile rahatlıkla izlenebilen NEK'in karakteristik değişikliklerini oluşturduklarını bildirmişlerdir (36).

Biz çalışmamızda Okur ve arkadaşlarının (36) hipoksi reoksijenizasyon yöntemini uygulayarak NEK oluşturduk. Bu yöntemi tercih etmemizin nedeni hipoksiye dayalı bu yöntemin bildirilmiş sonuçlarının tatminkar düzeyde olması, kolay uygulanabilir olması, tamamen anne bağımlı yenidoğan ratlarda formula mama ile oluşturulacak bir modelin ileri derecede uygulama güçlüğü ve kişiye özel uygulama hatalarına açık oluşudur.

NEK gelişen bebeklerin %90'ı pretermdir (4). Deneysel çalışmalarda yedi günlük ve daha büyük rat yavrularının santral sinir sistemi matürasyonunun term insan yavrularının beyin gelişimine denk geldiği, yedi günden küçük rat yavrularının preterm bebeklere denk geldiği, hatta üç günlük ratların 28-32 haftalık fetusa karşılık geldiği belirtilmektedir (79,80). NEK bir prematüre hastalığı olduğu için, çalışmamıza prematüre fetusa karşılık gelen postnatal 1-4 günlük rat yavruları alındı.

Çalışmada, Okur ve arkadaşlarının (36) modeli kullanılarak H/R yöntemiyle intestinal hasarlanma (NEK modeli) oluşturulan ratların terminal ileumundan alınan barsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar, mikroskopik olarak villüs epitel hücre nekrozu (evre 3) tam villüs nekrozu (evre 4) saptanırken, kontrol grubu tümüyle normal olarak bulundu. Histopatolojik değerlendirmede bulgularımız, uyguladığımız H/R modeli ile yapılan birçok deneysel çalışmadaki NEK grubu barsak histopatolojik bulguları ile benzerdi (36,38,77,81). Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi hipoksi/reoksijenizasyonun NEK patogeneğinde önemli bir risk faktörü olduğu gösterildi.

Membranda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu, hücre zarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlatılmaktadır. Hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asidi lipid radikali halini alır. Yapıda molekül içi çift bağların yer değiştirmesi ve ardından moleküler oksijenle etkileşim sonucunda lipid peroksil radikali ortaya çıkar. Bunlar da yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedirler. Lipid hidroperoksitleri yıkılarak biyolojik olarak aktif yapılar olan aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşürler. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (56). MDA ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesinde en sık başvurulan testtir. MDA ölçümü yaygın olarak TBA yöntemiyle yapılır. Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunu belirlemek için TBA değerlerini kullandık. Okur ve arkadaşları vit E nin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada H/R yöntemiyle NEK oluşturdukları ratlarda MDA düzeylerini yüksek bulmuşlardır (36).

Bıçakçı ve arkadaşları H/R yöntemiyle omeprazolun ve gentamisininin etkilerinin araştırdıkları başka bir çalışmada NEK oluşturdukları ratlarda MDA

düzenini yüksek bulmuşlardır (38). Çalışmamızda NEK grubunda barsak doku MDA düzeylerini kontrol grubuna, resveratrol ve melatonin gruplarına göre yüksek bulduk. Bu da istatistiksel olarak anlamlıydı.

Hipoksinin NEK oluşumuna olan etkisi azalmış mukozal kan akımı ve artmış oksijen ihtiyacı üzerinden olmaktadır. SOR H/R sırasında hızlı bir şekilde oluşmaktadır ve H/R hasarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir (2,12,13). Reperfüzyonun başında mitokondriyal solunum hızı ve serbest radikal üretimi belirgin derecede artar. Bu radikaller hücre içi serbest radikal yakalayıcı sistemlerin kapasitesini aşabilir ve hücre fonksiyon kaybına yol açabilirler. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin SOR'ne çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında O_2^- , H_2O_2 , OH^- , $ONOO^-$ vardır. Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler (16,17). Reperfüzyonda oksijenden başka kan hücreleri ve kompleman sisteminin aktivasyonu gibi diğer bazı faktörler de doku hasarına yol açar. Reperfüzyon başlangıcında meydana gelen olaylar enflamatuvar cevabın en önemli komponentleri olan nötrofiller ve endotelium arasındadır ve erken reperfüzyon hasarı olarak ifade edilir. Lökositlerin doku içine migrasyonu için mutlaka endotel ile temas etmeleri gerekir. İnfiltrate olan aktif nötrofiller reaktif oksijen radikalleri ve proteazları salgırlar. Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında kompleman 3a (C3a) ve IL-1, lökotrien B4 (LT-B4), PAF, Prostaglandin türleri vardır. Aktif lökositler NF-kB aktivasyonuna ve TNF- α sentezine yol açar. Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler mast hücrelerinden selektin ve hücre içi adezyon molekülü (ICAM) gibi adezyon moleküllerini mobilize eden enflamatuvar mediyatörlerin salınımını uyarır (82,83). Nötrofillerin saldıkları maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, aktif nötrofillerin damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları ve aktif plateletlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya neden olmalarından dolayı H/R hasarının önemli mediyatörleri olarak kabul edilmektedir.

İskemi sonrası erken reperfüzyon döneminde, enteral antioksidan mekanizmanın yetersiz kalması nedeni ile serbest oksijen radikallerinin miktarı artar ve ciddi enteral hasara neden olur. Kronik hastalıklar, iskemi, gibi patolojik durumlarda oluşan SOR'nin miktarı bu koruyucu mekanizmanın kapasitesini aşar ve oksidatif stres oluşur. Bu aşamada SOR'ni yakalayan maddeler ve antioksidanlar H/R hasarını azaltıcı ve düzeltici etki gösterir (84). Prematürelde hipoksi reoksijenizasyon sonrası yoğun olarak ortama salıverilen SOR'lerine karşı koruyucu olan antioksidan defans sistemleri yetersizdir (5-7,27,85,86). Enzimatik antioksidanlar içinde GSH-Px ve GSH önemli bir rol oynar (86). Dokuların oksijenizasyonu ile oluşan serbest radikalleri normal şartlar altında SOD, GSH ve katalaz gibi hücrel enzimatik antioksidan mekanizmalar etkisiz hale getirir.

GSH vücudun en önemli antioksidan intrasellüler moleküllerinden biridir (86). GSH pek çok serbest oksijen radikalini detoksifiye eder. Bununla birlikte peroksinitritin de üretimini azaltarak oksidasyon-redüksiyon dengesinin sağlanmasında önemli rol üstlenir. Glutasyon düzeyindeki göreceli düşüklük SOR'nin artmasına ve bunlar aracılığı ile oluşan doku hasarına neden olur. Hayvan çalışmalarında antioksidan enzimlerden GSH aktivitesinin düşük olduğu ve yaşla aktivitenin arttığı, üstelik NEK şiddetini belirgin azalttığı gösterilmiştir (87-89).

Bhatia ve arkadaşları 10 günlük sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada GSH düzeylerini iskemi grubunda kontrol grubuna göre düşük saptamışlar (90).

Kelly ve arkadaşları da yenidoğan sıçanlarda Formula mama ile oluşturdukları NEK modelinde GSH düzeylerini kontrol grubuna göre düşük saptamışlar (91).

Resveratrol kuvvetli ve doğal bir antioksidandır. SOR'lerini nötralize ederek lipid peroksidasyonunu önlediği, trombosit agregasyonu inhibisyonu ve buna ek olarak süperoksit bağımlı proenflamatuvar stimulusu baskıladığı, lökositlerin aktivasyonunu engelleyerek antienflamatuvar etkinlik gösterdiği, endotelin bariyer fonksiyonunu koruduğu, nitrik oksit üzerinden vazodilatasyon yaptığı bildirilmiştir

(58-60). Resveratrolün oksidatif stres altındaki mitokondri fonksiyonlarını membran stabilizasyonu ve antioksidan etkileri nedeniyle koruduğu gösterilmiştir (61).

Şener ve arkadaşları (65) iskemi/reperfüzyon oluşturdukları rat böbreğinde resveratrolün koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, iskemik renal dokuda MDA düzeyinin yükselip glutatyon düzeyinin azaldığını, iskemi öncesi koruyucu olarak resveratrol verdikleri grupta ise MDA düzeyinin azalıp glutatyon düzeyinin arttığını ve histopatolojik görünümün gerilediğini saptayarak resveratrolün iskemi/reperfüzyonda koruyucu olduğunu göstermişlerdir.

Huang ve arkadaşları (92) resveratrolün fokal serebral iskemide potent nöroprotektif etkinliği olduğu ve bu etkinliğin beyin dokusunun iskemiye takip eden reperfüzyonu sırasında oluşan masif miktarlardaki SOR'lerine yönelik yaptığı süpürücü etkiye, gelişen vazodilatasyon ve trombosit agregasyonunun inhibisyonu ile beyin perfüzyonunu arttırmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Elmalı ve arkadaşları (93) iskemi reperfüzyon yaralanmasında resveratrol'un iskelet kası üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, resveratrolün kas dokusunda polimorf çekirdekli lökosit infiltrasyonunu, kas ödemi azalttığını, MDA düzeyini düşürdüğünü saptamışlardır.

Resveratrol antioksidan işlevini güçlü SOR yakalayıcısı olarak yapmaktadır. Resveratrol, biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (12).

Das ve arkadaşları resveratrolün insan lenfositlerinde, glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz gibi glutatyon metabolizması ile ilgili enzimlerin miktarını arttırdığını göstermişlerdir (94).

Şener ve arkadaşları Wistar albino sıçanlarda resveratrolün iskemi-reperfüzyon hasarına karşı renal dokuyu koruyucu etkisini radikalleri yakalama ve antioksidan etkinliği ile gerçekleştirdiğini, GSH düzeyinin korunmasını sağlayarak renal dokuyu oksidatif strese karşı koruduğunu göstermişlerdir (65).

Altun ve arkadaşları resveratrol'ün in vitro insan umbilikal ven endotel hücrelerinde hipoksi-reoksijenasyon hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında resveratrolün SOR'ni azalttığını göstermişler (95).

Brito ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sığır aortik endotel hücresinde peroksinitritin aracılık ettiği endotel hücre toksisitesinde resveratrolün değişik doz ve sürelerinin etkisini hücre canlılığı, okside ve redükte glutasyon düzeyi ile değerlendirmişlerdir. Resveratrolün peroksinitritin indüklediği oksidatif strese karşı hücre içi GSH düzeyini arttırarak kardioprotektif etki sağladığını göstermişlerdir (96).

Grissa ve arkadaşları resveratrolün etanole bağlı lipid peroksidasyonunu önlemedeki etkinliğine baktıkları çalışmalarında resveratrolün lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerini azaltarak oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu saptamışlar (97).

Ergün ve arkadaşları hipoksi ile oluşturdukları deneysel nekrotizan enterokolit modelinde resveratrolün enteral beslenmeye eklenmesiyle, NEK gelişiminde rolü olan intestinal nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesini azaltarak NEK gelişimini engellediğini göstermişlerdir (98).

Yıldız ve arkadaşları resveratrolün koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında mezenterik arteri bağlayarak oluşturdukları hipoksi-reoksijenizasyon modelinde resveratrolün iskemik doku histopatolojisini düzelterek antioksidan enzimlerden katalazın düzeyini artırıp, enflamatuvar mediatörlerden myeloperoksidaz (MPO)'ı azaltarak dokuyu intestinal iskemiye karşı koruduğunu saptamışlardır (99).

Çalışmalarında NEK grubunda normal villüs yapısının bozulduğunu resveratrol grubunda ise villüs yapısının korunduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçları bu çalışma ile benzerdi. Biz çalışmamızda NEK grubunda

villüs yapısının bozulduğunu resveratrol grubunda ise villüs yapısının korunduğu saptadık.

Resveratrol ile olan çalışmamızda NEK grubunda MDA yüksek GSH düşük saptandı. Profilaktik verilen resveratrol'un MDA'yı azalttığı, GSH düzeylerini arttırdığı görüldü. Resveratrolun MDA'yı azaltıcı GSH'ı artırıcı etkisi SOR'ni nötralize ederek lipid peroksidasyonunu önlemesinden kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda resveratrolun histopatolojik olarak NEK'te belirgin koruyucu etkinliği olduğu gösterildi. Ayrıca antioksidatif defans sistemlerinden GSH düzeylerini anlamlı oranda artırdığı saptandı. Bu sonuç resveratrolun antioksidatif kimliğe sahip olduğunu desteklemektedir.

Melatonin, epifiz bezinde triptofandan sentezlenir ve plazmada proteinlere bağlıdır. Dolaşımdan hücre içine alınan triptofan, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana, bu ise aromatik amino asit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) aracılığı ile 5-hidroksitriptamine (5-HT, serotonin) dönüştürülür. Serotonin, arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) ile N-asetilserotonine (NAS) ve son olarak N-asetilserotonin hidroksiindol- O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine (5-metoksi-N asetiltriptamin) dönüştürülür. Pineal bezde melatonin yapılması ve saliverilmesi karanlık ile uyarılır, ışık ile baskılanır. Beyinde bulunan nöroendokrin bir organ olan pineal bez dış çevrenin aydınlık ve karanlık olmasına göre organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere bir çok sistemin fonksiyonundaki değişiklikleri düzenler. Uyku, ruhsal durum, üreme, tümör gelişimi ve yaşlanma gibi birçok olayın biyolojik regülasyonunda rolü bulunmaktadır (100).

Melatoninin antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve ark (101) tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan *in vitro* (102,103) ve *in vivo* (104) çalışmalarla desteklenmiştir. İskemi/reperfüzyon sırasında iskemik dokunun hızla tekrar oksijenlenmesi sonucunda fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşur. Melatonin H/R hasarında koruyucu etki gösterir. Koruyucu etkisi antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır (105). Melatonin, elektrondan zengin bir moleküldür ve direkt antioksidan özelliği vardır (13,16). Melatoninin prekürsörleri olan triptofan ve 5-OH triptaminin de antioksidan aktivitesi gösterilmiştir. Bu aktivite, SOR'yi

yakalayabilen indol yapısına bağlıdır (105). Melatoninin antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir. Bunlardan ilki direkt antioksidan etkidir. Burada oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir. Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan indol halkasından kaynaklanmaktadır. İkincisi antioksidan özelliği enzim aracılı etkidir. Burada farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin, SOD, GSH-Px, GSH, G-6-PD ve glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir. Üçüncü etkisi ise melatoninin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir. In vivo ve in vitro şartlarda NO ve daha ileri aşamada ONOO⁻ oluşumuna neden olan NOS aktivitesinin, fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir (106).

Melatoninin, iskemik dokudaki diğer bir koruyucu etkisi de, lökosit adezyonunu azaltmasıdır. Melatonin, adezyon molekülleri P selektin ve ICAM sentezini azaltarak; nükleustaki NF-kB'nin aktivasyonunu baskılayarak H/R süresince iskemik doku hasarının azalmasında yararlı etkiler gösterir (14). İskemi nötrofil migrasyonuna neden olur ve yoğun nötrofil infiltrasyonu serbest radikal üretir. Bunlar lipid peroksidasyonu ve beraberinde hücreyi nekroza götüren olaylara yol açarlar. Melatoninin trombosit agregasyonunu ve lipid peroksidasyonunu azaltabilir (15).

Kaçmaz ve arkadaşları ratlarda H/R hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisini araştırdıkları bir çalışmada sadece iskemi reperfüzyon grubunda MDA düzeylerinin yüksek, antioksidan enzimlerden GSH düzeylerini düşük bulmuşlar. Melatonin verip koruyucu etkisine baktıkları grupta ise MDA'yı düşük antioksidan enzimlerden GSH'ı yüksek bulmuşlar (107).

Uysal ve arkadaşları yapmış olduğu bir çalışmada; melatoninin alt ekstremitte geçici iskemi-reperfüzyonuna bağlı akciğerlerde oluşan hasarı azalttığını saptamışlar.

Melatoninin bu koruyucu etkisini lipid peroksidasyonunu önlemesi ve serbest radikal süpürücü aktivitesi ile ilgili olduğu sonucuna varmışlardır (108).

Şahna ve arkadaşları melatoninin iskemi/reperfüzyonda koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında melatoninin iskemi/reperfüzyon' da infarkt alanını ve miyokarda oksidatif hasarın göstergesi MDA düzeyini anlamlı azalttığını, antioksidan savunma sisteminde önemli rolü olan GSH seviyesini artırdığını belirlemişlerdir (66).

Kesik ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada mezenter arteri bağlayarak oluşturdukları intestinal hipoksi/reoksijenizasyon modelinde melatoninin intestinal doku MDA'sını düşürüp SOD ve GSH artırarak koruyucu olduğunu saptamışlardır (109).

Li ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada melatoninin intestinal hipoksi reoksijenizasyonda koruyucu etkisini araştırmışlar. Hipoksi-reoksijenizasyon grubunda MDA'yı yüksek bulmuşlar, melatonin vererek MDA düzeyinin azaldığını saptamışlardır (110).

Melatoninin H/R hasarını önleyici etkisi karaciğer, böbrek ve beyin gibi diğer birçok organda da belirlenmiştir. Şahna ve arkadaşları (111) sağ nefrektomi yaptıkları sıçanların sol böbreklerine klemp ile 60 dakika iskemi 24 saat reperfüzyon uygulamış ve morfolojik değişiklikleri incelemiştir. Melatonin, hem H/R'nun indüklediği yapısal değişiklikleri azaltırken, hem de lipid peroksidasyonunun göstergesi MDA düzeyini anlamlı olarak azaltmıştır.

Çalışmamızda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA NEK grubunda yüksek, melatonin grubunda düşük bulundu. İntestinal doku MDA, GSH aktiviteleri değerlendirildiğinde; NEK grubunda MDA yüksek GSH düşük saptandı. Profilaktik verilen melatoninin MDA'yı azalttığı ve GSH düzeylerini arttırdığı görüldü. Melatoninin MDA'yı düşürüp GSH'ı artırması melatoninin güçlü bir SOR'li önleyici etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Yenidoğan ratlarda H/R oksidatif hasardır. Çünkü H/R uygulanması sonrası hasar gelişen NEK grubunda MDA düzeyinin anlamlı artışı yanısıra antioksidan enzimlerden GSH'da düşüş izlenmiştir. Antioksidan ilaç olarak uyguladığımız resveratrol ve melatoninin her ikisinin de H/R'na bağlı oksidatif hasarı düzeltici etkilerinin olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak deneysel olarak NEK oluşturduğumuz yenidoğan ratlarda profilaktik olarak denediğimiz resveratrol ve melatoninin intestinal hasarı azaltmada etkili bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz; ancak NEK tedavisinde resveratrol ve melatoninin etkinliğini gösterecek daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

1. H/R yöntemi ile NEK modeli oluşturularak yapılan çalışmada, gruplardaki ratların vücut ağırlıkları arasında çalışma boyunca bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).
2. Histopatolojik incelemede kontrol grubu grade 1 olarak değerlendirilirken, NEK grubu evre 3-4, Resveratrol grubu evre 2-3, Melatonin grubu evre 2-3 ve olarak değerlendirildi. Resveratrol ve melatonin NEK'te koruyucu olduğu saptandı ($p<0.01$).
3. Biyokimyasal incelemede barsak dokusu MDA düzeyinin NEK grubunda en yüksek, kontrol grubunda en düşük olduğu; Resveratrol ve melatoninin barsak doku MDA düzeyini azalttığı görüldü ($p<0.01$).
4. Antioksidatif defans sistemi açısından gruplar değerlendirildiğinde redükte glutatyon (GSH) aktiviteleri NEK grubunda düşük saptandı. Profilaktik verilen resveratrol ve melatoninin GSH düzeylerini arttırdığı görüldü (Resveratrol $p<0.01$) (Melatonin $p<0.05$).
5. Bu sonuçlarla Resveratrolün ve Melatoninin NEK'e karşı koruyucu etkinliğinin olduğu görüldü.

ÖZET

Nekrotizan enterokolit modeli oluşturulan ratlarda profilaktik olarak kullanılan Resveratrol and Melatonin'in gastrointestinal sisteme, oksidatif strese etkileri

Dr. Tamer ÖZSARI

Bu çalışmada sıçan yavrularında hipoksi–reoksijenizasyon (H/R) modeli uygulanarak oluşturulan intestinal hasarda, H/R'den önce profilaktik uygulanan resveratrol ve melatonin koruyucu etkileri araştırıldı.

Bir günlük 28 adet *Wistar* albino türü sıçanlar randomize olarak Kontrol, NEK, Resveratrol+NEK, Melatonin+NEK olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kontrol ve NEK grubuna % 0.9'luk serum fizyolojik, Resveratrol+NEK grubuna resveratrol 30 mg/kg/gün, Melatonin+NEK grubuna melatonin 10 mg/kg/gün, günde bir kez üç gün süreyle verildi. Dördüncü günde, kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlar hava geçirmez kapalı bir ortamda, önce beş dk süreyle % 100 CO₂, hemen ardından beş dk % 100 oksijen solutulularak, H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturuldu. H/R'den en az dört saat sonra tüm sıçanlar dekapite edildi. Histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için barsak doku örnekleri alındı. Barsak doku örneklerinden biyokimyasal olarak malondialdehid (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ölçüldü.

Çalışma sonunda, histopatolojik olarak en ağır hasarlanmanın NEK grubunda olduğu, Resveratrol ve melatoninin NEK'e karşı histopatolojik olarak belirgin koruyucu olduğu saptandı. Barsak dokusunda MDA düzeylerinin NEK grubunda belirgin arttığı, buna karşın GSH aktivitesinin belirgin azaldığı görüldü. Resveratrol ve melatoninin MDA düzeylerini belirgin azalttığı, GSH aktivitesini belirgin arttırdığı görüldü.

Sonuç olarak H/R'nun ratlarda NEK gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu, Resveratrol ve Melatoninin NEK'e karşı belirgin koruyucu etkilere sahip oldukları bulundu.

SUMMARY

Protective Effects of Resveratrol and Melatonin on Gastrointestinal System and Oxidative Stress and Effects on Rats with Hypoxia /Reoxygenation - Induced Intestinal Injury

Dr. Tamer ÖZSARI

In this study, the protective effects of resveratrol and melatonin were investigated in rats with hypoxia/reoxygenation (H/R) induced intestinal injury.

One day old, 28 wistar-albino rat pups were randomly divided into four groups as Control, H/R (NEC), Resveratrol+NEC, Melatonin+NEC. Saline solution % 0.9 for control and NEC group, resveratrol (30mg/kg/day) for Resveratrol+NEC group, melatonin (10mg/kg/day) for Melatonin+NEC group were admitted for three days once daily intraperitoneally. On day four, all rats except for control group were placed into a chamber of 100% CO₂ for five min, then they were reoxygenized with 100% O₂ for the next five min. All rats were sacrificed at least four hour after the H/R. Intestine tissue samples (ITs) were extracted for histopathological connective tissue score (CTS) and biochemical examination. The levels of malonyldialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) were measured on ITs.

At the end of the study, the NEC group had the worst CTS. Resveratrol and melatonin had histopathologically significant protective effect on intestinal injury ($p<0.01$). The levels of MDA ITs were significantly increased, whereas GSH and activities of them were significantly decreased in the NEC group. Resveratrol and Melatonin significantly decreased the levels of MDA and increased the activity of GSH ($p<0.01$).

In conclusion, H/R is an important risk factors for NEC. Resveratrol and Melatonin have protective effect on intestinal injury in NEC

KAYNAKLAR

1. Oygür N, Nekrotizan Enterokolit. Editör: Yurdakök M, Erdem G. Neonatoloji. Ankara: Alp Ofset,2004: 552-556.
2. Karaman A. Çakmak Ö. Nekrotizan Enterokolit. Türkiye Klinikleri J Pediatrik Cerrahi-Special Topics 2008;1: 69-77.
3. Lin PW, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis. Lancet 2006;368: 1271-1283.
4. Gibbs K, Lin J, Holzman R. Necrotizing Enterocolitis. Indian J Pediatr. 2007;74: 67-72.
5. Caplan M. Neonatal necrotizing enterocolitis. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh M, editors. Neonatal-Perinatal Medicine Diseases of the Fetus and Infant. Philadelphia: Mosby Elsevier 2006: 1403-1417.
6. Yurdakök M. What next in necrotizing enterocolitis? Turk J Pediatr 2008;50: 1-11.
7. Neu J. Necrotizing enterocolitis: The search for a unifying pathogenetic theory leading to prevention. Pediatr Clin North Am 1996;43: 409-432.
8. Covert RF, Neu J, Elliott MJ. Factors associated with age of onset of necrotizing enterocolitis. Am J Perinatol 1989;6: 455-460.
9. Frost BL, Jilling T, Caplan MS. The importance of pro-inflammatory signaling in neonatal necrotizing enterocolitis. Semin Perinatol 2008;32: 100-106.

- 10.** Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro and counter inflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1999;103: 766-771.
- 11.** Markel TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Pitcher J, Tsai BM, Meldrum DR. Cytokines in necrotizing enterocolitis. *Shock* 2006;25: 329-337.
- 12.** Ng PC, Li K, Wong RP. Proinflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88: 209-213.
- 13.** Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res* 2006;53: 6-15.
- 14.** Alarcan de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156-1160.
- 15.** Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000;9: 160-171.
- 16.** Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003;58: 10-19.
- 17.** Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc West Pharmacol Soc* 1998;41: 229-236.

- 18.** Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997;60: 2255-2271.
- 19.** Hsueh W, de Plaen IG, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, Gonzalez-Crussi W. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical aspects, experimental models and pathogenesis. *World J Pediatr* 2007;3: 17-29.
- 20.** Kim SS, Albanese CT. Necrotizing enterocolitis. In: Grosfeld JL, O'Neill JA, Coran AG, Fonkalsrud EW, editors. *Pediatric Surgery*. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006;1427-1452.
- 21.** Boston VE. Necrotizing enterocolitis and localized intestinal perforation: different diseases or ends of a spectrum of pathology. *Pediatr Surg Int* 2006;22: 477-484.
- 22.** Sharma R, Tepas JJ, Hudak ML, Mollitt DL, Wludyka PS, Teng RJ, et al. Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2007;42: 454-461.
- 23.** Pietz J, Achanti B, Lilien L, Stepka EC, Mehta SK. Prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a 20-year experience. *Pediatrics* 2007;119: 164-170.
- 24.** St Peter SD, Ostlie DJ. Necrotizing enterocolitis. In: Ashcraft KW, Holcomb III GW, Murphy JP, editors. *Pediatric Surgery*. Elsevier Saunders;2005: 461-476.
- 25.** Henry CM, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2004;28: 221-233.

- 26.** Teasdale F, Le Guennec JC, Bard H, Perreault G, Doray B. Neonatal necrotizing enterocolitis: the relation of age at the time of onset to prognosis. *Can Med Assoc J* 1980;123: 387-390.
- 27.** Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986;33: 179-201.
- 28.** Berseth CL. Gestational evolution of small intestine motility in preterm and term infants. *J Pediatr* 1989;115: 646–651.
- 29.** Crissinger KD. Understanding necrotizing enterocolitis-promising directions. *Pathophysiology* 1999;5: 247-256.
- 30.** Jadcherla SR, Berseth CL. Effect of erythromycin on gastroduodenal contractile activity in developing neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34: 16-22.
- 31.** Başaklar A C. Yenidoğanlarda gastrointestinal kanama. Editör: Başaklar A C. *Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006;757–783.
- 32.** Ross G. Escape of mesenteric vessels from adrenergic and nonadrenergic vasoconstriction. *Am J Physiol* 1971;221: 1217-1222.
- 33.** Kosloske AM. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 1994;396: 2-7.
- 34.** Carrion V, Egan EA. Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;11: 317-323.
- 35.** Martin CR, Walker WA. Intestinal immune defences and the inflammatory response in necrotising enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11: 369-377.

- 36.** Okur H, Küçükaydın M, Köse K, Kontaş O, Doğan P, Kazez A. Hipoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995;30: 1416-1419.
- 37.** Cueva JP, Hseueh W. Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 1988;29: 1207-1212.
- 38.** Bıçakçı Ü, Tander B, Aritürk E, Aydın BK, Aydın O, Rizalar R, et al. Effects of omeprazole and gentamicin on the biochemical and hisyopathological alterations of the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 2005;21: 800-805.
- 39.** Öztürk H, Dokucu Aİ, Ogün C, Büyükbayram H. Protective effects of human interleukin-10 on intestines of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rats. *J Pediatr Surg* 2002;37: 1330-1333.
- 40.** Çetinkaya M, Köksal N. Nekrotizan Enterokolit. *Güncel Pediatri* 2004;2: 146-151.
- 41.** Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14: 145-151.
- 42.** Travadi J, Patole S, Charles A, Dvorak B, Doherty D, Simmer K. Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 2006;60: 185-189.
- 43.** Akısü M, Girgin FK, Baka M, Hüseyinov A, Kültürsay N. Role of recombinant erythropoetin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 200;11: 167-172.

- 44.** Stoll BJ. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994;21: 205-218.
- 45.** Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1990;336: 1519-1523.
- 46.** Bersth CL, Bisquera JA, Pale VU. Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003;111: 529-534.
- 47.** Lawrence G, Bates J, Gaul A. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1982;1: 137-139.
- 48.** Caplan MS, MacKendrick W. Inflammatory mediators and intestinal injury. *Clin Perinatol* 1994;21: 235-246.
- 49.** Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S: Bifidobacterial supplementantion reduces the incidince of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999;116: 960-964.
- 50.** Akısü M, Baka M, Yalaz M, Hüseyinov A, Kültürsay N. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenation–induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Eur J Pediatr Surg* 2003;13: 319-323.
- 51.** Hutter JJ Jr, Hathaway WE, Wayne ER. Hematologic abnormalities in severe neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1976;88: 1026-1031.
- 52.** Dimmit RA, Lawrance R. Clinical management of necrotizing enterocolitis. *American Academy of Pediatrics* 2001;2: 110-117.

- 53.** Hormann M, Pumberger W, Puig S, Kreuzer S, Metz VM. Necrotizing enterocolitis NEC in the newborn *Radiologe* 2000;40: 58-62.
- 54.** Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis: therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978;187: 1-7.
- 55.** Kılınç T, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002;33: 110-118.
- 56.** Delibaş N, Özcankaya R. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 1995;2: 11-17.
- 57.** Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4: 92-95
- 58.** Fremont L. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sciences* 2000;66: 663-673.
- 59.** Olas B, Wachowicz B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets* 2005;16: 251–260.
- 60.** Alarcon de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* 2005;49: 405-430.
- 61.** Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Resveratrol-induced limitation of dysfunction of mitochondria isolated from rat brain in an anoxia-reoxygenation model. *Life Sci* 2002;15: 3091-3108.
- 62.** Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997;336: 186-195.

- 63.** Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994;55: 271-276.
- 64.** Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 1998;24: 83-89.
- 65.** Şener G, Tuğtepe H, Yüksel M, Çetinel Ş, Gedik N, Yeğen B Ç. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res* 2006;37: 822–829.
- 66.** Sahna E, Parlakpınar H, Türköz Y, Acet A. Effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-induced infarct size and oxidative stress. *Physiol Res* 2005;54: 491-495.
- 67.** Özkan KU, Özokutan BH, İnanç F, Boran Ç, Kiliç M. Does maternal nicotine exposure during gestation increase the injury severity of small intestine in the newborn rats subjected to experimental necrotizing enterocolitis. *J Ped Surg* 2005;40: 484-488.
- 68.** Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95: 351-358.
- 69.** Beutler E. *A Manual of Biochemical Methods*. Grune & Stratton, New York, 1975; 112–114.
- 70.** Wilson R, Kanto WP Jr, McCarthy BJ, Burton T, Lewin P, Terry J, et al. Epidemiologic characteristics of necrotizing enterocolitis: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1981;114: 880-887.
- 71.** Szabo JS, Stonestreet BS, Oh W. Effects of hypoxemia on gastrointestinal blood flow and gastric emptying in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1985;9: 466-471.

- 72.** Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig Dis Sci* 1997;42: 878-884.
- 73.** Hebra A, Brown MF, McGeehin K, Broussard D, Ross AJ. The effects of ischemia and reperfusion on intestinal motility. *J Pediatr Surg* 1993;28: 362-365.
- 74.** Hayashi S, Gleason WA, McFee AS, Park MK. Effects of pH alterations and hypoxia on isolated human intestine. *Scand J Gastroenterol* 1986;21: 9-15.
- 75.** Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episode of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. *Surgery* 1975;77: 687-690.
- 76.** Cohen IT, Nelson SD, Moxley RA, Hirsh MP, Counihan CT, Martin RF. Necrotizing enterocolitis in a neonatal piglet model. *J Pediatr Surg* 1991;26: 598-601.
- 77.** Kazez A, Küçükaydın N, Küçükaydın M, Konaş O, Okur H, Doğan P. A model of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis: the role of distension. *J Pediatr Surg* 1997;32: 1466-1469.
- 78.** Özkan UK, İnanç F, Kılınç M, Boran Ç. Leptin tedavisi yenidoğan rat incebarsağında hipoksi/reoksijenasyon hasarına karşı koruyucu mudur? *Fırat Tıp Dergisi* 2005;10: 5-9.
- 79.** Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl* 1997;422: 85-88.
- 80.** Yossuck P, Kraszpulski M, Salm AK. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volume during brain development in the rat model. *Early Hum Dev* 2006;82: 267-272.

- 81.** Canpolat FE, Yurdakök M, Özsoy Ş, Hazıroğlu R, Korkmaz A. Protective effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 719-723.
- 82.** Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/ reperfusion. *Circulation* 1998;98: 699-710.
- 83.** Fontana L, Giagulli C, Minuz P, Lechi A, Laudanna C. 8-iso-PGF (2alpha)-induces beta (2)-integrin-mediated rapid adhesion of human polymorphonuclear neutrophils: a link between oxidative stress and ischemia/reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21: 55-60.
- 84.** Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol* 1994;233: 601-610.
- 85.** Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003;349: 1605-1613.
- 86.** Hall NJ, Ali J, Pierro A, Eaton S. Total glutathione is not decreased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2005;94: 132-137.
- 87.** Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jügens G. The rol of lipid peroksidation and antioxidants in oxidatif modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13: 341-390.
- 88.** Crissinger KD, Granger DN. Mucosal injury induced by ischemia and reperfusion in the piglet intestine: Influences of age and feeding. *Gastroenterology* 1989;97: 920-926.

- 89.** Crissinger KD, Grisham MB, Granger DN. Developmental biology of oxidant-producing enzymes and antioxidants in the piglet intestine. *Pediatr Res* 1989;25: 612-616.
- 90.** Bhatia AM, Feddersen RM, Musemeche CA. The role of luminal nutrients in intestinal injury from mesenteric reperfusion and platelet-activating factor in the developing rat. *J Surg Res.* 1996;63: 152-156.
- 91.** Kelly N, Friend K, Boyle P, Zhang XR, Wong C, Hackam DJ, et al. The role of the glutathione antioxidant system in gut barrier failure in a rodent model of experimental necrotizing enterocolitis. *Surgery* 2004;136: 557-566.
- 92.** Huang SS, Tsai MC, Chih CL, Hung LM, Tsai SK. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia *Life Sci* 2001;69: 1057-1065.
- 93.** Elmalı N, Esenkaya İ, Karadağ N, Taş F, Elmalı N. Effect of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2007;13: 274-280.
- 94.** Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 2006;6: 36- 47.
- 95.** Altun Z, Eğrilmez MY, Biçer NY, Genç K, Genç S, Sayin O, et al. Protective effects of resveratrol against in vitro hypoxia reoxygenation injury in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS J* 2007;274: 362-365.
- 96.** Brito PM, Mariano A, Almeida LM, Dinis TCP. Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem Biol Interact* 2006;164: 157-166.

- 97.** Grissa AK, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol and Alcoholism* 2006;41: 1-4.
- 98.** Ergün O, Ergün G, Öktem G, Selvi N, Doğan H, Tunçyürek, et al. Enteral resveratrol supplementation attenuates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase activity and mucosal damage in experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2007;42: 1687–1694.
- 99.** Yildiz F, Terzi A, Çoban S, Çelik H, Aksoy N, Bitiren M. et al. Protective effects of resveratrol on small intestines against intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Gastroenterohepatol* 2009; Sep 25. (Epub ahead of print)
- 100.** Armağan A, Vardar A, Altun B U. Melatonin ve Kardiyovasküler Sistem. *Ana Kar Der* 2001;1: 283-288.
- 101.** Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom J Endocrinol* 1991;29: 117-123.
- 102.** Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J Med Biol Res* 1993;26: 1141-1155.
- 103.** Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res* 1998;24: 96-101.
- 104.** Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia reperfusion: Protection by melatonin. *Hepatology* 1996;43: 898-905.
- 115.** Leon J, Castroviejo D, Sainz R, Mayo J, Tan DX, Reiter R. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004;75: 765-90.

106. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2004;13: 56-65.

107. Kaçmaz A, User EY, Sehirli AO, Tilki M, Ozkan S, Sener G. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. Surg Today 2005;35: 744-750.

108. Uysal A, Burma O, Akar İ, Özsin K.K, Rahman A, Üstündağ B. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2006;14: 308-314.

109. Kesik V, Güven A, Vurucu S, Tunç T, Uysal B, Gündoğdu G, et al. Melatonin and 1400 W Ameliorate both Intestinal and Remote Organ Injury Following Mesenteric Ischemia/Reperfusion. J Surg Res 2009;14: 1-9.

110. Li JY, Yin HZ, Gu X, Zhou Y, Zhang WH, Qin YM. Melatonin protects liver from intestine ischemia reperfusion injury in rats. World J Gastroenterol. 2008;28: 7392-7396.

111. Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Urol Res 2003;31: 188-193.

EKLER

Tablo - 8: Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının birinci gün vücut ağırlıkları (gr)

Rat No	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
1	5.9	6.4	5.5	5.6
2	5.2	5.2	6.3	6.0
3	6.0	6.1	6.3	5.7
4	6.0	6.1	5.4	6.0
5	5.5	6.3	5.5	5.6
6	5.8	6.3	5.5	5.6
7	6.4	5.8	5.7	5.8

Tablo - 9: Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının ikinci gün vücut ağırlıkları (gr)

Rat No	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
1	6.1	7.5	6.7	7.4
2	6.1	6.7	7.6	6.4
3	6.7	7.2	7.5	6.5
4	7.2	6.7	6.5	6.8
5	6.4	6.6	7.6	6.7
6	6.8	6.8	6.5	6.6
7	6.6	6.4	7.0	6.7

Tablo - 10: Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının üçüncü gün vücut ağırlıkları (gr)

Rat No	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
1	7.1	8.1	7.3	7.9
2	7.0	8.0	8.4	8.0
3	7.4	8.1	8.3	7.8
4	8.7	7.7	8.2	7.9
5	7.7	7.9	8.6	8.1
6	7.5	7.6	7.2	7.8
7	7.8	7.8	7.9	8.3

Tablo - 11: Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının intestinal sistem histopatolojik değerlendirme (evre) skorları.

Rat No	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
1	1	3	2	3
2	1	3	3	2
3	1	4	2	2
4	1	3	2	3
5	1	3	2	3
6	1	3	3	2
7	1	3	2	2

Kısaltmalar: Histopatolojik skora: *Evre 1:* Normal histoloji, *Evre 2:* (Minimal) Hidropik dejenerasyon ve/veya yüzeysel epitel hücrelerinin seperasyonu, *Evre 3:* (Hafif) Villüs epitel hücre nekrozu, *Evre 4:* (Orta) Tam villüs nekrozu, *Evre 5:* (Şiddetli) Transmural nekroz.

Tablo - 12: Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (nmol/gr) malondialdehid (MDA) düzeyleri

Rat No	Grup	Grup	Grup	Grup
	I	II	III	IV
	MDA (nmol/g)	MDA (nmol/g)	MDA (nmol/g)	MDA(nmol/g)
1	11.3	53.4	28.1	25.1
2	14.7	46.4	31.4	33.3
3	24.4	37.7	29.4	31.3
4	21.8	42.1	28.8	27.5
5	22.0	62.2	33.7	36.3
6	21.1	53.2	28.7	31.1
7	11.6	49.6	30.0	32.7

Tablo - 13: Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki $\mu\text{mol/g}$ redükte glutatyon (GSH) düzeyleri

Rat No	Grup	Grup	Grup	Grup
	I	II	III	IV
	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	GSA ($\mu\text{mol/g}$)	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	GSH($\mu\text{mol/g}$)
1	0.31	0.24	0.46	0.43
2	0.64	0.33	0.45	0.32
3	0.73	0.27	0.41	0.30
4	0.57	0.25	0.41	0.42
5	0.71	0.21	0.37	0.41
6	0.65	0.22	0.34	0.44
7	0.64	0.32	0.40	0.30