

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

**DESFEROKSAMİN VE N-ASETİL SİSTEİNİN  
NEKROTİZAN ENTEROKOLİT OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA HİSTOPATOLOJİYE, OKSİDATİF STRES  
VE APOPİTOZA ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. ŞENOL BAĞCI**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. AKİLE SARIOĞLU-BÜKE**

**DENİZLİ-2010**

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

**DESFEROKSAMİN VE N-ASETİL SİSTEİNİN  
NEKROTİZAN ENTEROKOLİT OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA HİSTOPATOLOJİYE, OKSİDATİF STRES  
VE APOPİTOZA ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. ŞENOL BAĞCI**

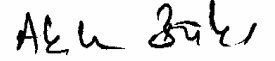
**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. AKİLE SARIOĞLU-BÜKE**

**DENİZLİ-2010**

Prof.Dr. Akile BÜKE'nin danışmanlığında Dr.Şenol BAĞCI tarafından yapılan “Desferoksamin ve N-Asetil Sisteinin Netrotizan Enterokolit Oluşturulmuş Ratlarda Histopatolojiye, Oksidatif stres ve Apoptoza Etkileri” başlıklı çalışma jürimiz tarafından Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Akile BÜKE



Üye : Prof. Dr. Uğur KOLTUKSUZ



Üye : Doç.Dr.Özkan HEREK



Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

30/06/2010



Prof. Dr. Zafer AYBEK  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda destek olan, tez çalışmasını birlikte yürüttüğüm, çalışmanın her aşamasında bilgi ve önerileri ile beni yönlendiren tez danışmanım hocam sayın Prof. Dr. Akile SARIOĞLU BÜKE'ye, eğitimim sırasında deneyimlerimden yararlandığım, her zaman saygıyla anacağım hocalarım sayın Prof. Dr. Uğur KOLTUKSUZ'a, Doç Dr.Özkan HEREK ve Yrd. Doç. Dr. Nergül ÇÖRDÜK'e, tezin biyokimyasal ve patolojik değerlendirilmelerinde yardımlarını esirgemeyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Muhan ERKUŞ'a, Pamukkale Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç Dr. Gülçin ABBAN'a, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarından Veteriner Hekim Barbaros ŞAHİN'e, çalışmalarım esnasında desteklerini gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve personeliimize, manevi desteklerini esirgemeyen eşim ve çocuklarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>NEKROTİZAN ENTEROKOLİT</b>	3
<b>İnsidans ve Tarihçe</b>	3
<b>Etyoloji ve Patogenez</b>	4
Yaş ve matürite	4
İntestinal iskemi / asfiksi	6
Enteral beslenme	9
Bakteriyel kolonizasyon ve sepsis	9
İnflamatuvar mediatörler	10
<b>Klinik Bulgular</b>	13
<b>Laboratuvar Bulguları</b>	14
<b>Radyolojik Bulgular</b>	14
<b>Patolojik Bulgular ve Apoptoz</b>	15
<b>Tedavi</b>	17
<b>DESFERROKSAMİN</b>	18
<b>N-ASETİL SİSTEİN</b>	19
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	21
<b>ÇALIŞMA GRUPLARI</b>	21
<b>H/R İLE NEK MODELİ OLUŞTURMA METODU</b>	22
<b>HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME</b>	23
Skorlama	23
<b>APOPTOZ DEĞERLENDİRİLMESİ</b>	23
<b>BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME</b>	24
Malondialdehit Ölçümü	24
Katalaz Ölçümü	24

	Sayfa No
Nitrik Oksit Ölçümü	24
Süperoksit Dismutaz Ölçümü	25
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	25
BULGULAR	26
Kilo Takip Bulguları	26
Histopatolojik Değerlendirme Bulguları	27
Apopitoz Değerlendirme Bulguları	19
Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları	31
MDA Ölçüm Bulguları	32
NO Ölçüm Bulguları	33
CAT Ölçüm Bulguları	33
SOD Ölçüm Bulguları	33
TARTIŞMA	34
SONUÇLAR	52
ÖZET	54
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	58

## TABLolar ÇİZELGESİ

		Sayfa No
Tablo-1	Serbest oksijen radikalleri kaynakları	7
Tablo-2	Serbest oksijen radikalleri	8
Tablo-3	Nekrotizan Enterekolitte modifiye Bell evrelemesi	14
Tablo-4	Gruplardaki ratların birinci, ikinci, üçüncü gün ortanca vücut ağırlıkları ve dağılımı (min-max)	26
Tablo-5	Gruplara göre rat barsaklarının histopatolojik değerlendirme (grade) skorları (median ve dağılımı)	29
Tablo-6	Gruplarda Apopitoz görülme yüzdeleri	30
Tablo-7	Grupların barsak doku (yaş doku başına) Malonildialdehit (MDA) Nitrik oksit (NO), Katalaz (CAT) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) düzeyleri (median ve dağılımı)	31

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

		Sayfa No
Şekil-1	NEK gelişimini etkileyen faktörler	16
Şekil-2	Hava geçirmez kapalı bir ortamda H/R yöntemi uygulaması	22
Şekil-3	H/R ile NEK oluşturulan ratın terminal ileumunun makroskopik görünümü	27
Şekil-4	Normal histoloji, grade 1. Kontrol grubu	28
Şekil-5	Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon grade 2.	28
Şekil-6	Vilus epitel hücre nekrozu grade 3, NEK grubu	28
Şekil-7	Kontrol grubu apopitoz	30
Şekil-8	NEK grubunda apopitoz	30
Şekil-9	NEK+NAC grubu apopitoz	30



## KISALTMALAR ÇİZELGESİ

ADKG	Ayakta direkt karın grafisi
AIO	Alüminyumoksamin
CAT	Katalaz
Cl	Klor
DFX	Desferoksamin
DIC	Dissemine intravasküler koagulasyon
DNA	Deoksiribo nükleik asit
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
FO	Ferrioksamin
GİS	Gastrointestinal sistem
GGK	Gaytada gizli kan
HE	Hemotoksilen Eozin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
H/R	Hipoksi/Reoksijenasyon
IL-6	İnterlökin 6
IL-10	İnterlökin 10
iNOS	<i>Inducible</i> nitrik oksit sentetaz
KBS	Kısa barsak sendromu
LTB <sub>4</sub>	Lökotrien B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Lökotrien C <sub>4</sub>
MDA	Malondialdehit
MPO	Myeloperoksidaz
NAC	N-asetil sistein
NEK	Nekrotizan enterokolit
N/G	Nazogastrik
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO	Nitrik oksit
O <sup>-</sup>	Süperoksit
OH <sup>-</sup>	Hidroksil anyonu
PAF	<i>Platelet Activating</i> Faktör

PPD	Primer peritoneal drenaj
sc	subkutan
SIgA	Sekretuar immüno globülin A
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen Radikalleri
SPSS	<i>Statistical packages for social sciences</i>
TLR	<i>Toll-like</i> reseptörleri
TNF - $\alpha$	Tümör nekroz faktör –alfa
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP-biotin nick end labeling</i>
XO	Ksantin Oksidaz
YYBU	Yenidoğan yoğun bakım ünitesi

## GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit, özellikle prematüre yenidoğanlarda görülen, en sık acil cerrahi müdahale gerektiren gastrointestinal sistem hastalığıdır (1-3). Bilimsel ve teknolojik gelişmeler nedeniyle prematüre bebek ölümleri azalmıştır. Güncel kanı, prematüre yenidoğanların ana ölüm nedeninin nekrotizan enterokolit olacağı yönündedir (4). Nekrotizan enterokolit patogenezi tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle, nekrotizan enterokolitin benimsenmiş etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Nekrotizan enterokolitte rol alan patofizyolojik olayların tam anlaşılması ve bu hastalığı tedavi edici stratejilerin geliştirilmesi, nekrotizan enterokolitli bebeklerin morbidite ve mortalitesinin azaltılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Yapılan deneysel çalışmalarda, hipoksi-reoksijenizasyon sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin intestinal doku hasarlanmasına yol açtığı gösterilmiştir (5-7). Hasarlanmış mukozaya mikroorganizmanın bağlanması sonucu tümör nekrozis faktör-alfa, *platelet activating* faktör, nitrik oksit, interlökin-6, malonildialdehit gibi birçok proinflamatuvar mediatörler açığa çıkmaktadır. Mediatörlerin etkisi ile mukozal hasarlanma daha da artarak nekroz oluşmaktadır. (8). Antioksidan sistemler, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarında serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak koruyucu etki göstermektedir. Glutatyon metabolizması antioksidatif defans sisteminin en önemlilerinden birisidir (9). Süperoksit dismutaz hücre mitokondrisinde bulunan bir enzimdir. Süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çevirir. Yine antioksidan bir enzim olan katalaz hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalayarak zararlı etkilerden korur. Prematüre yenidoğanların, antioksidan defans sistemleri yetersiz olup; oksidatif strese karşı oldukça hassastırlar

Deferoksamin serbest oksijen radikallerinin üretilmesinde rol alan demir, alüminyum, bakır gibi geçiş metalleri ile kompleksler oluşturarak güçlü antioksidan aktivite gösteren bir maddedir (10). Ayrıca iskemi/reoksijenasyon durumunda damarlarda dilatasyon yaparak hücreleri hipoksinin ilerlemesinden korur.

N-asetil sistein bir *thiol* moleköl ve mukolitik ajandır. L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun prekürsörüdür. Hidroksil gibi reaktif oksijen radikalleriyle etkileşerek serbest radikalleri temizler (11). Süperoksit dismutaz ve katalaz düzeylerini artırdığı, malonildialdehit ve nitrik oksit oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Apoptozu önlemektedir (12). Endotelyal disfonksiyonu artırır. Lipid peroksidasyonunu önler (13)

Bu çalışmada, hipoksi–reoksijenizasyon modeli ile intestinal hasar oluşturulan *Wistar* Albino cinsi preterm ratlarda, hipoksi/reoksijenizasyondan sonra uygulanan N-asetil sistein ve deferoksaminin intestinal hasar oluşumundaki veya önlenmesindeki histopatolojik etkileri, apoptoz üzerine olan etkileri ile proinflatuvar mediatörler ve antioksidatif sistemler üzerine biyokimyasal etkileri araştırıldı.

## GENEL BİLGİLER

### NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

#### İnsidans ve Tarihçe

Nekrotizan enterokolit (NEK), özellikle prematüre yenidoğanlarda görülen, inflamasyon ve nekroz ile karakterize, en sık acil cerrahi müdahale gerektiren bir gastrointestinal sistem (GİS) hastalığıdır (1-3). NEK olgularının %65-95'ini prematürler oluşturmaktadır. NEK ilk olarak 19. yüzyıl sonlarında tanımlanmaya başlanmıştır. 1960'lı yıllara kadar prematürleri etkileyen bir hastalık olduğu fark edilmemiştir (1,2,14).

Literatürde ilk gerçek NEK olgusunu 1888'de Paltauf tarafından bildirilmiştir. 1939'da Thelander, bir kısmı NEK sonucu olan büyük bir yenidoğan GİS perforasyon serisi yayınlamıştır. NEK perforasyonunda ilk başarılı tedavi 1943'de Agerty tarafından bildirilmiştir. Daha önceleri enfeksiyöz enterit olarak bilinen bu hastalık, 1953'de Schmid ve Quasier tarafından "nekrotizan enterokolit" olarak adlandırılmıştır. NEK gelişimi için gerekli olan üç ana öge olan barsak mukozasında yaralanma, bakteri ve metabolik substrat, 1975'de Santulli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (15). 1978'de Bell ve arkadaşlarının tanımladığı hastalığın ciddiyetine bağlı sınıflama günümüzde halen kullanılmaktadır (16,17)

Yenidoğan yoğun bakım ünitesi (YYBÜ) imkanlarının iyileştirilmesi, teknolojik gelişmeler kullanıma girmesiyle birlikte çok düşük doğum ağırlıklı ve prematüre doğan bebeklerin yaşam oranı artmakta, buna paralel olarak NEK insidansı da artış göstermektedir (1,2,18-20). NEK insidansı, merkezler arasında farklılık göstermekle birlikte %3-28 arasında değişmektedir (3). Gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı düştükçe insidanda artış görülmektedir. Term ve preterm yenidoğanlarda klinik ve patolojik bulgular benzer olsa da başlatıcı faktörler farklıdır. Term yenidoğanlarda görülen NEK, çoğu zaman perinatal asfiksi, polisitemi, konjenital kalp hastalıkları gibi zemin hazırlayıcı hastalıklarla birlikte ve daha erken dönemde ortaya çıkar.

Genel olarak hayatın üç ile onuncu günleri arasında başlamakla birlikte, ilk üç ay içinde de görülebilir (1,2,21). NEK'li hastaların %90'ından fazlası daha önce enteral beslenmiş bebeklerdir. Mama ile beslenmiş bebeklerde risk daha fazladır. NEK intrauterin dönemde bildirilmemiştir (21).

NEK ile cinsiyet ve ırk arasında ilişki saptanmamıştır. NEK olguları genellikle sporadik görülür ve mevsimsel dağılımı yoktur. Bazen salgınlar şeklinde gelişebilir. NEK epidemileri sırasında tek bir etken değil, birden çok enfeksiyöz etken izole edilmiştir (1,2,22).

### **Etyoloji ve Patogenez**

NEK etyolojisi ve patogenezi yapılan çok sayıda deneysel çalışmalar ve klinik araştırmalara rağmen, etyoloji ve patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak multifaktöriyel kompleks bir hastalık olduğu düşünülmektedir. NEK'li olguların %90'ı prematüre yenidoğanlar olduğundan, intestinal immatüritenin anahtar rol oynadığı, hipoksik-iskemik hasar, enteral beslenme, patolojik bakteriyel kolonizasyonun da buna katkıda bulunduğu belirtilmektedir (1-3,8,20,23). Oral vitamin E, indometazin, teofilin gibi metil ksantin türevi ilaçlarında NEK etyopatogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (1). Birçok durum temel risk faktörleri olarak kabul edilirken ortak son yol barsak nekrozudur (1-3).

### **Yaş ve matürite**

NEK'li olguların %65-95'i prematüredir (1-3,14). Gebelik yaşı ve doğum ağırlığı düştükçe NEK riskinde artış gözlenir (1-3). Doğum ağırlığı ile NEK arasında da ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Doğum ağırlığı 750 gr'ın altında olanlarda %14 iken, 1250 gr'ın üzerinde olanlarda %3 olarak bulunmuştur (24) Gebelik yaşı 37 hafta ve üzerindeki term bebeklerde ise %5-10 oranında NEK görülür. Bu term bebeklerin hemen hepsinde asfiksi, intrauterin büyüme geriliği, polisitemi/hiperviskosite, kan değişimi, göbek kateteri, gastroşizis, konjenital kalp hastalığı veya miyelomeningosel gibi risk faktörleri bulunur (1-3,25). Prematürelde, intestinal mukozanın, antioksidan sistemler ve bağışıklık sisteminin immatür özellikler taşıması ve yetersiz dolaşım dinamikleri nedeniyle, NEK gelişimi

daha kolaydır. Mide pH'sının yüksekliği, intestinal motilitenin azalması, absorpsiyon fonksiyonunun yetersizliği, immatür epitelyal yapının bakteriyel translokasyonu kolaylaştırması, immünglobulin A (IgA) sekresyonunun yetersizliği, koruyucu mukus düzeylerindeki düşüklük ve rejeneratif kapasitenin azalması gibi birçok faktör prematüreldeki barsak immatüritesinde rol oynar. Bu nedenlerle diğer predispozan ve tetikleyici faktörlerle birlikte prematürelde NEK gelişimi matür olgulara göre daha siktir (1-3,5,26,27,28).

GİS motilitesi ikinci trimestirde gelişmeye başlar ve üçüncü trimestire kadar olgunlaşmaz. İntestinal motilitede üçüncü trimestirden sonra hareketlilik başlar (29). Dış faktörler intestinal motiliteyi değiştirebilir. Enteral beslenme maturasyonu arttırırken (30), fetal hipoksi veya perinatal asfiksi motiliteyi azaltır (31). İntestinal motilitedeki azalma ile mikroorganizma ve toksik ürünlerin epitel ile temas olasılığı artarak intestinal hasar meydana gelir. Prematürelde besinlerin sindirim ve emilim yeteneği henüz gelişmediğinden sindirilmemiş moleküller de intestinal hasara katkıda bulunabilir (32). İntestinal bariyer fonksiyonu yapısal ve biyokimyasal bileşenlerden oluşmuştur. Eğer bu bileşenler tam olarak olgunlaşmamışsa mikroorganizmalar daha derin dokulara ilerleyebilir ve inflamasyona neden olabilir.

İntestinal yapısal bariyer *tight junction* komplekslerinden oluşmuştur. Bu kompleksler 10. gebelik haftasında belirginleşir. Sıvı sekresyonu ve besin absorpsiyonu için bariyer fonksiyonu 26. gebelik haftasından itibaren terme kadar amniotik sıvı etkisi ile gelişir (32). İntestinal lümeden istenmeyen patojenleri ve toksinleri uzaklaştırmada enterositler, Cl<sup>-</sup> iyonlarını ve suyu kullandığı için konak savunmasında sıvı sekresyonu yeteneği önemli bir yer tutmaktadır (33). Bu nedenle prematüre yenidoğanlar patojenleri ve toksinleri etkili bir şekilde uzaklaştıramazlar.

İntestinal biyokimyasal bariyeri oluşturanlar ise barsak kriptlerinde bulunan özelleşmiş enterosit olan *Paneth* hücrelerinden salınan lizozim, fosfolipaz A<sub>2</sub>, küçük antimikrobiyal peptidlerdir. Bu antimikrobiyal peptidler antiinflamatuvar sitokinlerin salınmasında, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda ve Cl<sup>-</sup> iyonlarının salınımında görev alırlar (34,35). *Paneth* hücre sayısı prematüre yenidoğanlarda erişkinlere göre daha düşük düzeyde saptanmıştır (20).

Prematürelde herhangi bir nedenle gelişebilecek olan intestinal mukoza hasarlanmasında koruyucu antioksidan sistemler yetersizdir. Hipoksi-reoksijenizasyon (H/R) sonrası yoğun olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri intestinal doku hasarından sorumlu temel faktörlerdir (1-3,17,26). Hücre içi en önemli antioksidan defans sistemlerinden birisi glutatyon metabolizmasıdır (9,22,36). Diğer bir antioksidan enzim olan CAT, yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüştürerek zararlı etkilerden korur. Hayvan çalışmalarında, prematürelde barsaklarda antioksidatif enzimlerden katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz aktivitesinin çok düşük olduğu saptanmıştır (37,38).

NEK, sıklıkla intestinal sistemin terminal ileum ve proksimal kolon bölgesinde gelişir. İntestinal immün direnci sağlayan lenf foliküllerinin çoğu (*Peyer* plakları) bu bölgelerde yer alır. Prematürelde intestinal sekretuar immunglobulin A (sIgA) düzeyleri, T ve B lenfosit sayı ve fonksiyonları, antikor yanıtları yetersizdir (1-3,5,28,39). Prematür yenidoğanlara oral olarak immunglobulin verilemesinin NEK şiddetini azalttığı gösterilmiştir (40).

### İntestinal İskemi / Asfiksi

NEK ve prematürite ile ilişkili iskeminin etyolojisini açıklamak için hiperaktif ekstrinsik vasküler regülasyon (dalğış veya *Herring- Breur refleksi*) yenidoğanlarda olan potansiyel ilintisinden dolayı öne çıkmıştır. Bu refleks ciddi hipoksi sürecinde kan akımının öncelikle kalp ve beyine yönelmesini gerektirir. Bu muhtemelen doğum sürecinde oluşur. Bu teori NEK'in hayatın ikinci haftasında oluştuğunu gösteren klinik izlemi açıklamakta yetersizdir (1).

NEK gelişiminde intestinal vasküler dolaşım ve hipoksiye vasküler cevap önemli bir faktördür (1-3). Hipoksik stres durumunda kan akımı splanknik yataktan beyin, kalp ve adrenal bezler gibi hayati organlara yönelir. Bunun sonucu çeşitli organlarda iskemik hasar gelişir (1-3,41). H/R sonrası intestinal zedelenme



ortamdaki serbest oksijen radikalleri aracılığıyla gelişir. Serbest radikallerin en önemlisi oksijenden türeyen serbest oksijen radikalidir (SOR).

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmiş elektrona sahip, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük olan kimyasal bileşiklerdir. Eşleşmemiş elektrona sahip moleküller kararsız bir haldedir. Başka bir moleküle etkileşime girerek elektron alır ve verirler (42,43) (Tablo-2). Serbest radikaller kararlı duruma geçme eğiliminde oldukları için tek elektronlarını çiftlemek üzere başka moleküllerle reaksiyona girdiklerinde, onların yapılarını değiştirebilirler (43) Serbest oksijen radikalleri endojen ve eksojen kaynaklıdır (Tablo-1)

**Tablo – 1:** Serbest oksijen radikalleri kaynakları

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

Serbest oksijen radikalleri yapısal özellikleri nedeniyle lipid, protein ve nükleik asit gibi hücre bileşenlerini okside etme kapasitesine sahiptir. Özellikle hücre membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri oksidasyona duyarlıdır. Bunların oksidasyonu lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir (MDA). Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA hücre membranlarından iyon alışverişini etkileyerek iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (43).

**Tablo – 2:** Serbest oksijen radikalleri

<b>Radikaller</b>	<b>Radikal olmayanlar</b>
Süperoksit radikali	Hidrojen peroksit
Hidroksil radikali	Hipokbromoöz asit
Alkoksil radikali	Hipoklorik asit
Peroksil radikali	Ozon
Hidroperoksil	Singlet oksijen

Ksantin oksidaz (XO) barsaktaki serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), süperoksit (O<sup>-</sup>) ve hidroksil anyonu (OH<sup>-</sup>) hasardan sorumlu en önemli serbest oksijen radikalleri olarak bilinirler. Bu serbest oksijen radikalleri lokal hasar gelişiminden ve sistemik bulgulardan sorumlu tutulmaktadır. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, nötrofil aktivasyonu ve deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı oluşturarak hücre ölümüne neden olurlar (1,2,5,14,28,38).

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar “antioksidanlar” olarak bilinirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler. Örnek antioksidanlar; mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, ferritin, transferindir.

Term bebeklerde konjenital kalp hastalığı, intrauterin büyüme geriliği, polistemi, annenin kokain kullanması gibi intestinal kan akımını azaltan durumlar NEK riskini arttırmaktadır. Bunun sonucu barsakların da içinde bulunduğu çeşitli organlarda iskemik hasar gelişmektedir. Hayvan modellerinde hipoksi ile ilişkili iskemik barsak nekrozunun geliştiği gösterilmiştir. NEK’te en sık (%90) görülen histopatolojik lezyon, iskemik olaylar sonucu meydana gelen koagülasyon nekrozudur (8). Bununla birlikte NEK’in sıklıkla damarlanmanın az olduğu ilioçekal alanda meydana gelmesi dikkat çekicidir. Bütün bu bulgular NEK patogenezinde hipoksik-iskemik olayların rol oynadığını düşündürmektedir.

## Enteral Beslenme

NEK'li olguların %90-95'i enteral olarak beslenen bebeklerdir. Hiperozmolar formula, yüksek volümlü ve hızlı beslemenin NEK riskini arttırdığı bildirilmektedir. Özellikle yüksek volümlü agresif beslemenin mide distansiyonu yaratarak splenik dolaşımı bozacağı ve intestinal iskemiye yol açabileceği belirtilmektedir (1-3). Bersth ve arkadaşlarının çalışmasında, enteral beslenme uygulanan miktar ve volüm artışı yavaş yapılan bebeklerde, hızlı volüm arttırılanlara göre NEK'in az geliştiği bildirilmiştir (44).

Yapılan çalışmalarda anne sütü ile beslemenin NEK insidansını azalttığı gösterilmiştir. Anne sütünde bulunan sIgA, lökosit, laktoferrin, lizozim, müsin, sitokin, epidermal *growth* faktör, enzimler, oligosakkarid, poliansatüre yağ asitleri gibi birçok madde ile antibakteriyel, antiinflamatuvar ve mukoza koruyucu etkilere sahiptir (1-3,21). Anne sütü ile beslenen yenidoğanlarda GİS florası probiyotik *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria*'dan oluşurken, mama ile beslenenlerde koliform bakteriler, entokoklar, bakteroides gibi patojenlerden oluşmaktadır (26).

Yeni doğanlarda sindirilmeyen karbonhidrat, bağırsaktaki bakteriler tarafından fermante edilerek yağ asidi ve laktik aside dönüştürülür, bu sırada karbondioksit ve hidrojen gazı üretilir. Patojen bakterilerin varlığında yağ asidi ve gaz üretimi artarak emilim kapasitesini aşar (3). Prematürelere tek başına enteral beslenme ile NEK patogenezinde önemli rol oynayan PAF'ın plazma düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (45). Amer ve arkadaşlarının çalışmasında prematüre ve term yenidoğanlarda enteral beslenmeden sonraki ilk mekonyum ile 14. gün dışkılarında PAF ve PAF-AH düzeyleri ve bunların NEK ile ilişkisi araştırılmış; sonuç olarak 14. gün dışkısında, mekonyuma göre PAF düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu ve enteral beslenmenin, intestinal dokuda lokal PAF üretimini artırarak NEK gelişiminde etkili olabileceği öne sürülmüştür (46).

## Bakteriyel Kolonizasyon ve Sepsis

Steril bir barsak ortamıyla doğan bebeklerde, intrauterin bir NEK olgusu şimdiye kadar tanımlanmamıştır (1-3). NEK, çoğunlukla yaşamın ikinci haftasında,

intestinal kolonizasyon tamamlandıktan sonra gelişmektedir (1-3). Patolojik örnekler intestinal nekroza neden olan diğer hastalıklar dikkate alınarak incelendiğinde, NEK'te bakteriyel çoğalmanın daha fazla olduğu bildirilmiştir. Yine bakteri hücre duvarı ürünü olan endotoksin verilmesinden sonra NEK benzeri lezyonların olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Bütün bu kanıtlar NEK patogenezinde bakterilerin rolü olduğunu düşündürmektedir (1-3,8).

Prematüre bebeklerin barsak florası maternal flora ile ilişkinin azlığına, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve nazokomiyal patojenlere bağlı olarak term bebeklere kıyasla belirgin farklılıklar göstermektedir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve enteral beslemenin geciktirilmesi anormal kolonizasyona neden olmaktadır (3,26). NEK'te en sık *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* gibi gram negatif bakteriler saptanır (1-3,26,47). NEK'li olguların sadece %20-30'nun kan kültüründe üreme saptanabilirken, bakteriyemi oranının daha sık olabileceği belirtilmektedir (3,19).

Lipopolisakkarit, lipoteikoik asit gibi bakteri hücre duvarı komponentlerinin barsak epitelinde bulunan *Toll-like* reseptörlerini (TLR) aktive ettiği ve bunun da inflamatuvar kaskadı uyararak intestinal hasarlanmada rol aldığı belirtilmektedir (3,26). Bakteriler ayrıca endotoksinleri yoluyla da NEK patogenezinde rol oynarlar. Çalışmalarda bakteriyel endotoksinlerin intestinal sistemdeki PAF, TNF ve IL-1 üretimini aktive ederek inflamatuvar kaskadı uyardıkları ve intestinal hasar gelişimini sağladıkları gösterilmiştir (48,49). Caplan ve arkadaşlarının çalışmasında enteropatojen kolonizasyonunu önleyen *Bifidobacterium infantis* verilen yenidoğan farelerde NEK insidansının azaldığı gösterilmiştir (50). Akısü ve arkadaşlarının 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 (51).

### İnflamatuvar Mediatörler

İntestinal hasarlanmış mukozaya mikroorganizmanın bağlanması sonucu birçok proinflamatuvar mediatörler açığa çıkmaktadır. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ),

*platelet activating* faktör (PAF), NO, interlökin-6 (IL-6) bu mediatörlerin en önemlileridir. NEK’de bu sitokinlerin lokal ve sistemik olarak arttığı ve doku hasarında önemli rol oynadığı saptanmıştır (1-3,5,26,28,53,54).

PAF, fosfolipaz A<sub>2</sub> aracılığı ile kapiller endotel, makrofaj, nötrofil, hepatosit, ve intestinal epitelyal hücreler gibi birçok hücreden salınan endojen bir fosfolipiddir. PAF, bilinen en güçlü mezenterik vazokonstrüktör maddedir. PAF, bu güçlü vazokonstrüktör etkisi ile intestinal iskemi sonucu mukoza hasarına ve NEK’e neden olabilirken; sekonder olarak serbest oksijen radikalleri, TNF- $\alpha$ , lökotrien B4 (LTB4), lökotrien C4 (LTC4) gibi inflamatuvar mediatörlerin üretim ve salınımını artırarak da NEK’e neden olabilmektedir (26,53,54). PAF intestinal epitel hücrelerinin apoptozisini tetiklemekte, mukozal permeabiliteyi artırarak bakterilerin girişini kolaylaştırmaktadır (26). PAF’ın, NEK patogenezinde temel inflamatuvar mediatör olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (1-3,55-60). PAF antagonisti verilen farelerde ve domuzlarda intestinal nekrozun azaldığı gösterilmiştir. (61). Wang ve arkadaşları PAF reseptör ekspresyonunun en çok ileumda olduğunu ve bu durumun intestinal inflamasyon gelişiminde önemli olduğunu vurgulamışlardır (62). Prematürelde PAF yıkımından sorumlu enzim PAF-AH verildiğinde intestinal hasarın azaldığı saptanmıştır (63-64). Amer ve arkadaşlarının çalışmasında, prematürelde enteral beslenme ile birlikte gaytada PAF konsantrasyonunun arttığı ve yüksek PAF konsantrasyonuna sahip bebeklerde NEK geliştiği gösterilmiştir (46).

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) yardımıyla L-arginin ve oksijenden sentezlenir. NOS’un üç izoenzimi vardır; eNOS ve nNOS tarafından sentezlenen NO doku perfüzyonunu sağlar. iNOS tarafından sentezlenen NO hücre hasarına ve intestinal bariyer bozukluğuna yol açmaktadır (65). İskemiye izleyen reperfüzyon sonrası intestinal vasküler rezistans artmaktadır. Bu artış endotelde sentezlenen NO üretiminin azalmasından kaynaklanmaktadır. Mikrosirkülasyondaki bozulmanın NEK gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (66). NO, kısa ömürlü reaktif bir moleküldür. Doku hemostazının sağlanması, nörotransmisyon ve inflamasyon gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda görev almaktadır. Hücre membranlarından kolayca geçebilir. Yağda ve suda kolay eriyebildiğinden kanala ve reseptöre ihtiyaç duymazlar. Eşsiz, bir elektronu olduğu için serbest radikal gibi değerlendirilir. Diğer

serbest radikallerin varlığında doku hasarını arttırmaktadır (4). NO süperoksit radikali ile reaksiyona girerek son derece toksik olan peroksinitrite dönüşmektedir. Peroksinitrit, enterosit apoptozisini indüklemekte ve proliferasyonunu inhibe etmektedir. Peroksinitrit elektron transport zincirinde sistein rezidülerini oksitleyerek geri dönüşümsüz olarak inaktive etmekte ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Peroksinitrit tirozin rezidülerini nitratlayarak nitrotirozin oluşturur. Böylece enzim aktivitesini değiştirerek enterosit proliferasyonunu önlerler (4,65,67).

OH<sup>-</sup> anyonu reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Demir ve bakır gibi geçiş metallere varlığında hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, proteinlerin disülfid bağlarında bozulma, DNA hasarı oluşturarak ve inflamatuvar hücrelerde aktivasyona neden olarak hücre hasarına yol açmaktadır (21,26,68). Antioksidan bir enzim olan CAT, hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalayarak zararlı etkilerden korumaktadır. Hayvan modellerinde H/R sonrası, oksidatif strese bağlı barsak doku hasarlanmasında lipid peroksidasyonunun önemli olduğu ve bu durumun da lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ölçümü ile saptanabildiği gösterilmiştir (5-7,69-73).

LTB<sub>4</sub>, nötrofil kemotaksisi ve agregasyonunu sağlayarak, LTC<sub>4</sub> ise intestinal iskemi ve sonuçta intestinal inflamasyona yol açarak NEK patogenezinde etkili olmaktadır (48). Nötrofillerin aktivasyonu sonucu *myeloperoxidase* (MPO) gibi enzimlerin üretimi ve salınımı gerçekleşir. Dokuda MPO aktivitesinin ölçümü ile nötrofil aktivasyonu indirekt olarak saptanabilir (74,75).

TNF- $\alpha$ , NEK patogenezinde başlangıç anahtar mediatör olarak bilinmektedir (1,2,21,76,77). Çeşitli hücreler ve intestinal epitel hücreleri tarafından salınmaktadır (77,78). Caplan ve arkadaşları, NEK geçirmiş yenidoğan bebeklerde TNF- $\alpha$ 'yı anlamlı yüksek saptamışlardır (79). TNF- $\alpha$  üretimini azaltan pentoksifilin uygulanması ile NEK insidansının ve şiddetinin azaldığı gösterilmiştir (76).

İntestinal makrofajlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri tarafından salınan IL-6 ve IL-10 NEK patogenezinde önemlidir. Goepfert ve arkadaşlarının çalışmasında, umbilikal korddaki yüksek IL-6 konsantrasyonu ile NEK arasındaki anlamlı ilişki

gösterilmiştir (80). Öztürk ve arkadaşları tarafından NEK oluşturulmuş ratlara verilen rekombinant IL-10 ile mukozal hasarın azaldığı gösterilmiştir (6).

### **Klinik Bulgular**

NEK, GİS semptom ve bulguları yanında, sistemik semptom ve bulgularla karşımıza çıkabilir. Klinik bulguları özgün değildir. Hafif karın şişliğinden, perforasyona kadar değişen çeşitli klinik tablolara neden olabilir. Hastalığın ortaya çıkış zamanı gestayonel yaş ile ters orantılıdır. Term bebeklerde semptom ve bulgular yaşamın ilk birkaç gününde ortaya çıkarken, prematüre bebeklerde genellikle ikinci haftada ortaya çıkmaktadır. Gastrik rezidü, N/G den safralı geleni olması, abdominal distansiyon, abdominal hassasiyet, kusma, karında renk değişikliği, gaitada gross kan saptanması, ısı düzensizliği, hipoglisemi, laterji, apne, bradikardi, taşikardi, anemi, nötropeni, trombositopeni, metabolik asidoz, dolaşım bozukluğu, solunum sıkıntısı gibi bir çok bulgu ile kliniğe yansıyabilir (1-3,21). Sıklıkla en erken bulgu beslenme intoleransı ve gastrik boşalmada gecikmedir (1,2,26). İlerlemiş olgularda ise barsak halkalarının muayenede ele gelmesi, karın duvarında ödem, intestinal perforasyon, bakteriyemi, sepsis, asidoz, şok ve dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) gelişebilir.

1978 yılında Bell ve arkadaşları NEK'li hastaları klinik ve radyolojik olarak sınıflandıran kriterler yayımlanmış, bu kriterler Walsh ve Kleigman tarafından 1986 yılında modifiye edilmiştir (16,17). Bu sınıflandırma tedavi şeklinin planlanması ve takip açısından önemlidir. Bu sınıflandırmaya göre birinci evre şüpheli olguları, ikinci evre kesin NEK tanısı alan olguları, üçüncü evre ilerlemiş olguları tanımlamaktadır (Tablo 3).

**Tablo-3:** Nekrotizan enterokolitte Modifiye Bell evrelemesi (16)

<b>Sınıflama</b>	<b>Klinik Bulgular</b>	<b>Radyolojik Bulgular</b>
I (Şüpheli NEK)	Abdominal distansiyon GGK pozitifliği Kusma/gastrik rezidü Apne/letarji	İleus/dilatasyon
II (Kesin NEK)	Evre I'e ek olarak Abdominal hassasiyet ± Metabolik asidoz Trombositopeni	Evre I'e ek olarak Pnömotosis intestinalis ve/veya Portal vende gaz Sebat eden barsak loopu
III (Ağır NEK)	Evre II'ye ek olarak Hipotansiyon Belirgin asidoz DIC Nötropeni	Evre II'ye ek olarak Pnömoperitoneum

### **Laboratuvar Bulguları**

NEK'li hastalarda laboratuvar bulguları sepsisi destekler niteliktedir. Lökosit sayısında artma ve daha sıklıkla da lökopeni olabilir. Vakaların yaklaşık %37'sinde beyaz küre sayısı 1500'ün altındadır. Nötropeni ve trombositopeni gram (-) septisemi ve şiddetli NEK'in habercisidir. Koagülasyon bozuklukları, hipoglisemi, hiperglisemi, metabolik asidoz, elektrolit bozuklukları olabilir. Gaitada gizli kan (GGK) pozitiftir. Metabolik asidoz sıklıkla şokun bir bulgusudur. C-reaktif protein düzeyinde artma görülür ve bu NEK'in erken bir göstergesidir (27,81) Gaitada gizli kan (GGK) pozitiftir.

### **Radyolojik Bulgular**

Klinik olarak NEK'ten şüphelenildiğinde tanıyı kesinleştirmek ve tedaviye yol göstermek amacıyla radyolojik inceleme yapılmalıdır. Ayakta direkt karın grafisi



(ADKG ) ve yatarak karın grafisi incelemelerinde başlangıçta barsak dilatasyonu, ileus, pnömotosis intestinalis gibi bulgular saptanırken, ileri dönemde barsak perforasyonu sonucu pnömoperitoneum ve portal vende gaz gözlenebilir (4,82). En sık erken bulgu intestinal ileustur. Diğer erken bulgular barsak anslarında dilatasyon, incelme ve hava-sıvı seviyesidir. Barsak duvarı içinde gaz görünümü (pnömatosis intestinalis) NEK'in patognomik radyolojik bulgusudur. Gaz subseroza ile muskularis tabakası arasındadır. Bu gaz patojen bakteriler tarafından üretilen hidrojene bağlı olarak oluşur (83). Standart 6-12 saatte çekilen ADKG klinik izlemde önerilmekle birlikte ADKG sıklığı hastanın genel durumuna göre belirlenebilir.

Ultrasonografi, kontrastlı grafi ve manyetik rezonans görüntüleme kullanılabilen diğer tanı yöntemleridir. Ultrasonografide anormal barsak ekojenitesi, barsak duvar kalınlığında artma ve ya azalma, intramural gaz, portal vende gaz, periton içinde serbest gaz ve sıvı görülebilir. Kapalı perforasyonda kitle saptanabilir. Kontrastlı grafi NEK sonrası darlık araştırılmasında kullanılır (83).

Modifiye Bell sınıflamasına göre (Tablo 3) Evre I, şüpheli NEK'de bulgular nonspesifiktir ve klinik olarak abdominal distansiyon, kusma, gastrik rezidü, apne, letarji ve GGK varlığı; radyolojik olarak ise normal grafi bulguları yanında barsak dilatasyonu ve hafif ileus saptanır. Evre II, kesin NEK'dir. Evre I'e ek olarak abdominal hassasiyet, metabolik asidoz, trombositopeni saptanırken, radyolojik olarak pnömotosis intestinalis ve portal vende gaz gözlenir. Evre III, ağır NEK'dir; II. evreye ek olarak hipotansiyon, belirgin asidoz, nötropeni ve dissemine intravasküler koagülasyon görülür. Radyolojik olarak ise evre II'ye ek olarak barsak perforasyonu gelişirse pnömoperitoneum saptanır (1-3,16,17).

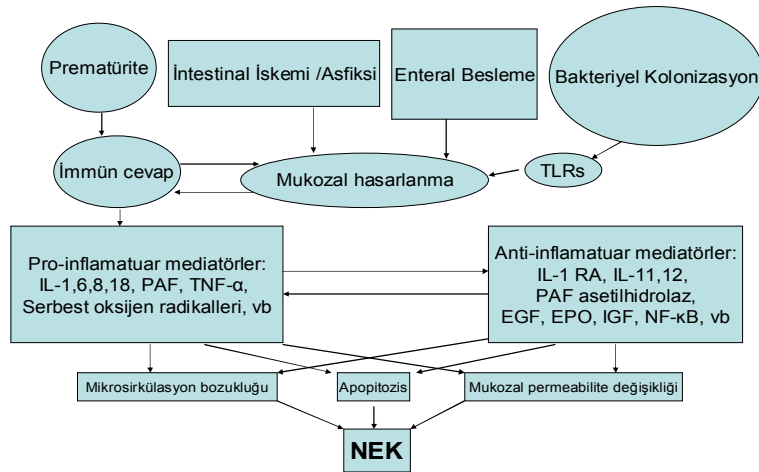
### **Patolojik Bulgular ve Apoptoz**

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozdur. Nekroz, travma, toksinler gibi hücre dışından gelen fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz organizmanın ihtiyaç duymadığı, görevini tamamlamış ya da hasarlanmış hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (39).

Apoptotik hücre ölümünün aşamaları hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak devam ederek fagositoz ile sonuçlanır. Apoptoza uğrayan hücreler yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler ve büzülürler. Çekirdekte kromatin, çekirdek membranına yakın kısımlardan yoğunlaşarak çöker (39).

İntestinal iskemi-reperfüzyonu akut akciğer hasarının sık nedenlerinden biridir. İskemi sonucunda oksidatif stres tarafından ferritin ve hemoksijenaz-1 artar ve akciğer hasarının göstergesi olarak kullanılmaktadır (84). Yine başka bir çalışmada jejunumun iskemik-reperfüzyon hasarı multipl organ yetmezliği gelişimine neden olduğu ve intestinal mukoza ve akciğer parankiminde morfolojik ve apoptotik değişmelere neden olduğu gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısı 10 kat artmış olarak bulunmuştur (85).

NEK halen patogenezi tam olarak anlayamamış kompleks bir sendromdur. Genel görüş, prematürite ile birlikte hipoksik-iskemik hasar, formula ile beslenme, beslenme volümünün hızlı artırılması, bakteriyel kolonizasyon ve sepsis, serbest oksijen radikalleri, aktive lökositler, lökotrienler, PAF, TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar mediatörler aracılığı ile ortak son yol hastalığı olan NEK'in geliştiği yönündedir (8,69) (Şekil 1)



Şekil-1: NEK gelişimini etkileyen faktörler. (8)

## Tedavi

NEK'te enteral beslemenin kesilmesi, N/G ile mide dekompresyonu, sıvı-elektrolit desteği, kan basıncının düzeltilmesi, asidoz, anemi ve trombositopeninin düzeltilmesi gibi destek tedavileri uygulanır. Umbilikal kateter varsa çekilir. Vücut ısısı, solunum ve kalp atım sayısı, oksijen saturasyonu takibi, aldığı-çıkarıldığı ve karın çevresi yakından izlenir. Sıvı elektrolit dengesi ve metabolik asidoz düzeltilmesi önemlidir. Gerekirse eritrosit, trombosit, plazma desteği uygulanır. NEK'li olguların ancak %30'unda kan kültürü pozitifliği saptanırken, intestinal mukoza bariyer bozukluğu sonucu enterik kökenli bakteriyel translokasyon gelişebileceği için, bu hastalara antibiyotik tedavisi önerilmektedir. Antibiyotik olarak genellikle ampisilin, aminoglikozit ve anaeroblara etkili metranidazol tedaviye eklenir (1-3,14). Klinik, fizik muayene ve radyolojik açıdan NEK bulguları kaybolduktan sonra genellikle 10-14. gün oral beslenmeye başlanır (15).

NEK'li hastalara medikal tedavi uygulanmasına rağmen hastaların %20-60'ında cerrahi tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır (85). Cerrahi tedavinin pek çok yazar tarafından kabul edilmiş tek endikasyonu intestinal perforasyondur (20,86). Diğer göreceli operasyon endikasyonları medikal tedaviye rağmen klinik bozulma olması, portal vende gaz, barsak nekrozu olduğunu düşündüren karında kitle ve eritem gibi klinik bulgular, ADKG'de aynı bölgede 24 saatten uzun süre sebat eden genişlemiş barsak halkaları, karında asit ve pozitif parasentez bulgularıdır (1,2,87).

Cerrahi tedavide NEK olgularında laparotomi, laparoskopisi veya primer peritoneal drenaj (PPD) olmak üzere üç cerrahi yöntem uygulanmaktadır. Laparotomi ve PPD'nin hangisinin tercih edileceği tartışmalı olmakla birlikte, çok merkezli, randomize, kontrollü, güncel bir çalışmaya göre bu cerrahi yöntemler arasında mortalite, hastanede kalış süresi ve total parenteral beslenme süresi bakımından anlamlı fark bulunmamaktadır (88,89). Bazı çalışmalarda açık cerrahi sonrası mortalitenin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (90). Laparotomi yapılan hastalarda yara enfeksiyonu, karın içi apse, anastomoz ayrılması, enterik fistüller, evantrasyon, intestinal yapışıklıklar, yara yerinin geç iyileşmesi gibi komplikasyonlar görülebilmekle birlikte, en ciddi komplikasyon kısa barsak sendromudur. İyileşen NEK'lerde geç dönemde iskemik nekroz bölgelerinin

fibrozisle iyileşmesi sonucunda %9-36 oranında darlıklar gelişir. Darlık genellikle kolonda ve terminal ileumdadır (15,86,90)

İyileşen NEK'li bebeklerde %4-6 oranında tekrar NEK gelişebilir (16). İyileşen hastaların %9 'unda kısa barsak sendromu (KBS) gelişebilmektedir. Bunun nedeni hem iskemi ve nekroz hem de cerrahi rezeksiyonla oluşan barsak kaybıdır.

NEK olup iyileşen olgularda nörolojik ve işlevsel komplikasyonlar gelişebilir. Güncel bir çalışmada NEK geçiren olgular 18 - 22 ay (düzeltilmiş yaş) arasında değerlendirildiğinde; büyüme-gelişme geriliği, serebral palsy, işitme ve görme yetersizliği, Bayley skoru düşüklüğü açısından büyük risk altında oldukları gösterilmiştir (91). Hem erken hem de geç dönemde gelişen komplikasyonlar hastanın hayatını ciddi şekilde tehdit ederken, yüksek maddi kayıplara da neden olmaktadır.

### **DESFEROKSAMİN (DFX)**

Desferoksamin (DFX) kimyasal yapısı *Streptomyces pylosus*'tan üretilen *trihydroxamic asit*'tir. DFX daha çok demir ve 3-değerlikli alüminyum iyonlarıyla kompleksler oluşturan bir maddedir. DFX'in 2- değerlikli Fe, Cu, Zn, Ca gibi iyonlara ilgisi daha azdır. Şelat oluşturma özelliği nedeniyle DFX plazma ya da hücrelerde bulunan serbest demiri alarak ferrioksamin (FO) kompleksi oluşturabilir. İdrarda FO demir atımı plazmadaki demiri yansıtır. DFX; transferindeki, hemoglobindeki veya hem içeren diğer maddelerdeki demiri uzaklaştırılmaz. DFX dokuya bağlı alüminyum, alüminoksamin (AIO) kompleksi meydana getirerek bağlayabilir ve mobilize edebilir. FO ve AIO, tamamen atıldıkları için DFX demir ve alüminyumun idrar ve gayta ile atılmasını artırır. Böylece organlardaki patolojik demir ve alüminyum birikintilerini azaltır. DFX, 1960 yılından beri transfüzyonel demir aşırı yüklenmesi tedavisinde kullanılmaktadır. Modern efektif demir bağlama tedavisi son 20 yıldır kullanılmaktadır. Günümüzde uzun dönem DFX tedavisi talasemi ve diğer transfüzyon gerektiren anemiye yaklaşımın önemli bir parçasıdır (10). DFX'in toksik radikalleri ve demiri bağlama özelliği nedeni ile klinikte kullanılmaktadır

DFX intramuskuler ve subkutan infüzyondan sonra hızla emilir. Buna karşılık mukoza sağlam olduğu takdirde gastrointestinal kanaldan emilim pek azdır. Oral uygulanan DFX'inin mutlak biyoyararlanımı % 2'den azdır (10).

DFX ile biyotransformasyon reaksiyonları: asit bir metabolit oluşturan transaminasyon, oksidasyon, beta-oksidasyon ve nötr metabolitlerin oluşumuyla sonuçlanan dekarboksilasyon ve N-hidroksilasyondur (10)

İntrauterin intravasküler transfüzyonu takiben neonatal demir yüklenmesine sekonder gelişen ciddi karaciğer hastalığı geliştiği ve hastada serum ferritini 4000 mikrogram/L üzerinde tesbit edildiği, DFX tedavisi ile KC fonksiyonlarında düzelmenin olduğu bildirilmiştir (92). DFX yenidoğanlarda şelasyon tedavisinde kullanılmaktadır.

DFX ile yapılan deneylerde renal iskemi sonucunda beyin için gerekli kreatin kinaz aktivitesinin inhibisyonunu engellediği tesbit edilmiştir (93). Serebral damarlarda vazodilatasyon yaptığı ve hücreleri hipoksiden koruduğu görülmüştür. Toksik radikalleri bağlaması ve demir bağlama özelliğinin olması DFX'i daha etkili hale getirmiştir. Vazospazmı engellemektedir (94).

Yüksek dozlarda DFX görme ve işitme bozukluğu yapabilir. Böbrekler yolu ile atıldığı için böbrek yetmezliklerinde dikkatli kullanılmalıdır. Yüksek dozlarda C vit ile birlikte kullanılması kalp fonksiyon bozukluğu oluşturabilir. Alerjik reaksiyonlar, enfeksiyon riskinde artış, büyüme geriliği gibi yan etkileri vardır (10)

### **N-ASETİL SİSTEİN (NAC)**

NAC, bir thiol molekül mukolitik ajan olup L-sistein ve indirgenmiş glutasyonun prekürsörüdür. NAC hücrelerde sülfidril gruplarının kaynağı olan OH gibi reaktif oksijen radikalleriyle etkileşerek serbest radikalleri temizler. NAC'ın kullanıldığı değişik hastalıklar arasında kanser, kardiyovasküler hastalıklar, metal toksisitesi ve karaciğerin parasetamol toksisitesi sayılabilir (11).

NAC apoptozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücre surviyini uzatmaktadır. NAC endotelial disfonksiyonu azaltmakta, inflamasyon, fibrosis, invazyon, kartilaj erozyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon ihtiyacının geciktirilmesini sağlamaktadır (12). Mekonyum ileusunda NAC tedavi edici özelliği ile kullanılmaktadır (3)

NAC asetaminofen toksisitesinde ve alkol toksisitesinde 18 saat içinde verildiği takdirde karaciğer hasarından korumakta ve mortaliteyi azaltmaktadır. Antitoksik etkisindeki muhtemel mekanizmalar arasında karaciğer kan akımını artırması, glutatyon artışı ve serbest radikalleri temizlemesi sayılabilir (95).

NAC güçlü mukolitik etkisi ile de klinikte kronik obstrüktif akciğer hastalığında kullanılmaktadır. NAC sıçanlarda toksik katmiyum ile birlikte verildiğinde lipid peroksidasyonunu önleyerek karaciğer toksisitesini azaltmaktadır. (13)

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma için Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'na başvurularak 05.07.2006 tarih ve 08 sayılı toplantı sonucunda onayı alındı. Bu deneysel çalışmada bir günlük ratlar kullanıldı. Ağırlıkları 5-8 gr olan yavru *Wistar*-albino ratlarda Şubat-Ağustos 2008 tarihinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nde yapıldı. Toplam 50 adet bir günlük rat yavruları randomize olarak her bir grupta 10 rat olacak şekilde toplam beş 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 NEK modeli oluşturulduktan sonra annelerini emerek beslenirken, anne ratlar standart fare yemi olan %21 protein içeren Pellet yem ile beslendi.

### Çalışma grupları:

Kontrol grubu (Grup I, n:10): Herhangi bir girişim veya ilaç uygulanmadı.

NEK grubu (Grup II, n:10): Herhangi bir ilaç uygulanmadı, doğumdan sonra birinci günde hipoksi/reoksijenizasyon (H/R) yöntemi ile NEK modeli oluşturuldu (70).

N-asetil sistein + NEK grubu (Grup III, n:10): Birinci günde NEK modeli oluşturuldu ve birinci günden itibaren üç gün süreyle 20 mg/kg/gün 2 dozda subkutan (sc) N-asetil sistein (Asist ampul, 300 mg/ 3 ml, Hüsnü Arsan İlaçları A.Ş. Maslak-İstanbul - Türkiye) uygulandı.

Desferoksamin + NEK grubu (Grup IV, n:10): Birinci günde NEK modeli oluşturuldu ve birinci günden itibaren üç gün süreyle 20 mg/kg/gün ve tek dozda sc (Desferal flakon, 0,5 gr flakon, Novartis Sağlık, Gıda ve Tarım Ürünleri sanayi ve Ticaret A.Ş. Bakırköy-İstanbul, *Novartis Pharma AG-Basel- Swetzerland*) uygulandı.

N-asetil sistein + Desferoksamin + NEK grubu (Grup V, n:10): Birinci günde NEK modeli oluşturuldu ve birinci günden itibaren üç gün süreyle 20 mg/kg/gün 2 dozda sc N-asetil sistein ve 20 mg/kg/gün ve tek dozda sc desferoksamin uygulandı.

### **H/R Yöntemi ile NEK Modeli Oluşturma Metodu**

Doğum sonrası ilk 12-24 saat annelerinin yanından ayrılan ratlar aç bırakıldı. Rat yavruları birinci günde hava geçirmez kapalı bir ortamda 10 dakika süreyle %100 CO<sub>2</sub> solutularak hipoksiye sokuldu; hemen ardından 10 dakika süreyle %100 O<sub>2</sub> solutularak reoksijenizasyon uygulandı (Modifiye Okur NEK modeli) (70) (Şekil-2). Hipoksi periyodu sonrası tüm hayvanların siyanotik oldukları, hareketsizleştikleri, gasping yaptıkları ve dışkılamalarının olduğu gözlemlendi.



**Şekil 2:** Hava geçirmez kapalı bir ortamda H/R yöntemi uygulanışı.

Günlük vücut ağırlığı takibi yapılan çalışma gruplarındaki tüm hayvanlar doğum sonrası 4. günde (96. saat), 90 mg/kg dozunda intramusküler Ketamin verilerek servikal dislokasyon ile dekapite edildi. Dekapitasyon sonrasında birkaç dakika içinde rat yavrularının terminal ileumundan en az iki cm olacak şekilde rezeksiyon yapıldı. Alınan barsak doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik ve



apoptoz inceleme için, bir kısmı ise biyokimyasal tetkikler için ayrıldı. Değerlendime kör yapıldı.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Alınan barsak örnekleri %10 formalin ile fiske edilerek Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5 mikrometrelik kesitler alınarak oluşturulan preparatlar hemotoksilen-eosin (H&E) boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda uzman bir patolog tarafından 1'den 5'e kadar değişen mikroskopik hasar skorlamasına göre değerlendirildi (5).

#### **Skorlama:**

*Grade 1:* Normal histoloji

*Grade 2:* (Minimal) Hidropik dejenerasyon ve/veya yüzeysel epitel hücrelerinin seperasyonu

*Grade 3:* (Hafif) Villus epitel hücre nekrozu

*Grade 4:* (Orta) Tam villus nekrozu

*Grade 5:* (Şiddetli) Transmural nekroz.

#### **Apoptoz Değerlendirilmesi**

Apoptotik hücreleri tesbit etmekte kullanılan histolojik yöntemlerin çoğu hücre çekirdeği düzeyinde oluşan morfolojik değişiklikleri esas alır. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) ise morfolojik değişiklikler görünür hale gelmeden önce oluşan DNA kırıklarını gösterir. TUNEL, çekirdekteki DNA kırıklarını direkt ya da spesifik işaretleyen bir yöntemdir. İn-situ hücre ölüm saptanması kiti AP (Roche, Penzberg, Germany) tarafından parafine gömülmüş doku protokolüne göre yapıldı. BM purple AP substratı çöktürücü kromojenik substrat (Roche, Penzberg, Germany) son basamakta alkalen fosfat enzimi immünoassay için kullanıldı. Her grup için apoptotik indeks her 10 villi başına apoptotik hücre sayısı belirlenmesiyle tanımlandı ve sayım yüksek güçlü büyütmede (400X) yapıldı (72).

## Biyokimyasal Değerlendirme

Terminal ileumdan alınan barsak doku örnekleri sıvı nitrojen ile dondurularak saklama kabında MDA, CAT, SOD ve NO analizi için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında bir biyokimya uzmanı tarafından değerlendirilinceye kadar -85 °C’de saklandı.

### Malondialdehit Ölçümü

Barsak doku hasarlanması lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA’nın doku düzeyi ölçümüyle gösterilmektedir (70,81,71,73). Çalışmamızda MDA ölçümü Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (96). MDA, *thiobarbituric acid* varlığında 532 nm’de ölçülebilen renkli bir kompleks yapmaktadır. Bu absorbans Shimadzu UV-160 spektrofotometresi ile ölçüldü. Standart olarak 1,1', 3,3' – *Tetraetoksipropen* kullanıldı ve sonuçlar barsak dokusunun gramı başına µmol/g olarak verildi.

### Katalaz Ölçümü

Katalaz aktivitesi ölçümü Aebi yöntemi ile yapıldı (97). Doku örneği 50 nM fosfat tamponu (pH 7.0), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve eritrosit lizat ile bir karışım hazırlandı. Oda ısısında 30 sn’de 240 nm’de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu değerlendirildi ve katalaz aktivitesi U/g yaş doku olarak verildi.

### Nitrik Oksit Ölçümü

NO, nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla argininin sitriline dönüşüm ürünüdür. NO süperoksit ile reaksiyona girerek potent bir oksidan olan peroksinitrite dönüşür (ONOO<sup>-</sup>). Oluşan peroksinitrit inflamatuvar yanıtta NO’in sitotoksik ve patolojik etkisinden sorumludur (67). Çalışmamızda NO (nitrit + nitrat) ölçümü kadmiyum redüksiyon metodunun bir modifikasyonu olan Navarro-Gonzalves yöntemi ile değerlendirildi (98). Nitrit varlığı sülfaniamidin diazotizasyonu ve naftiletillen daimine bağlanması ile tespit edildi. 400 mikrolitre örnek, 80 µl %30 ZnSO<sub>4</sub> ile denatüre edildi ve 10000 devirde 4 °C’de 20 dakikada santrifüj edildi. Daha sonra glisin-NaOH tamponu içinde CuSO<sub>4</sub> solüsyonu kullanılarak kadmiyum granülleri aktive edildi ve ardından deproteinize 100 µl örnek ile standart solüsyon

eklendi. Böylece kadmiyum kullanılarak nitratın nitrite indirgenmesi sağlandı ve örnekler spektrofotometrik olarak değerlendirilip, KNO<sub>3</sub> standartına karşı otomatik olarak ölçüldü ve sonuçlar µM/g yaş doku olarak verildi.

### Süperoksit Dismutaz Ölçümü

SOD hücre içinde mitokondride doğal olarak bulunan bir enzimdir. Süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çevirirler. Doku örnekleri potasyum fosfatla pH 7,4'te hemojenize edilerek santrifüj sonrasında SOD aktivitesi, ksantin / ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit radikallerinin Nitroblue tetrazolium'u indirgemesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibi ile ölçüldü. Nitroblue tetrazolium'un indirgenmesi ile 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren mor renkli formazan oluşur ve SOD aktivitesinin büyüklüğü oluşan formazanın absorbansı ile ters orantılıdır (99).

### İstatistiksel Analizler

Vücut ağırlıkları, histopatolojik ve biyokimyasal bulgular ortanca ve minimum-maksimum aralıklara göre verilirken, apoptozis ile ilgili sonuçlar yüzde olarak 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.

Anlamlı bulunan sonuçlar arasındaki farkı yaratan hangi bulgu olduğunu belirlemek için düzeltilmeli *Mann-Whitney U* testi kullanılarak  $p < 0.01$  olduğu durumlar anlamlı olarak değerlendirildi. İstatistiksel verilerin bilgisayarda hesaplanmasında *statistical packages for social sciences* (SPSS) (SPSS for Windows 10.0; SPSS, Chicago, Illinois, A.B.D) yazılım programı kullanıldı.

## BULGULAR

### Kilo Takip Bulguları:

Çalışma süresince annelerinin yanında kalan ve anne sütü ile beslenen yavru ratların izleminde, her bir grubun günlük vücut ağırlığı artışının olduğu ve gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı saptandı ( $p > 0.05$ ) (Tablo-4)

**Tablo-4:** Gruptaki ratların birinci, ikinci ve üçüncü gün ortanca vücut ağırlıkları ve dağılımı (min-max)

<b>Gruplar* (Sayı)</b>	<b>1. gün (gr)</b>	<b>2. gün (gr)</b>	<b>3. gün (gr)</b>
<b>Grup I (Kontrol, n:10)</b>	6,1 (5,6-6,5)	6,3 (5,5-6,9)	6,9 (6,0-7,5)
<b>Grup II (NEK, n:10)</b>	5,2 (4,6-6,0)	5,5 (4,7-6,5)	5,9 (4,8-6,5)
<b>Grup III (NEK+NAC, n:10)</b>	5,6 (5,3-6,3)	5,9 (5,6-6,4)	6,3 (5,5-7,1)
<b>Grup IV (NEK+DFX, n:10)</b>	5,8 (5,3-6,4)	6,1 (5,8-6,9)	6,5 (6,2-6,9)
<b>Grup V (NEK+NAC+DFX, n:10)</b>	6,1 (4,8-6,9)	6,2 (5,1-6,9)	6,5 (5,9-7,2)

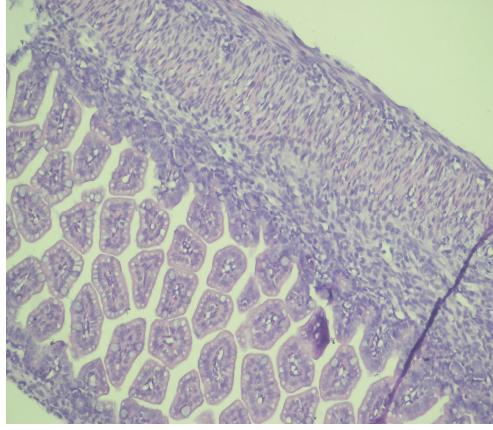
\* : Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ).

### **Histopatolojik Değerlendirme Bulguları:**

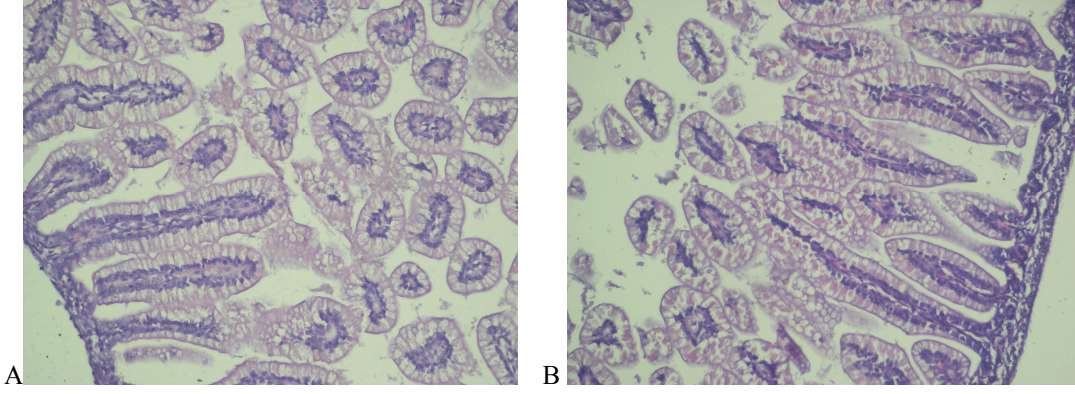
Barsakların histopatolojik incelemesinde; kontrol grubundaki ratların hepsi normal histopatolojik (*grade 1*) yapıya sahip iken (Şekil-4), NEK grubundaki tüm ratların barsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar, mikroskopik olarak villüs epitel hücre nekrozu, transmural nekroz saptandı (*grade 2-5*) (Şekil-6). Barsakların histopatolojik incelemesi NEK+NAC grubu ve NEK+DFX grubunda ratlarda *grade 1* ile *grade 2*, NEK+NAC+DFX grubundaki ratlarda *grade 1* histopatolojik bulgular saptandı. (Şekil-5A, 5B). NEK grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, NEK grubundaki ratların barsak histopatolojik skoru istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.001$ , Tablo 5). Bu bulgular ışığında H/R yöntemiyle rat yavrularının barsaklarında histopatolojik olarak *grade 2-5* hasarlanma meydana geldiği, NAC, DFX, NAC+ DFX tedavisi uygulanan gruplarda H/R modeli ile NEK oluşturulan rat yavrularının barsaklarında NEK grubuna göre histopatolojik olarak belirgin iyileşme sağladığı görüldü. (Şekil-3)



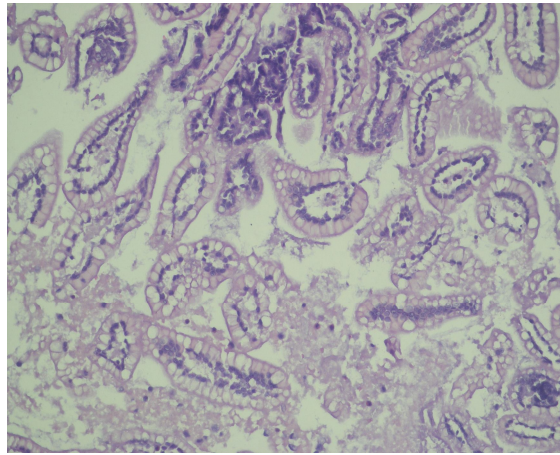
**Şekil-3:** H/R ile NEK oluşturulan ratın terminal ileumun makroskopik görünümü



**Şekil-4:** Normal histoloji, *grade 1*. Kontrol grubu (H&E, x1/100).



**Şekil-5:** Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, *grade 2*. A: NEK+NAC, H&E, x1/200. B: NEC+DFX, H&E, x1/200.



**Şekil-6:** Villus epitel hücre nekrozu, *grade 3*: NEK grubu, H&E, x1/200.

**Tablo-5:** Gruplara göre rat barsaklarının histopatolojik değerlendirme (*grade*) skorları (median ve dağılımı).

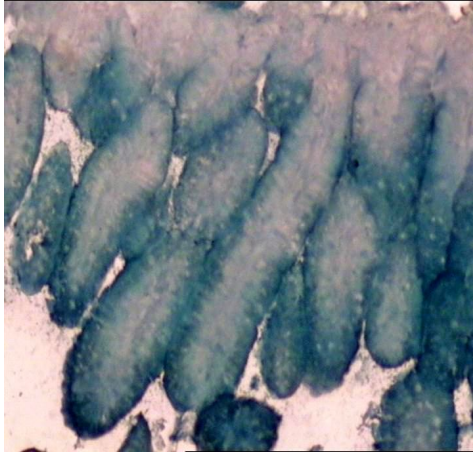
<b>Gruplar</b>	<b>Histopatolojik <i>Grade</i></b>
	<b>Median (Range)</b>
<b>Grup I (Kontrol)</b>	1.0 (1-1)
<b>Grup II (NEK)</b>	3.8 (2-5)*
<b>Grup III (NEK+NAC)</b>	1.1 (1-2)
<b>Grup IV (NEK+DFX)</b>	1.1 (1-2)
<b>Grup V (NEK+NAC+DFX)</b>	1.0 (1-1)

\*: Grup II ile grup I, III, IV ve V arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ).

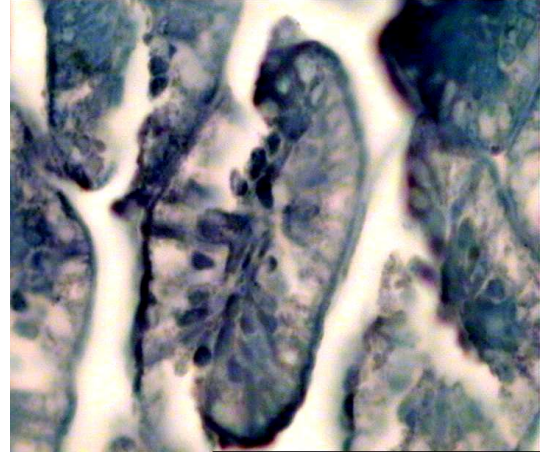
### **Apopitoz Değerlendirme Bulguları:**

Apopitoz açısından değerlendirildiğinde NEK grubunda apopitozun yüksek yüzdeye sahip olduğu görülmüştür (Şekil-8). Kontrol grubunda (Şekil-7) ve NEK+NAC grubunda (Şekil-9) apopitoz daha düşük olduğu görülmüştür. Kontrol grubu, NEK+NAC grubu, NEK+DFX grubu ve NEK+NAC+DFX grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p<0,05$ ) NEK+DFX grubunda apopitoz yüksek çıkmasına rağmen NEK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (Tablo 6).





Şekil-7: Kontrol grubu, apopitoz H&E, x1/400



Şekil-8: NEC grubunda apopitoz H&E, x1/400



Şekil-9: NEC+NAC grubunda apopitoz H&E, x1/400

**Tablo- 6 :** Gruplarda Apopitoz görülme yüzdeleri

Gruplar	Yüzde değeri
Kontrol	4,0
NEK	81,0
NEK+NAC	4,0
NEK+DFX	24,0
NEK+NAC+DFX	4,4



## Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları:

**Tablo-7:** Grupların barsak doku (yaş doku başına) malonildialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri (median ve dağılımı)

Gruplar	MDA	NO	CAT	SOD
	μmol/g	μmol/g	U/g	ng/g
<b>Grup I (Kontrol)</b>	0.38* (0.30-0.53)	0.28 † (0.22-0.37)	141.14 ¶ (70.5-262.4)	4.67§ (2.57-6.83)
<b>Grup II (NEK)</b>	0.72** (0.56-1.05)	0.53§ †† (0.37-0,66)	82.77¶¶ (57.87-126.5)	2.64§§ (1.68-3.90)
<b>Grup III (NEK+NAC)</b>	0.42*** (0.24-0.59)	0.14 ††† (0.10-0.21)	304.60¶¶¶ (126.25-653.2)	3.58§§§ (1.80-7.08)
<b>Grup IV (NEK+DFX)</b>	0.62**** (0.34-1.07)	0.19 †††† (0.09-0.33)	192.76¶¶¶¶ (87.25-360.35)	2.07§§§§ (1.38-3.59)
<b>Grup V NEK+NAC+DFX</b>	0.56 (0.34-1.14)	0.21 (0.10-0.44)	194.72 (84.07-328.52)	4.22 (1.65-6.59)

\* : Grup I ile grup II, IV ve V arasında p<0.05 (sırasıyla p:0.000, p:0.003, p:0.004).

Grup I ile Grup III arasında p>0,05

\*\* : Grup II ile grup I, III ve V arasında p<0.05 (sırasıyla p=0.000, p=0.000, p=0.004).

Grup II ile IV arasında p>0,05

\*\*\* : Grup III ile grup II arasında p<0,05 (p:0,000)

Grup III ile I, IV ve V arasında p>0,05

\*\*\*\* :Grup IV ile grup I arasında p<0,05 (p:0,003)

Grup IV ile grup II, III, V arasında p>0,05

† : Grup I ile grup II ve III arasında p<0.05 (p:0.000, p:0.000)

Grup I ile IV ve V arasında p>0,05

†† : Grup II ile grup I, III, IV ve V arasında p<0,05 (sırasıyla p:0,000, p:0,000, p:0,000, p:0,000)

††† : Grup III ile I ve II arasında p<0,05 (sırasıyla p:0,000, p :0,000)

Grup III ile IV ve V arasında p>0,05

†††† : Grup IV ile grup II arasında p<0,05 (p:0,000)

- Grup IV ile I, III ve V arasında  $p>0,05$
- ¶: Grup I ile grup II ve III arasında  $p<0,05$  (sırasıyla  $p:0,009$ ,  $p:0,002$ )
- Grup I ile grup IV ve V arasında  $p>0,05$
- ¶¶: Grup II ile grup I,III, IV ve V arasında  $p<0,05$  (sırasıyla  $p:0,009$ ,  $p:0,000$ ,  $p:0,001$ ,  $p:0,000$ )
- ¶¶¶: Grup III ile grup I, II arasında  $p<0,05$  (sırasıyla  $p:0,002$ ,  $p:0,000$ )
- Grup III ile grup IV ve V arasında  $p>0,05$
- ¶¶¶¶: Grup IV ile grup II arasında  $p<0,05$  ( $p:0,001$ )
- Grup IV ile grup I, III ve V arasında  $p>0,05$
- § : Grup I ile grup II, IV arasında  $p<0,05$  (sırasıyla  $p:0,007$ ,  $p:0,000$ )
- Grup I ile grup III ve V arasında  $p>0,05$
- §§ : Grup II ile grup I arasında  $p<0,05$  ( $p:0,007$ )
- Grup II ile grup III, IV ve V arasında  $p>0,05$
- §§§: Grup III ile IV arasında  $P<0,05$  ( $p:0,004$ )
- Grup III ile I, II ve V arasında  $p>0,05$
- §§§§: Grup IV ile grup I, III ve V arasında  $p<0,05$  (sırasıyla  $p:0,000$ ,  $p:0,004$ ,  $p:0,009$ )
- Grup IV ile II arasında  $p>0,05$

### MDA Ölçüm Bulguları:

Doku MDA düzeyi değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki MDA değeri diğer gruplara göre düşük seviyede idi. NEK grubunda en yüksek seviyede tesbit edildi. Diğer gruplardaki MDA değerleri kontrol grubu ile NEK grubu arasındaki değerlere sahipti. MDA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak kontrol grubu ile NEK grubu, NEK+DFX grubu ve NEK+NAC+DFX grubu arasında anlamlı fark bulundu ( $P<0.05$ ) (sırasıyla  $p:0.000$ ,  $p:0.003$ ,  $p:0.004$ ). Yine MDA açısından NEK grubu ile NEK+NAC ve NEK+NAC+DFX grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $P<0.005$ ). (sırasıyla  $p:0.000$ ,  $p:0.004$ ) Diğer gruplar karşılaştırıldığında MDA düzeyleri yönünden NEK grubu, NEK+NAC grubu arasında istatistiksel olarak farklılık yoktu fakat NEK grubuna göre düşüktü. H/R yöntemi ile NEK modeli oluşturulan rat yavrularında H/R'nin NEK'te barsak dokusu MDA düzeyini artırdığı ve en yüksek bu grupta olduğu görüldü. Tedavi uygulanan gruplarda değerlerde düşme olduğu bu farkın istatistiksel olarak NEK+NAC ve NEK+NAC+DFX gruplarında anlamlı olduğu görüldü. Tedavi uygulanan gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. En düşük değerler kontrol grubunda bulundu. (Tablo-7)

### NO Ölçüm Bulguları:

NEK'te inflamatuvar mediatör olan NO barsak doku düzeyleri incelendiğinde; en yüksek NO düzeyi NEK grubunda bulundu. NEK grubu ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). NEK grubu hariç diğer gruplar arasında NO düzeyleri arasında farklı değerler çıksa da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. İnflamatuvar bir mediatör olan NO düzeyleri, NEK' de artmakta ve NAC, DFX ve NAC+DFX tedavisiyle belirgin olarak azalmaktadır. (Tablo-7)

### CAT Ölçüm Bulguları:

Antioksidan enzimlerden doku CAT enzim aktivitesi incelendiğinde, NEK grubunda CAT enzim aktivitesi en düşük bulundu. NEK grubu ile kontrol grubu, NEK+NAC grubu, NEK+DFX grubu ve NEK+NAC+DFX grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı. ( $p<0.05$ ) ( sırasıyla  $p:0.009$ ,  $p:0.000$ ,  $p:0.001$ ,  $p:0.000$ ). Tedavi uygulanan gruplar arasında CAT düzeyi açısından değerlendirildiğinde en yüksek değer NEK+NAC grubundaydı. NEK+DFX ve NEK+NAC+DFX grubu birbirine çok yakın değerlere sahipti. Fakat her üç grup değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ( $p>0.05$ ) Antioksidan bir enzim olan CAT'ın doku düzeyi NEK'de azalmış olup uygulanan tedavilerle doku düzeyinin arttığı görülmüştür. (Tablo-7)

### SOD Ölçüm Bulguları:

SOD doku enzim düzeyi NEK grubunda düşük bulunmuştur. Kontrol grubunda ise en yüksek değerler tesbit edilmiştir. NEK grubu ile sadece kontrol grubu arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmıştır ( $p<0.05$ ) NEK + DFX grubundaki değerler NEK grubundan da düşük bulunmuştur. Bu nedenle NEC+DFX grubu, NEK+NAC grubu ve NEK+NAC+DFX grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık NEK+DFX grubunda görülmüştür ( $p<0.005$ ). NEK'te SOD düzeyi düşük olup özellikle NAC içeren tedavi gruplarında artış saptanmış bu artış NAC'a DFX eklenmesi ile potansiyelize olmuş ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo-7).

## TARTIŞMA

Nekrotizan enterokolit, özellikle prematüre yenidoğanları etkileyen, en sık acil cerrahi müdahale gerektiren GİS hastalığıdır. Son dekatlarda yenidoğan yoğun bakım ünitesi imkanlarının iyileştirilmesi ve teknolojik gelişmelerle birlikte prematüre yenidoğanların yaşam oranları artmakta, dolayısıyla NEK gelişme riski olan hasta popülasyonu da artmaktadır. Sürfaktanın kullanıma girmesiyle birlikte respiratuvar distres sendromundan ölümlerin azaldığı göz önünde tutulursa, güncel kanı, kısa bir süre içinde prematüre yenidoğanların ana ölüm nedeninin NEK olabileceği yönündedir (64). Hastalığın önlenmesi ve tedavisi konusunda benimsenmiş etkin bir yöntem bulunmadığından; mortalitesi ve morbiditesi yüksektir (23). Son 30 yıldan beri yapılan çalışmalara rağmen halen mortalite %10-50 arasında değişmektedir (69,100,101). Yüksek mortalite oranı, uzun dönemde ciddi komplikasyonların gelişmesi ve hastane masraflarının fazla olması, NEK tedavisine yönelik çalışmalara ne kadar ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Nekrotizan enterokolit patogenezi, hakkında birçok araştırma yapılmasına rağmen halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak multifaktöriyel kompleks bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Prematürite, hipoksik-iskemik hasar, enteral beslenme ve bakteriyel kolonizasyon patogeneze sorumlu tutulan başlıca etkenlerdir (20). Bu faktörler eşliğinde serbest oksijen radikalleri, aktive lökositler, PAF, TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi proinflamatuvar mediatörler aracılığıyla NEK'te ortak son olan barsak nekrozu gelişmektedir (1-3,8,26,77). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir başka deneysel çalışmada, NAC'ın; ratların alveoler epitelyum hücrelerindeki TNF- $\alpha$ 'nın indüklediği nükleer faktör kappaB'nin adenoviral E1A aracılı transaktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (102). Zhang ve arkadaşları NEK oluşturdukları ratlarda kontrol grubuna göre barsak doku TNF- $\alpha$  düzeyinin anlamlı yüksek olduğunu göstermişlerdir (103). Caplan ve arkadaşları NEK'li yenidoğanlarda plazma TNF- $\alpha$  düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğunu saptamış ve TNF- $\alpha$ 'nın NEK patogenezindeki önemini vurgulamışlardır (48). Travadi ve arkadaşları NEK oluşturulan preterm ratlara TNF- $\alpha$  üretimini azaltan pentoksifilin uygulaması ile plasebo grubuna göre NEK şiddetinin ve

insidansının azaldığını göstermişlerdir (76). TNF- $\alpha$ , PAF ile birlikte NEK'e neden olan inflamatuvar kaskadın oluşumunda ana rol oynamaktadır. TNF- $\alpha$ , PAF'ın da içinde bulunduğu birçok proinflamatuvar mediatörlerin üretimini, PNL'den serbest oksijen radikallerinin salınımını, barsak epitel hücrelerinin apoptozisini başlatmaktadır (36). Çalışmamızda NEK grubunda apoptozun yüksek çıkması bu mekanizma ile açıklanabilmektedir.

Hipoksik-iskemik stres süresince kan akımı splenik yataktan beyin, kalp gibi hayati organlara gitmekte ve bunun sonucu barsakların da içinde bulunduğu çeşitli organlarda iskemik hasar gelişmektedir. İskemiye takibeden reperfüzyon sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin barsak nekrozuna neden olduğu gösterilmiştir. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, proteinlerin disülfid bağlarında bozulma, DNA hasarı oluşturarak ve inflamatuvar hücrelerde aktivasyona neden olarak hücre hasarını gerçekleştirmektedir (104,105). H/R sonrası yoğun olarak ortama salınan serbest oksijen radikalleri son derece reaktif ürünler olup hücre hasarına neden olurlar. Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar antioksidan defans sistemleri veya antioksidanlar olarak bilinirler.

Term bebeklere göre antioksidan defans sistemleri yetersiz olan prematüre yenidoğanlar yüksek konsantrasyonda oksijene, infeksiyon veya inflamasyon nedeniyle daha fazla oksidatif strese maruz kalırlar. İntrauterin ortama göre nispeten hiperoksik ekstrauterin çevreye adaptasyon açısından gebeliğin sonuna doğru antioksidan kapasite artar. Antioksidan defans sistemleri gelişmeden doğan prematüreler bu nedenle oksidatif strese karşı oldukça hassastırlar. Nitekim NEK, prematüre retinopatisi, bronkopulmoner displazi gibi özellikle prematüre bebeklerde görülen ve serbest oksijen radikalleri ile oldukça ilişkili hastalıklar bu duruma işaret etmektedir (9,68). Rogers ve arkadaşları 41 yenidoğanda yaptıkları çalışmada kord serum total antioksidan kapasitenin gestasyonel yaşla birlikte arttığını saptamışlardır. Aynı çalışmada 32 haftanın altında doğan 26 prematüre yenidoğan ayrı olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada total antioksidan kapasite ile ilişkili hastalıklar arasında anlamlı farklılık saptanmamakla birlikte kord total antioksidan kapasitesi ile gestasyonel yaşın pozitif korelasyonu gösterilmiştir (68). Nekrotizan enterokolit

olgularının %90'nını prematürelere oluşturmaktadır (1-3,20). Deneysel çalışmalarda yedi günden küçük rat yavrularında ise bu gelişimin preterm bebeklere karşılık geldiği belirtilmektedir (106). NEK bir prematüre hastalığı olduğu için, çalışmamıza prematüre yenidoğana karşılık gelen postnatal bir günlük rat yavruları alınmıştır.

Bu çalışmaya başlanmadan önce farklı NEK modelleri incelenmiştir. Bugüne kadar oluşturulan NEK modelleri, patogeneizde en fazla suçlanan prematürite, hipoksik-iskemik hasar, formula mama ile beslenme ve enfeksiyon temeline dayandırılmaktadır. Bu modellerle oluşturulan barsak hasarlarında histopatolojik ve biyokimyasal olarak NEK benzeri değişiklikler gösterilmiştir (20). Okur modeli 5 dk sürelerle uygulanan CO<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> verilerek NEK oluşturulması temeline dayanmaktadır (70).

Caplan ve arkadaşları kullandıkları NEK modelinde patogeneizde suçlanan faktörleri araştırmışlardır. Asfiksi, formula mama ve bakteri inokulasyonu ile NEK oluşturulan ratlarda, asfiksi olmadan sadece formula mama ve bakteri inokulasyonu ile NEK oluşturulan ratlara göre mortaliteyi belirgin yüksek saptamışlardır. Çalışmanın sonunda asfiksini NEK'te kritik başlangıç faktör olduğu belirtilmiştir (107). Caplan ve arkadaşları bir başka çalışmalarında hipoksinin hafif mukozal hasar yaparak NEK başlangıcında kritik rol oynadığını, enfeksiyon gibi diğer etkenlerin katkısıyla mukozal hasarın daha da arttığını belirtmişlerdir (3).

Okur ve arkadaşları kendi modelleri olan deneysel çalışmada, rat yavrularında 5 dakika %100 CO<sub>2</sub> solutarak hipoksi, 5 dakika %100 O<sub>2</sub> solutarak reoksijenizasyon sağladıklarını, bunun sonucunda deneklerin barsak kesitlerinde ışık mikroskopunda kolayca izlenebilen NEK'in karakteristik değişikliklerini oluşturduklarını bildirmişlerdir (70). Okur ve arkadaşlarının yöntemi başka çalışmalarda da uygulanmış, histopatolojik ve biyokimyasal olarak insanlardaki NEK'e benzer barsak doku hasarlanmasının meydana geldiği gösterilmiştir (70,98). Bizim çalışmamızda yaptığımız 10 dk sürelerle uygulanan CO<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> verilerek oluşturulan NEK modeli idi. Bu model Özkan ve arkadaşları tarafından Okur modeli modifiye edilerek

tanımlanmıştır (81). Çalışmamızda Modifiye Okur yöntemini tercih etmemizin nedeni sonuçların tatminkar düzeyde olması ve kolay uygulanabilir olmasıdır.

Çalışmamızda ratların ilk günlük kilolarıyla üçüncü günlük kiloları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. H/R ile NEK oluşturulan yenidoğan ratlarda litaretürde kilolarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren çalışmaya rastlanılmamıştır (70).

Çalışmamızda NEK grubundaki histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde, aynı evreleme metodunu kullandığımız Okur ve arkadaşlarının çalışmasıyla paralellik gösterdiği görülmüş, NEK grubunda grade 2-5 gibi histopatolojik bulgular gözlenirken tedavi gruplarında normal histopatolojik bulgular saptanmıştır. Çalışmamızda H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen ratların terminal ileumundan alınan doku örneklerinde makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar, mikroskopik olarak villüs epitel hücre nekrozu, transmural nekroz saptanırken, kontrol grubu tümüyle normal histolojiye sahipti. Uyguladığımız NEK modeli, NEK grubunda histopatolojik değerlendirmede bulgularımız ile yapılan diğer deneysel çalışmalardaki NEK grubu barsak histopatolojik bulguları ile benzerdi (7,70).

Bugüne kadar yenidoğanlarda NEK modellerinde apoapitoz bakılmamıştır. Varga ve arkadaşları 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada iskemi reperfüzyon modelinde barsak dokusunda apopitoz bakmışlar ve anlamlı olarak arttığını saptamışlardır (85). Bilindiği gibi NO; arjininin nitrik oksit sentez enzimi aracılığıyla sitrilüne dönüşüm ürünü olup, süperoksit ile reaksiyona girerek potent bir oksidan olan peroksinitrite dönüşmektedir. İnflamatuvar yanıtta NO'in sitotoksik ve patolojik etkilerinden, oluşan peroksinitrit sorumludur (51). Sandoval ve arkadaşları, insan intestinal epitel hücrelerinin ve mürin makrofajların peroksinitrit ile inkübasyon sonucu apopitozise uğradığını göstermişlerdir. (108). Potoka ve arkadaşları da, invitro enterosit hücre kültürlerinde endotelial *growth* faktör ile uyarılmış enterosit proliferasyonunun, ortama peroksinitrit ilavesi ile inhibe olduğunu göstermişler ve peroksinitritin barsak bariyer bütünlüğünün bozulmasında anahtar rol oynadığını

belirtmişlerdir (65,67). Çalışmamızda NEK grubunda belirgin apopitoz saptanmış, kontrol, NAC, DFX ve NAC+DFX grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgular NEK patogenezinde apopitozun önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir.

H/R modeli ile barsak hasarlanması oluşturulan hayvan çalışmalarında, oksidatif stresin hücre düzeyindeki zararlı etkilerinden birisinin lipid peroksidasyonu olduğu, lipid peroksidasyonunun H/R sırasında arttığı ve NEK patogenezinde önem kazandığı bilinmektedir (70,71,73,81). Serbest oksijen radikallerinin hücre düzeyindeki zararlı etkilerinden birisi hücre ve mitokondri membranlarında oluşturduğu lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, serbest radikal hasarı için iyi bir belirteyici olduğundan, H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ratlarda MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (70). Öztürk ve arkadaşları çalışmalarında H/R yöntemiyle NEK oluşturdukları ratlarda, *recombinant human* IL-10 gibi koruyucu ilaçlarla mukoza hasarında ve barsak doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu göstermişlerdir (7). Çalışmamızda, literatürdeki çalışmalara benzer olarak NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen grupta barsak doku MDA düzeylerini kontrol grubuna göre belirgin yüksek olduğu saptandı. Bu çalışma ile serbest oksijen radikallerinin NEK patogenezinde rol oynadığı bir kez daha gösterilmiştir.

Shaikh ve arkadaşlarının çalışmasında toksik kadmiyuma bağlı hepatotoksisite ve renal toksisitenin NAC ile ilişkisi araştırılmıştır. NAC'ın sıçanlarda toksik kadmiyum ile birlikte verildiğinde lipid peroksidasyonunu önleyerek karaciğer toksisitesini azalttığı tespit edilmiştir (13). Çalışmamızda da NEK patogenezinde önemli olan lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA değerlerinin NAC tedavi grubunda NEK grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkması NAC'ın lipid peroksidasyonunu önlemedeki etkinliği hakkında Shaikh ve arkadaşlarının çalışmalarıyla paralellik göstermektedir.

NO'in sitotoksik ve hücrede patolojik olaylardan sorumludur. Literatürde NEK'te NO artışının olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Zamora ve arkadaşları



H/R ve formula mama ile NEK oluşturulan ratlarda, kontrol grubuna göre terminal ileumdaki iNOS ekspresyonunun ve NO metabolitlerinin dördüncü gün sonunda anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermişlerdir (109). Zhang ve arkadaşları, çalışmamızdaki gibi H/R yöntemiyle NEK oluşturdukları ratlarda kontrol grubuna göre barsak doku NO düzeyini belirgin yüksek saptamışlardır (103). Çalışmamızda NEK grubunda barsak doku NO düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek çıkması ve çalışmamızın sonuçları ve literatür bilgileri ışığında NO'nun NEK gelişiminde inflamatuvar bir mediatör olarak çok önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

Antioksidan defans sistemlerinin NEK oluşumunda önleyici rolü olduğu bilinmektedir. Eğer antioksidan defans sistemleri yetersiz olursa lipid peroksidasyon ürünlerinin artışı ile patolojik süreç başlamaktadır. Nycyk ve arkadaşları ventilatöre bağlı 57 prematüre yenidoğanın solunum havasındaki lipid peroksidasyon ürünü olan pentan konsantrasyonu ile gestasyonel yaş, prematüre retinopatisi, intraventriküler hemoraji, bronkopulmoner displazi ve mortalite arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda pentan konsantrasyonunun gestasyonel yaşın artışıyla azaldığını, yüksek pentan konsantrasyonu ile prematüre retinopatisi, intraventriküler hemoraji ve mortalite arasında anlamlı ilişki olduğunu göstermişlerdir (110). Bu literatür bilgileri altında prematüre yenidoğanlarda antioksidan kapasitenin yetersiz oluşunun NEK gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda, antioksidan defans sistemlerinden SOD ve CAT enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde NEK grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır. Antioksidatif defans sistemlerinden olan SOD ve CAT enzim aktivitesinin NEK'te belirgin olarak azalmış olduğu gösterilmiştir.

Caplan ve arkadaşları, suçlanan etkenlere (hipoksi, formula ile beslenme, bakteri) maruziyetten sonra ilk 36 saat içinde NEK'in başladığını belirtmişlerdir (107). Çalışmamızda, H/R ile intestinal hasar oluşturulan ratlarda, belirtilen ilaçların erken uygulamasının inflamatuvar mediatörlerin ve serbest oksijen radikallerinin hücre hasarı yapıcı etkilerini ortadan kaldırmada etkin olup olmadığı araştırılmış ve ilaçların ilk dozları H/R'dan hemen sonra uygulandığında NEK şiddetinde azalma olduğu gösterilmiştir. NEK'te oluşan intestinal hücre harabiyeti nedeniyle, oral

yoldan verilen ilaçların emiliminin gerçekleşmeyeceği düşünülerek, subkutan (sc) olarak uygulanmıştır.

NAC'ın farklı dokularda (akciğer, beyin) apoptozu önlediğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NAC'ın lipopolisakkaritler tarafından uyarılan hipoksik beyin hasarını azalttığı ve bunu caspase 3, caspas 1 aktivasyonunu inhibe ederek sağladığı bildirilmiştir. NAC koruması redoks durumun geliştirilmesi ve apoptozun inhibasyonu ile ilişkilendirilmiştir (111). Foresti ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada NAC'ın apoptozu önleyebildiği, bunu çeşitli proteinlerin aktivitelerinin düzenleyerek hücre surviyini uzatması sonucunda sağladığı bildirilmiştir. NAC, endotel disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibrozis, invazyon, kıkırdak erozyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon ihtiyacının geciktirilmesini sağladığı bildirilmiştir (12). Jones AL'in çalışmasında NAC'ın asetaminofen toksisitesinde ve alkol toksisitesinde 10-18 saat içinde verildiği takdirde karaciğer hasarından koruduğu ve mortaliteyi azalttığını belirtmiştir (95). Asetaminofen hepatik hücrelerde toksik etki ile apoptozu indüklemektedir.

Literatürde ulaşabildiğimiz kadarı ile intestinal dokuda NAC'ın apoptozu önlediğine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda NEK grubunda istatistiksel olarak yüksek yüzdede apoptoz saptanmış olmakla birlikte NEK+NAC grubunda apoptoz kontrol grubu ile aynı düzeyde görülmüştür. NEK+NAC+DFX grubunda da benzer şekilde apoptoz istatistiksel olarak NEK grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NEK+DFX grubunda apoptoz NEK grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu bulgular NAC'ın, DFX'in ve NAC+DFX'in intestinal dokuda apoptozu önleyici etkileri olduğunu göstermektedir.

NAC'ın intestinal düz kaslar üzerine etkinliğini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Stephen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çizgili kaslar üzerine yapılan bir çalışmada nötrofil aktivasyonunu azalttığı görülmüştür. Kompartman sendromu modeli oluşturularak NAC'ın çizgili kaslardaki etkinliği araştırılmıştır. Nötrofil aktivasyonunu azalttığı için oksidan hasarı azalttığı gösterilmiştir. (112). H/R modeli ile NEK oluşturulmuş deneysel çalışmalarda,

önceden SOD ve CAT gibi antioksidanların verilmesi ile NEK şiddetinin belirgin derecede azaltılabildiği bildirilmiştir (53). Bu çalışmalar değerlendirildiğinde SOD ve CAT gibi antioksidanların verilmesi ya da SOD ve CAT seviyelerinde artışa neden olan ilaçların verilmesi aynı etkiye neden olacağından NEK'te NAC ve DFX'in verilmesi NEK şiddetini azaltabileceğini düşündürmektedir.

By Katarzyna ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tavşan ince barsaklarında deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperüzyon sonrasında antioksidan olarak NAC 100 mg/kg/gün intravenöz kullanılmıştır. Çalışmada NAC'ın *superior mezenteric arter* kan akımını arttırdığı bildirilmiştir. İskemi sonrasında oluşan patolojik bulguları azalttığı bildirilmiştir. NEK patogenezinde önemli rolü olan kan akımının intestinal alanda azalmasının NAC ile düzeldiği bildirilmiştir (113). Bizim çalışmamızda da NEK grubuna göre NAC grubundaki histopatolojik bulgular daha iyi bulunmuştur. Bunun NAC'ın antioksidan etkinliğinin yanında intestinal kan akımı üzerindeki olumlu etkisinin de rolü olduğu kanısındayız.

Litaratürde NAC'ın NO üzerine etkilerini araştıran çalışmalar incelenmiştir. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda radyasyon hasarı sonrası gelişen intestinal bariyer fonksiyonu üzerinde NAC'ın koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir. NAC'ın bu koruyucu etkisini NO'ı inhibe ederek gösterdiği belirtilmiştir (114). Çalışmamızda da NEK grubunda yüksek seviyede saptanan NO değerleri kontrol grubunda düşük bulunmuştur. NAC ile tedavi edilenlerde NO seviyesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştük olduğu görülmüştür. NAC ve NAC+DFX gruplarındaki sonuçlar kontrol grubundaki sonuçlardan daha düşük saptanmıştır. Bu da bize NEK'te NO seviyelerinin NAC tedavisinin önemli derecede etkili olduğunu göstermektedir.

Meirelles ve arkadaşlarının yaptığı güncel bir çalışmada ratlarda deneysel pankreatik iskemi-reperfüzyonu takiben pankreas ve böbrek üzerinde NAC'ın etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada L-sistein ve redükte glutaton prekürsörü olan NAC biyolojik ve patolojik süreçleri etkilediği, NAC'ın hücrelerde sülfidril gruplarının kaynağı ve SOR temizleyicisi olduğu; iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkileri gösterilmiş olduğundan yola çıkılarak NAC'ın renal fonksiyonlarda

da düzelme sağladığı bildirilmiştir. Bu etkinin intravenöz NAC nedeni ile elde edilen yüksek kan seviyelerine bağlı olduğu ve NAC'ın direk olarak hidroksil radikallerini temizleyici etkisinden kaynaklandığı belirtilmiştir. NAC aynı zamanda lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan etkisini gösterdiği bunu hücre membranını SOR'dan koruyarak yaptığı, süperoksit temizleyici görevini eNOS ekspresyonunu ve NO biyoyararlanımını artırarak yaptığı bildirilmiştir. NAC'ın aynı zamanda iNOS'u artırarak NO metabolizmasını artırıp NO'un toksik etkisinden dokuyu koruduğu ifade edilmiştir (115). Çalışmamızda NAC kullanılanların NO seviyeleri NEK grubuna göre düşük tesbit edilmesi Meirelles ve arkadaşlarının çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. NEK tedavisinde NAC'ın aynı mekanizmayla etkili olduğunu düşündürmektedir.

Mehrpour ve arkadaşlarının çalışmasında NAC'ın Asetaminofen zehirlenmelerinde oluşan karaciğer hasarını intravenöz tedavi ile geç dönemlerde bile azalttığı görülmüştür (116). El-Sayed ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda Karmustine bağlı oluşan myelotoksositeye karşı NAC'ın koruyucu etkisi araştırılmıştır. 150 mg/kg/gün dozunda beş gün süreyle NAC intraperitoneal olarak kullanılmıştır. Karmustinin indüklediği apoptozu ve antioksidan parametreleri belirgin olarak azaltmış olduğu tesbit edilmiştir. NAC genellikle mukolitik bir ajan olarak kullanılan sentetik bir tiol içeren bir bileşik olduğu, serbest radikalleri konjugasyon ve redüksiyon gibi enzimatik olmayan reaksiyonlarla detoksifiye ettiği vurgulanmıştır. Birçok dokuda NAC sistein oluşturmak için deasetile edildiği ve oluşan sistein, glutatyon biyosentezinde kullanıldığı, hepatik hücrelerde glutatyon seviyelerini normale getirerek iskemiye karşı güçlü şekilde koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca TNF aracılı apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir. NAC tedavisi ile pansitopeninin belirgin bir şekilde düzeldiği, hemoglobin seviyesinin arttığı saptanmıştır. Dokuda MDA'yı azaltırken, CAT ve SOD'ı artırdığı ifade edilmiştir. (117). Çalışmamızda; NAC kullanılan grupta NEK grubuna göre MDA ve NO seviyelerini azalttığı ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Ayrıca CAT ve SOD düzeylerini arttırdığı göstermiştir.

NAC'ın şelasyon edici özelliğinin de olması, ağır metallerin dokuda oksidatif strese neden olarak oluşacak hasarı önlediğini bildiren çalışmalar mevcuttur.

Sarıkaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NAC; akut civa zehirlenmelerinde şelasyon edici özelliği ile kullanılmıştır. NAC; civayı sistein gruplarıyla bağlayarak şelasyon yaptığı bildirilmiştir (118). Bir başka çalışma da Setpute ve arkadaşları ratlardaki feokromastoma hücrelerindeki siyanüre bağlı oksidatif stres aracılı hücre ölümünde NAC antioksidan olarak kullanılmıştır. Glutatyon ve diğer antioksidanları normal seviyeye getirmiş, siyanürün oksidatif etkisini önlemesinin yanısıra lipid peroksidasyonuna bağlı MDA yüksekliğini azalmasını sağladığı bildirilmiştir (119). Çalışmamızda da NAC grubunda NEK grubuna göre MDA düzeyinin anlamlı düşük çıkması Setpute ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzerdir.

NAC ile ilgili yapılan çalışmalarda NAC'ın antioksidan özelliği nedeniyle profektik olarak kullanılması araştırılmıştır. Soghier ve Brion tarafından yapılan bir çalışmada parantal beslenen yenidoğanlarda sistein, sistin ve NAC ilavesinin etkinliği araştırılmış ve büyümeye belirgin bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Yenidoğan hastalıklarından bronkopulmoner displazi, prematüre retinopatisi, cerrahi gerektiren NEK ve intraventriküler hemoraji gibi hastalıklara bağlı ölüm riskini etkilemediği belirtilmiştir (120). Prasad ve arkadaşlarının çalışmalarında NAC'ın etkisiz olduğu patolojiler vurgulanmıştır (121).

NAC'ın NEK modellerinde intestinal mukoza hasarı üzerine koruyucu etkinliğini gösteren literatür bilgileri mevcuttur. Koivusalo ve arkadaşlarının yenidoğan pigletler üzerinde intralüminal casein modelle oluşturulan NEK'de; NAC'ın mukozal hasar ve bakteriyel translokasyonu değerlendirilmiştir. NAC gibi antioksidan ilaçların teorik olarak avantajlı olduğu ve bakteriyel translokasyonu önlediği bildirilmiştir. SOR temizleyicisi olarak görev alan NAC'ın glutatyonun sentezini uyardığı ve deneysel olarak oluşturulmuş NEK modelinde barsak hasarının gelişmesini inhibe ettiği ve intestinal mukozanın permeabilite değişikliklerini sınırladığı bildirilmiştir. Ciddi septik şok tedavisinde antibiyotik tedavisine ilave olarak NAC eklenmesinin daha avantajlı etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (122).

Yine NAC'ın intestinal hasar üzerine etkinliğini gösteren bir çalışmada Öcal ve arkadaşları ratlarda termal hasar sonrasında barsaktaki oksidatif stres ve bakteriyel translokasyon üzerine NAC'ın etkinliği araştırmışlardır. NAC serbest oksijen radikali

temizleyicileri arasında en çok araştırılan farmakolojik ajan olduğu bildirilmiştir. En iyi hidroksil radikali ve hipoklorik asit ile reaksiyon verdiği, hidrojen peroksit ve süperoksit radikali ile zayıf reaksiyon verdiği bildirilmiştir. Dahası NAC'ın inflamasyon süreci üzerine yararlı etkilerinin olduğu, sitokin ekspresyonunu ve salınımını baskıladığı, adezyon molekül eksplozyonunun inhibisyonunu ve NF kappa B' nin inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir. Hepatik, renal, intestinal iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerinde akciğer hasarı üzerine koruyucu etkilerini gösteren birçok deneysel çalışmalar yapıldığı, termal yanık sonrasında intestinal hasarda MPO' un arttığı ve NAC'ın MPO düzeyini düşürdüğü görülmüştür (123)

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NAC'ın lipopolisakkaritler tarafından uyarılan hipoksik beyin hasarını azalttığı bildirilmiştir. NAC, %78'e varan beyin hasarını engellemesi belirgin nöral koruma sağladığı bu korumanın isoproten aktivasyonunu azaltarak, glutasyon seviyesini artırarak ve caspase 3, caspas 1 aktivasyonunu inhibe ederek sağladığı bildirilmiştir. NAC koruması redoks durumun geliştirilmesi ve apoptozun inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (111). Çalışmamızda da NAC verilen grupta apoptozun düşük çıkması NEK'te apoptozu aynı mekanizmayla engellediğini desteklemektedir

Magdalan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan hepatosit kültürlerinde alfa-amanitin tarafından indüklenmiş apoptozdan NAC'ın koruyucu etkinliğinin olduğu tesbit edilmiştir (124). Çalışmamızda, NEK tedavisinde NAC'ın histopatolojik değişiklikleri ve apoptozu belirgin şekilde önlediği saptanmış olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Biyokimyasal değerlendirmede proinflamatuvar mediatörlerden NO düzeyini ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'yı NEK grubuna göre anlamlı oranda azalttığı saptanmıştır. NAC tedavisi CAT ve SOD düzeylerini artırmış, CAT artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar NAC'ın antioksidan etkinliğini göstermektedir. Biz de antioksidan etkisini önceki çalışmalarda belirtildiği gibi serbest oksijen radikalleri ile direkt etkileşime girerek gösterdiği kanısındayız.

Litaratürde DFX'in farklı dokularda kan akımını artırıcı ve hipoksik iskemik hasarı önleyici etkileri olduğu gösterilmiştir. Signorini ve arkadaşları tarafından

yenidoğan ratlarda hipoksik-iskemik ensefalopati modelinde hipoksi-iskeminin beyin her iki korteksinde de DFX-demir bağlanmasında belirgin artışa neden olduğu bildirilmiştir. Hipoksi iskemi melatonin tedavisi alanlarla sadece hipoksi- iskemiye maruz bırakılan ratlara göre daha düşük serbest demir düzeyleri saptanmıştır. Bunun hipoksi-iskemi sonucunda gelişen oksidatif hasarı önlemede melatonin ve DFX'in nöroprotektif rolü olduğunu gösterdiği bildirilmiştir (125). Sorond ve arkadaşlarının çalışmasında DFX'in infüzyonu ile serebral kan akımında artma olduğu gösterilmiş ve bunun hipoksiye bağlı indüklenebilen faktör-1 ile olası ilişkisi araştırılmıştır. İnmeli olarak tariflenen felçli hayvan modellerinde DFX'in hipoksi ile indüklenebilen faktör-1'i aktive ettiğini ve bu şekilde beyin hasarını azalttığı, fonksiyonel iyileşme sağladığı bildirilmiştir. DFX'in insanlardaki serebral dolaşım üzerindeki etkileri araştırılmıştır. DFX infüzyonu belirgin olarak serebral damarlarda vazodilatasyona sebep olmuştur. DFX gibi hipoksiye bağlı indüklenebilen faktör-1 aktivitesi serebral perfüzyonu artırarak ve serebral damarları dilate ederek nöronları iskemik hasara karşı koruyabildiği bildirilmiştir. DFX'in toksik radikalleri bağlaması ve demir bağlama özelliklerinin olması DFX'i iskemide daha etkili hale getirmektedir (94).

Litaratürde DFX'in barsaklarda iskemi-reperfüzyon sonrasında doku hasarını önlediğini gösteren çalışmalar vardır. Joseph ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma ratlarda immatür barsakta iskemi sonrasındaki hasar üzerine DFX etkisi araştırılmıştır. 76 rat üzerinde yaptıkları çalışmada DFX'in postiskemik hasarda etkilerini açıklamak, hasarın önlenmesi ve surveyi araştırılmıştır. 90 dk süreyle *superior mezenteric arter* oklüzyonu yapıp sonra reperfüzyon yapılmışlardır. DFX grubunda oklüzyon sonrası DFX 15 mg/kg intravenöz verilip sonra reperfüzyon yapılmışlar. Survey kontrol grubunda %100 iken tedavi verilmeyenlerde %14, DFX tedavisi verilenlerde %28 saptanmıştır. Histopatolojik olarak tedavi grubunda anlamlı iyileşme görüldüğü bildirilmiştir. Yenidoğan barsak iskemisine yol açan NEK gibi durumlarda reperfüzyon hasarını serbest demirin doku hasarında önemli bir rol oynadığı ve demir bağlayıcı bir ajanın verilmesiyle survey ve histoloji üzerine yararlı etkileri olacağı bildirilmiştir (126).

DFX tedavisinin histopatolojik olarak doku hasarını koruyucu etkilerini gösteren yayınların yanında Box ve arkadaşlarının bildirdiği gibi ciddi hipoksik ortamda insan meme epitelyum hücrelerine DFX tedavisinin apoptoz üzerine belirgin etkisi olmadığını bildiren yayınlar da mevcuttur (127). Çalışmamızda DFX tedavisi verilen grupta apoptoz kontrol ve diğer tedavi gruplarına göre yüksek saptanmıştır. NEK grubuna göre istatistiksel olarak düşük saptanmış olmasına rağmen kontrol grubu ve NAC, NAC+DFX grubu kadar düşük seviyede saptanmamıştır. Box ve arkadaşlarının sonuçları ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızdaki sonuçlar DFX'in etkili olduğunu göstermektedir.

DFX tedavisinin antioksidan özelliğinin yanısıra şelasyon edici özelliğinin önemli olduğu ve her yaşta şelasyon edici özelliği ile kullanılmaktadır. Literatürde şelasyon edici özelliği ile kullanımın antioksidan özelliğini katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Park, intrauterin intravasküler transfüzyonu takiben neonatal demir yüklenmesine sekonder ciddi karaciğer hastalığı geliştiği ve hastada serum ferritini 4000 mikrogram/L üzerinde tesbit edildiği, DFX tedavisi ile KC fonksiyonlarında düzelmeye başladığını bildirmiştir (84). Bu DFX'in yenidoğanlarda şelasyon tedavisinde kullanıldığını gösteren bir çalışma olarak önemlidir. Sadık ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ratlarda kardiyak ve renal dokularında adriyomisin toksisitesine karşı DFX'in etkisi araştırılmış, DFX tedavisinin kardiyak ve renal dokuları toksisiteden koruduğu bildirilmiştir. Ağır metaller dokularda oksidatif stese yol açarak lipid peroksidasyonunu artırdığından DFX tedavisi bu olumsuz mekanizmayı engellediği bildirilmiştir. İki hafta sürecince her doz 50 mg/kg olmak üzere toplam altı doz intraperitoneal DFX uygulanmıştır. Adriyomisine bağlı her iki dokudada yüksek MDA düzeyleri saptanmıştır. DFX uygulamasıyla MDA düzeylerinin normal düzeylere doğru indiği tesbit edilmiştir (128). DFX'in MDA düzeyini azaltması NEK tedavisinde kullanılması düşüncesini çağırıştır.

Weitzman ve arkadaşlarının in vitro olarak yaptıkları bir çalışmada asbestosun katalize ettiği lipid peoksidasyonu ve bu peroksidasyonun DFX tarafından inhibe edilmesi araştırılmıştır. DFX demir, bakır gibi diğer metallerde kompleksler oluşturduğu ve lipid peroksidasyonda rol aldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ana nokta olarak in vitro şartlarda aspeustos fibrillerinin değişik formları peroksidasyonu



katalizlediği ve bu aktivitede aspeustosun demir içeriği sorumlu tutulmuştur. Aspestosu DFX ile yıkamak lipid peroksidasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (129)

Bresgen ve arkadaşlarının erişkin ratlar üzerinde yapmış olduğu çalışmada ferritinin indüklediği hücre ölümüne DFX'in koruyucu etkisi araştırılmıştır. 100 ng/ml ferritin dozuyla hücre ölümünde demir aracılı stres oluşturularak 100 mikrogram/ml DFX verilerek koruyucu etkinliği gösterilmiştir. Demirin hücre fonksiyonları için önemli bir rolü olsa da serbest 2-değerlikli demir fenton reaksiyonuyla reaktif oksijen ürünleri oluşmasına rol açtığı ve bu ürünler lipid peroksidasyonu yoluyla hücre hasarını provoke ettiği bildirilmiştir. DFX'in, demiri bağlaması sonucunda lipid peroksidasyonunu önleyerek ferritinin toksik etkinliğini azalttığı tespit edilmiştir (130). Bizim çalışmamızda da DFX tedavisinin lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA düzeyinde NEK grubuna göre azalma sağladığı fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. NO seviyesi NEK grubuna göre DFX ve NAC+DFX grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. NO düzeyini anlamlı olarak azalttığı saptandı. CAT düzeyini NEK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artırdı. SOD düzeyi açısından istatistiksel olarak bir farklılık saptanmadı.

DFX'in demir bağlama özelliğinin yanısıra ek mekanizmalarla demirin toksik etkisini azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Messer ve arkadaşlarının ratlarda yapmış olduğu çalışmada demir şelatörü olan DFX'in demir düzenleyici genler ve proteinleri düzenlediği tespit edilmiştir ve fetal rat calvaria hücrelerindeki osteoblast fenotip markırlarını baskıladığı bildirilmiştir. Demir düzenleyici genler ve proteinler; TrfR, ferritin ağır zincir ve ferritin hafif zincirdir. Osteoblast fenotip markırları ise alkalin fosfataz, kemik sialoproteini, osteokalsindir (131).

DFX'inin damarlar üzerine vazodilatatör etkisinde de olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Xing ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada hiperglisemili ratlarda geçici fokal serebral iskemi sonrasında beyin hasarı üzerine DFX'in etkileri araştırılmıştır. Orta serebral arteri bağlayarak 24 saatlik oklüzyon sonrasında açılarak DFX etkileri araştırılmıştır. 100 mg/kg intramusküler DFX uygulanmasından sonra mortaliteyi ilk 24 saatte azalttığı bildirilmiştir. Aynı

zamanda infarkt volümünü azaltmış ve bazal ganglionlardaki ödemi hafiflettiği bildirilmiştir. DFX tedavisi verilen hayvanlarda oklüzyondan 8 saat sonra ipsilateral hemisferdeki hemoraji volümü daha azalmıştır; fakat, her iki taraf kan-beyin bariyeri permeabilitesi aynı tespit edilmiştir. Felçli hastalarda DFX'in hemorajik transformasyonu azaltmak için kullanımı potansiyel bir tedavi olacağını göstermektedir (132).

Çalışmamızda DFX tedavisi verilen grupta histopatolojik olarak belirgin düzelme sağladığı görüldü. Apoptoz açısından düzelme DFX grubunda apoptotik hücre oranının kontrol grubu, NAC ve NAC+DFX grubuna göre biraz yüksek olduğu görüldü. Fakat istatistiksel olarak NEK grubu ile arasında anlamlı farklılık saptandı. Biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda NEK grubuna göre MDA düzeylerinde azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. NEC+DFX grubu ile NEK+NAC ve NEK+NAC+DFX grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MDA düzeyini azalttığı fakat kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. NO düzeyleri açısından belirgin bir düzelme sağladığı ve istatistiksel olarak NEK grubu arasında anlamlı farklılık saptandı. CAT aktiviteleri değerlendirildiğinde belirgin artış olduğu NEK grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Diğer gruplarla anlamlı farklılık saptanmadı. SOD düzeyleri değerlendirildiğinde NEK grubu düzeylerinde olduğu ve NEK grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Sonuç olarak DFX tedavisinin histopatolojik ve apoptoz açısından düzelme sağladığı, NO ve CAT açısından istatistiksel olarak NEK grubu ile anlamlı fark saptandığı görüldü. SOD açısından NEK grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MDA düzeylerini azalttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Omar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada erişkin erkek ratlarda çekum bağlanıp perforasyon yapılarak sepsis modeli oluşturulmuştur. Sonra rat beyinlerinde serebral kortekste, hipokampüste, sitriatum ve serebellumda solunum zincir komplekslerinin aktivitelerinin azalmış olduğu bildirilmiştir. 20 mg/kg/gün dozunda NAC / DFX sc uygulanması ile bu özellikle solunum zinciri 1 ve 2 deki inhibasyonu düzelttiği görülmüştür. Fakat solunum zinciri 3 ve 4 de etkinliği olmamıştır. NAC ve

DFX'in solunum zinciri 1 ve 2 de antioksidan etkinliğini gösteren bu çalışma bizim çalışmamızdaki sonuçları desteklemektedir (133). Çalışmamızda da her iki ilacı 20 mg/kg/gün dozunda ve sc olarak kullanılmıştır. Bu iki ilacın birlikte kullanımı NEK' te ilk kez tarafımızca yapılmıştır. Bu çalışmamızda H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan rat yavrularına NAC 20 mg/kg/gün, DFX 20 mg/kg/gün, sc uygulanarak, bu ilaçların histopatolojik, apoptoz ve biyokimyasal olarak NEK'te etkinliği araştırıldı. NAC ve DFX'in birlikte kullanımının NEK'teki etkinliğini araştıran bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

NAC ve DFX tedavisinin NEK dışında başka hastalıklarda birlikte kullanılması ile ilgili literatür bilgileri mevcuttur. Bu çalışmalarda NAC ve DFX'in birlikte kullanılmasının etkili olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi olumsuz etkilerinin de olduğunu gösteren çalışmalarda vardır. Priscila ve arkadaşlarının çalışmasında renal iskemi sonrasında beyin için enerji ve hemostazın devamı için gerekli olan kreatin kinaz aktivitesi inhibe edildiği görülmüştür. Bu inhibisyon NAC ve DFX ile daha normale döndürüldüğü tesbit edilmiştir. Enzim üzerindeki etki NAC tek başına kullanıldığında ve DFX ile birlikte kullanıldığında da olmuştur. Kreatin kinazın aktivasyonunun inhibe olması beyin hücresi ölümüyle sonuçlanır ve bu üremik ensefalopatiye katkıda bulunur. Bu çalışmada NAC ve DFX kombinasyonunun ayrı ayrı kullanılanlara göre birkaç inflamatuvar hastalıkta daha elektif olduğu görülmüştür. NAC oksidatif stresi azalttığı, bunu tiol redoks durumunu artırarak yaptığı ve oksidatif metabolizmayı inhibe ederek etki ettiği gösterilmiştir. İzole NAC kullanımının prooksidan etkiler gösterdiği belirtilmiştir (93).

Bulucu ve arkadaşlarının yaptığı bir deneysel çalışmada bir nefrotik sendrom modelinde NAC ve DFX kombinasyonunun zararlı etkileri bildirilmiştir. Ratlara Doksorubisin verilerek Nefrotik sendrom oluşturulmuştur. Ayrı ayrı ve birlikte verildiğinde eritrosit ve böbrek dokusundaki oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür. Doksorubisin verilmesiyle rat böbrek dokusunda MDA artmış ve glutatasyon seviyesini azalmıştır. SOR oluşum siklusunu bozan antioksidanlar olarak NAC, DFX, antioksidatif enzimlerin metal ko faktörleri (selenyum, mangan, bakır, çinko) bildirilmiştir. NAC kullanımı sonrasında demir ile etkileşimine bağlı olarak prooksidan etkilerini önlemek için demir şelatörü DFX eklenmiştir. Her iki ilaç 20

mg/kg intravenöz uygulanmıştır. Son yayınlarda NAC ve DFX kullanımının ciddi sepsis ve akut karaciğer yetmezliğindeki ratlarda tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrı ayrı yapılan NAC ve DFX tedavilerinde SOD seviyelerinin arttığı, selenyum seviyelerinin azaldığı bildirilmiş fakat NAC+DFX tedavisi ile SOD düzeyleri azalmış, selenyum seviyeleri arttığı bildirilmiştir. Düşük seviyelerde selenyum hücre büyümesi ve biyolojik etkilerinin önemli bir modülatörüdür. Yüksek konsantrasyonda ise bu çalışmada göstermiş oldukları gibi selenit, selenyum dioksit, diselenit gibi bileşenlerin antioksidanlıktan prooksidanlığa geçtiği ve hücre büyümesi üzerine inhibe edici etki ve oksidatif strese, apoptoza öncülük eden prooksidan olarak davrandığı gösterilmiştir (134).

Çalışmamızda NAC ve DFX'in birlikte kullanılmasıyla histopatolojik ve apoptoz açısından belirgin düzelmeler görüldü. Biyokimyasal olarak MDA düzeyleri açısından bakıldığında NEK grubu ile NEK+NAC+DFX grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. MDA düzeyleri NEK grubuna göre NEK+NAC+DFX grubunda azalmıştır. Fakat değerler kontrol grubu seviyesine kadar düşmemiştir. Kontrol grubu ile istatistiksel olarak fark saptanmıştır. NEK+NAC+DFX grubu MDA düzeyleri açısından NEK+NAC grubu ve NEK+DFX grubu arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır. NO düzeyleri açısından NEK+NAC+DFX grubu ile kontrol ve NEK grubu arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmıştır. NEK+NAC grubu ve NEK+DFX grubu ile NEK+NAC+DFX grubu arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. CAT aktivitesi açısından NEK+NAC+DFX grubu ile NEK grubu arasında istatistiksel fark saptanmıştır. CAT açısından diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel fark saptanmamıştır. SOD düzeyleri açısından NEK grubuna göre NEK+NAC+DFX grubunda artış görülmüş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. NEK+DFX grubuna göre SOD düzeyleri artmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak NEK+NAC+DFX grubunda MDA ve NO düzeyleri düşmüş, CAT ve SOD düzeyleri artmıştır. Bu da çalışmamızda NAC+DFX tedavisinin NEK'te etkili olduğunu göstermektedir.

NEK'te koruma ve tedavi amacıyla bu güne kadar birçok ilaç uygulanmıştır. Antenatal steroid, sıvı kısıtlaması, Ig A, G, probiyotikler, poliansature yağ asitleri,

arjinin, glutamin ve oral antiyotikler ile yapılan çalışmalarda henüz rutinde kullanılacak kadar olumlu sonuçlar alınmamıştır (135,136). Özkan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yeni doğan rat ince barsaklarında H/R hasarına karşı Leptinin koruyucu etkisi araştırılmış ve ince barsak hasarını azaltmamış, tekrarlanan hasarlanma periyotları arasında barsakta mukozal hasarlanma periyotlarını hızlandırmadığı bildirilmiştir (81). Öztürk ve arkadaşları çalışmalarında H/R yöntemiyle NEK oluşturdukları ratlarda, *recombinant human* IL-10 gibi koruyucu ilaçlarla mukoza hasarında ve barsak doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu göstermişlerdir (7). Yurtçu ve arkadaşlarının yaptığı bir deneysel çalışmada ratlarda deneysel NEK modelinde ağızdan verilen saf immünglobulin G'nin biyokimyasal ve histopatolojik olarak intestinal hasarı azaltmadığı ve NEK'i önlemediği bildirilmiştir (137). Travadi ve arkadaşları NEK oluşturulan preterm ratlara pentoksifilin uygulaması ile NEK şiddetinin ve insidansının azaldığını göstermişlerdir (76).

Sonuç olarak, çalışmamızda yenidoğan ratlarda H/R yöntemiyle oluşturulan barsak hasarında kullanılan NAC, DFX ve NAC+DFX tedavisinin histopatolojik hasarı önlediği saptanmıştır. NAC, DFX ve NAC+DFX tedavisinin apoptozu azalttığı saptanmıştır. MDA ve NO gibi proinflamatuvar mediatörleri azalttığı ve CAT aktivitesini artırdığı, SOD düzeylerini NAC ve NAC+DFX tedavisinin arttırdığı saptanmıştır. NAC ve DFX klinikte yenidoğanlarda kullanılabilir ajanlar olması bakımından önem taşımaktadır. Bu güne kadar gerek NAC gerekse DFX yenidoğanlarda bazı hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılmış ve yenidoğanlarda kullanımı devam etmektedir. Mekonyum ileusu tedavisinde NAC kullanımı etkin bir tedavi yöntemidir (3). Litaratür bilgileri ışığında ve bizim çalışmanın sonuçlarına bakarak NEK tedavisinde NAC ve DFX tedavisinin ayrı ayrı ve birlikte kullanılması ile etkin sonuçlar alabileceğimizi düşünmekteyiz. Ancak NAC ve DFX'inin yenidoğan NEK'te etkinliğini araştırmak üzere kullanımı kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu inancındayız.

## SONUÇLAR

1. Gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel farklılık saptanmadı
2. Barsakların histopatolojik incelemesinde kontrol grubundaki ratların hepsi *grade* 1, NEK grubundaki ratlar *grade* 2-5'e olarak değerlendirildi. NEK+NAC ve NEK+DFX gruplarındaki ratlarda histopatolojik hasar skoru *grade* 1 ile *grade* 2, NEK+ NAC+ DFX grubundaki ratlarda *grade* 1 idi. NAC, DFX ve NAC + DFX'in NEK'te belirgin olarak histopatolojik iyileşme sağladığı saptandı.
3. Apoptoz değerlendirildiğinde NEK grubunda apoptozun yüksek olduğu görüldü. Kontrol, NAC, DFX ve NAC +DFX tedavi grubunda apoptoz değerleri düşük değerde olduğu saptandı. DFX grubunda diğer tedavi gruplarına göre yüksek saptandı. Fakat NEK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı.
4. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyi NEK grubunda en yüksek, kontrol grubunda en düşük bulundu. NAC, DFX grubu ve NAC + DFX tedavisinin barsak MDA düzeyini NEK grubuna göre belirgin azalttığı saptandı.
5. NEK patogenezinde önemli bir meditör olan NO'nun barsak doku düzeyi, NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulundu. NAC, DFX ve NAC + DFX tedavisinin barsak NO düzeyini NEK grubuna göre anlamlı azalttığı saptandı.
6. Antioksidan enzim olan CAT enzim aktivitesi NEK grubunda en düşük seviye saptandı. NAC, DFX ve NAC + DFX grubunda CAT aktivitesinin anlamlı arttığı saptandı. Bu artış kontrol grubundan daha yüksekti.
7. SOD düzeyi NEK grubunda düşük seviyede tesbit edildi. DFX tedavisinin SOD düzeyini daha da düşürdüğü saptandı. NAC ve NAC +DFX tedavisi ile SOD düzeyi yükseldi fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. DFX tedavi grubu ile NAC ve NAC +DFX tedavi grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık DFX grubunda SOD değerinin düşük tesbit edilmesinden idi.

**8.** Bu sonuçlarla, NAC, DFX ve NAC + DFX tedavisinin H/R yöntemiyle oluşturulan barsak hasarında histopatolojik ve biyokimyasal olarak etkili olduğu saptandı.

## ÖZET

Desferoksamin ve N-asetil sisteinin; nekrotizan enterokolit oluşturulmuş ratlarda histopatolojiye, oksidatif stres ve apoptoza etkileri.

Dr. Şenol Bağcı

Nekrotizan enterokolit (NEK), patogenezi tam bilinmeyen, prematürelerin acil gastrointestinal bir hastalığıdır. Formula ile beslenme, bakteriyel kolonizasyon, hipoksi ve intestinal iskemi NEK için risk faktörleridir. Deneysel çalışmalarda hipoksi ve intestinal iskeminin NEK'te kritik başlangıç faktör olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, yenidoğan ratlarda hipoksi/reoksijenizasyon (H/RO) yöntemiyle oluşturulan intestinal hasarda desferoksaminin (DFX) ve N-asetil sisteinin (NAC), histopatolojik, biyokimyasal ve apoptoza etkileri araştırıldı.

Bir günlük, 50 adet *Wistar* albino cinsi rat yavruları randomize olarak kontrol, NEK, NEK+NAC, NEK+DFX ve NEK+NAC+DFX olarak beş gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki rat yavruları 24. saatte hava geçirmez kapalı bir ortamda 10 dakika süreyle %100 CO<sub>2</sub> solutularak hipoksiye sokuldu; hemen ardından 10 dakika süreyle %100 O<sub>2</sub> solutularak reoksijenizasyon uygulandı. H/RO'dan sonra üç gün süreyle NAC (20 mg/kg) ve DFX (20 mg/kg) subkutan olarak uygulandı. Kontrol ve NEK gruplarına ilaç uygulanmadı. Anne sütüyle beslenen yavru ratlar günlük tartıldı. Dördüncü günde (96. saat) tüm ratlar servikal dislokasyonla dekapite edildi. Terminal ileumdan alınan barsak doku örneklerinde histopatolojik hasar skoru (HHS), apoptoz, malonildialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri araştırıldı.

Grupların vücut ağırlığı bakımından istatistiksel farklılık saptanmadı. En ağır hasarın NEK grubunda olduğu, NAC, DFX ve NAC+ DFX'in histopatolojik hasar skorunu belirgin azalttığı saptandı (  $p<0.05$ ). Ayrıca MDA düzeyi en yüksek NEK grubunda olduğu tedavi gruplarından DFX ve NAC+DFX grubunda anlamlı olarak azaldığı saptandı. ( $p<0.05$ ). NO düzeyinin en yüksek NEK grubunda olduğu NAC, DFX, NAC+DFX grubunda anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ). CAT aktivitesi NEK grubunda en düşük NAC, DFX, NAC+DFX grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). SOD aktivitesi NEK grubunda düşük bulundu.



Kontrol grubu ve NAC+DFX ile istatistiksel anlamlılık saptandı. Apoptoz NEK grubunda yüksek ve tedavi NAC, DFX ve NAC+DFX grubunda düşük bulundu.

Sonuç olarak, yenidoğan ratlarda H/R yöntemiyle oluşturulan barsak hasarında NAC ve DFX'in histopatolojik hasarı her ikisinin tek tek kullanımında ve birlikte kullanımında azaldığı tesbit edildi. MDA ve NO düzeylerini azalttığı, antioksidan enzimlerden CAT ve SOD'u artırdığı ve apoptozu azalttığı gösterildi.

## SUMMARY

The effects of Desferrioxamine and N-acetylcysteine on histopathological alterations and oxidative stress and apoptosis of rats with necrotizing enterocolitis.

Dr. Şenol Bağcı

Necrotizing enterocolitis (NEC), is an emergency gastrointestinal disease of the premature infants with unknown pathogenesis. Formula feeding, bacterial colonization, intestinal ischemia and hypoxia are risk factors of NEC. In experimental studies, intestinal ischemia and hypoxia are critical starting factor of NEC. In this study, the histopathologic and biochemical effects of Desferrioxamine (DFX), and N-acetylcysteine (NAC) were investigated in newborn rats with hypoxia/reoxygenation (H/RO) induced intestinal injury.

One day old, 50 *Wistar* albino rat pups were randomly divided into five groups as control, NEC, NEC+NAC, NEC+DFX and NEC+ NAC+DFX. All rat pups except for control group were placed into a chamber of 100% CO<sub>2</sub> for ten minutes, then they were reoxygenized with 100% O<sub>2</sub> for the next ten minutes at 24<sup>th</sup> hour. After H/RO, NAC (20 mg/kg) and DFX (20 mg/kg) were administered subcutaneously for the next three days. Control and NEC groups were not administered any drugs. Rat pups fed with breast milk were weighted daily. On the fourth day (at 96<sup>th</sup> hour), all rat pups were killed with servical dislocation after intramuscular ketamine (90 mg/kg) enjection. Histopathologic injury scores (HIS), apoptosis, malonyldialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were investigated at intestinal tissue samples extracted from terminal ileum.

There was no statistically significant difference between groups' body weight. It was found that NEC group had the worst HIS, NAC and DFX reduced HIS significantly ( $p<0.05$ ). We also found that, MDA levels were highest in the NEC group and MDA levels were found to be decreased significantly in DFX and NAC+DFX group ( $P<0.05$ ). NO levels were highest in NEC group and NO levels were recorded to be decreased significantly in NAC, DFX and NAC+DFX group

( $p < 0.05$ ). CAT activity was found to be lowest in NEC group and CAT activity was found to be increased in NAC, DFX and NAC+DFX group ( $p < 0.05$ ). SOD activity was found to be low in the NEC group, were found statistically meaningfully with control group. Apoptosis were found high in NEC group and low in NAC, DFX and the NAC+DFX group.

As a result, it was shown that either NAC+DFX or NAC/DFX use decreased histopathological injury in newborn rats with H/R induced intestinal injury. It was shown that both NAC and DFX use decreased MDA and NO levels, increased the antioxidant enzymes CAT and SOD. It was also shown that NAC, NAC and NAC+DFX use decreased apoptosis.

## KAYNAKLAR

1. Oldham KT, Colombani PM, Foglia RP, Skinner MA. Principles and Practice of Pediatric Surgery. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005: 1251-1262.
2. O'Neill JA, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG, Coldamane AA. Principles of Pediatric Surgery, 2nd edition St Louis: Mosby Elsevier, 2004: 509-526.
3. Caplan M. Neonatal necrotizing enterocolitis. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh M, editors. Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine Diseases of the Fetus and Infant. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006: 1403-1417.
4. Chokshi NK, Guner YS, Hunter CJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. Semin Perinatol 2008; 32: 92-99.
5. Ozkan KU, Ozokutan BH, Inanç F, Boran C, Kiliç M. Does maternal nicotine exposure during gestation increase the injury severity of small intestine in the newborn rats subjected to experimental necrotizing enterocolitis. J Ped Surg 2005; 40: 484-488.
6. Cadir FO, Bicakci U, Tander B, Kilicoglu-Aydin B, Rizalar R, Ariturk E, et al. Protective effects of vitamin E and omeprazole on the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. Pediatr Surg Int 2008; 24: 809-813.
7. Oztürk H, Dokucu AI, Ogun 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.

- 8.** Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003;.6: 6-23.
- 9.** Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13: 147-153.
- 10.** Hershko C. Role of iron chelation therapy in thalassemia major. *Turk J Haematol* 2002; 19: 121-126.
- 11.** Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmed M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 6-20.
- 12.** Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green C, Motterlini R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem. J* 1999; 339: 729-736.
- 13.** Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *TAP* 1999; 154: 256-263.
- 14.** Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 409-432
- 15.** Kim SS, Albanese CT. Necrotizing Enterocolitis. In:Grosfeld JL, O'Neill JA, Coran AG, Fonkalsrud EW, eds. *Pediatric Surgery*, 6th Ed. Philadelphia: Mosby Elsevier;2006. p: 1427-1452.
- 16.** Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal enterocolitis: Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978; 187: 1-7.

17. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: Treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986; 33: 179-201.
18. Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ, Glass RI. The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States. *Am J Public Health* 1987; 87: 2026-2031.
19. Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 1995; 4: 200-206.
20. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006; 368: 1271-1283.
21. Schnabl KL, Van Aerde JE, Thomson AB, Clandinin MT. Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2142-2161.
22. Boccia D, Stolfi I, Lana S, Moro ML. Nosocomial necrotising enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 385–391.
23. Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol* 2008; 32: 70-82.
24. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Koroos SB, Papile LA, Stoll BJ, et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. *Pediatrics* 2001; 107 (1) p.e.1
25. Wiswell TE, Robertson CF, Jones TA, Tuttle DJ. Necrotizing enterocolitis in full-term infants. A case-control study. *Am J Dis Child* 1988; 142: 532-535.
26. Yurdakök M. What next in necrotizing enterocolitis? *Turk J Pediatr* 2008; 50: 1-11.

27. Hutter JJ Jr, Hathaway WE, Wayne ER. Hematologic abnormalities in severe neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1976; 88: 1026-1031.
28. Stoll BJ, Kleigman RM. Necrotizing enterocolitis. *Clinics in Perinatology* 1994; 21: 205-457.
29. Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1028-1034.
30. Berseth CL. Gestational evolution of small intestine motility in preterm and term infants. *J Pediatr* 1989; 115: 646-651.
31. Berseth CL, McCoy HH. Birth asphyxia alters neonatal intestinal motility in term neonates. *Pediatrics* 1992; 90: 669-673.
32. Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: S3-S6.
33. Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol* 1999; 277: 351-358.
34. Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 147–151.
35. Lencer WI, Cheung G, Strohmeier GR, Currie MG, Ouellette AJ, Selsted ME, et al. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptdins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8585–8589.
36. Hsueh W, Caplan MS, Tan X, MacKendrick W, Crussi FG. Necrotizing enterocolitis of the newborn: Pathogenic concepts in perspective. *PDP* 1998; 1: 2-16.

- 37.** Crissinger KD, Granger DN. Mucosal injury induced by ischemia and reperfusion in the piglet intestine: Influences of age and feeding. *Gastroenteroloji* 1989; 97: 920-926.
- 38.** Crissinger KD, Grisham MB, Granger DN. Developmental biology of oxidant-producing enzymes and antioxidants in the piglet intestine. *Pediatr Res* 1989; 25: 612-616.
- 39.** Cumar V, Cotran RS, Robbins SL. Apoptosis. *Robbins Pathologic Basis of disease*, 6th ed. 1999: 19-25.
- 40.** Eibl MM, Wolf HM, Furnkranz H. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth weight infants by IgA-IgG feeding. *N Eng J Med* 1988; 319: 1-8.
- 41.** Karna P, Senagore A, Chou CC. Comparison of the effect of asphyxia, hypoxia and acidosis on the intestinal blood flow and oxygen uptake in newborn piglets. *Pediatr Res* 1986; 20: 929-932.
- 42.** Kılınç T, Kılınç A. Oksijen toksitesinin aracı moleküller olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33: 110-118.
- 43.** Delibaş N, Özcankaya R. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 1995; 2: 11-17
- 44.** 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.
- 45.** MacKendrick W, Hill N, Hsueh W, Caplan M. Increase in plasma platelet-activating factor levels in enterally fed preterm infants. *Biol Neonate* 1993; 64: 89-95.



46. Amer MD, Hedlund E, Rochester J, Caplan MS. Platelet-activating factor concentration in the stool of human newborn: effect of enteral feeding and neonatal necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate* 2004; 85: 159-166.
47. Gibbs K, Lin J, Holzman IR. Necrotizing enterocolitis: the state of the science. *Indian J Pediatr* 2007; 74: 67-72.
48. Caplan MS, MacKendrick W. Inflammatory mediators and intestinal injury. *Clin Perinatol* 1994; 21: 235-246.
49. Harris MC, Costarino AT, Sullivan S: Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1994; 124: 105-111.
50. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S: Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999; 116: 960-964.
51. Akisü 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.
52. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424.
53. Cueva JP, Hseueh W. Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 1988; 29: 1207-1212.
54. Markel TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Pitcher J, Tsai BM, Meldrum DR. Cytokines in necrotizing enterocolitis. *Shock* 2006; 25: 329-337.
55. Qu XW, Rozenfeld RA, Huang W, Bulkley GB, Hsueh W. The role of xanthine oxidase in platelet activating factor induced intestinal injury in the rat. *Gut* 1999; 44: 203-211.

- 56.** Sun XM, Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1988; 81: 1328-1331.
- 57.** Ewer AK, Al-Salti W, Coney AM, Marshall JM, Ramani P, Booth IW. The role of platelet activating factor in a neonatal piglet model of necrotising enterocolitis. *Gut* 2004; 53: 207–213.
- 58.** Hsueh W, Gonzalez-Crussi F, Arroyave JL. Platelet-activating factor: an endogenous mediator for bowel necrosis in endotoxemia. *FASEB J* 1987; 1: 403-405.
- 59.** Hsueh W, Gonzalez-Crussi F, Arroyave JL. Platelet-activating factor-induced ischemic bowel necrosis. An investigation of secondary mediators in its pathogenesis. *Am J Pathol* 1986; 122: 231-239.
- 60.** Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis the role of platelet-activating factor and endotoxin. *Am J Pathol* 1983; 112: 127-135.
- 61.** Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Lickerman M, Hsueh W. The platelet-activating factor receptor antagonist WEB 2170 prevents neonatal necrotizing enterocolitis in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 296-301.
- 62.** Wang H, Tan X, Chaug H, Gonzalez-Crussi F, Remick DG, Hsueh W. Regulation of platelet activating factor receptor gene expression in vivo by endotoxin, platelet activating factor, and endogenous tumor necrosis factor. *Biochem J* 1997; 322: 603-608.
- 63.** Caplan MS, Lickerman M, Adler L, Dietsch GN, Yu A. The role of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 1997; 42: 779-783.

64. Caplan M, Hsueh W, Kelly A, Donovan M. Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins* 1990; 39: 705-714.
65. Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxy-nitrite in gut barrier failure. *World J Surg* 2002; 26: 806-811.
66. Nankervis CA, Giannone PJ, Reber KM. The neonatal intestinal vasculature: contributing factors to necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008; 32: 83-91.
67. Potoka DA, Upperman JS, Zhang XR, Kaplan JR, Corey SJ, Grishin A, et al. Peroxynitrite inhibits enterocyte proliferation and modulates Src kinase activity in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: 861-869.
68. Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T. Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the preterm newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 544-548.
69. Henry MC, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2004; 28: 221-233.
70. Okur H, Küçükaydin M, Köse K, Konaş O, Doğam P, Kazez A. Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1416-1419
71. Biçakçı Ü, Tander B, Aritürk E, Aydın BK, Aydın O, Rizalar R, et al. Effects of omeprazole and gentamicin on the biochemical and histopathological alterations of the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 800-805.
72. Igor S, Nadav S, Rachel K, Ron S, Coran A, Lurie M, Shiloni E, Mogilner J.G. Bombesin stimulates enterocyte turnover following massive small bowel resection in a rat. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 397-404.

73. 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.
74. Şener G, Şatıroğlu H, Şehirli AÖ, Kaçmaz A. Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in rat model of thermal injury. *Life Sciences* 2003; 73: 81-91.
75. Şener G, Akgün Ü, Şatıroğlu H, Topaloğlu Ü, Uysal MK. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *FCP* 2001; 15: 19-22.
76. 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.
77. Frost BL, Jilling T, Caplan MS. The importance of pro-inflammatory signaling in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008; 32: 100-106.
78. Pender SL, Braegger C, Gunther U, Monteleone G, Meuli M, Schuppan D, et al. Matrix metalloproteinases in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2003; 54: 160-164.
79. Caplan MS, Sun XM, Hseuh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990; 116: 960-964.
80. Goepfert AR, Andrews WW, Waldemar C, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL, et al. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1375-1381.

- 81.** Özkan KU, İnanç F, Kılınç M, Boran Ç. Leptin tedavisi yenidoğan rat incebarsağında hipoksi/reoksijenaasyon hasarına karşı koruyucudur? Fırat Tıp Dergisi 2005; 10(1): 5-9.
- 82.** Kleigman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis. N Eng J Med 1984; 310: 1093-1112.
- 83.** Dimmit RA, Lawrance R. Clinical management of necrotizing enterocolitis. American Academy of Pediatrics 2001; 2: 110-117.
- 84.** Park YY. Ischemia /reperfusion lung injury increases serum ferritin and heme oxygenase-1 in rats. Korean JPP 2009; 13: 181-7.
- 85.** Varga J, Stasko P, Toth S, Pristasova Z, Jonecova Z, Vesela J, PomFy M. Morphological and apoptotic changes in the intestinalmucosa and lung paranchyma after ischaemic/reperfusion injury of the jejunum. Acta Vet Hung. 2010; 58: 243-56.
- 86.** St Peter SD, Ostile DJ. Necrotizing enterocolitis. In: Ashcraft KW, Holcomb III GW, Murphy JP, eds. Pediatric Surgery. 4th ed. Elsevier Saunders; 2005.p.461-76.
- 87.** Lugo B, Ford HR, Grishin A. Molecular signaling in necrotizing enterocolitis: regulation of intestinal COX-2 expression. J Pediatr Surg 2007; 42: 1165-71.
- 88.** Moss RL, Dimmitt RA, Barnhart DC, Sylvester KG, Brown RL, Powell DM, et al. Laparotomy versus peritoneal drainage for necrotizing enterocolitis and perforation. N Engl J Med 2006; 354: 2225-2234.
- 89.** Tepas III J.J, Sharma R, Leaphart L. C, Celso G. Brian, Pieper P. Timing of surgical intervention in necrotizing enterocolitis can be determined by trajectory of metabolic derangement. JPS 2010 ; 45: 310-314.
- 90.** Blakely ML, Lally KP, McDonald S, Brown RL, Barnhart DC, Ricketts RR, et al. Postoperative outcomes of extremely low birth-weight infants with necrotizing

enterocolitis or isolated intestinal perforation: a prospective cohort study by the NICHD Neonatal Research Network. *Ann Surg* 2005; 241: 984–994.

**91.** Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *J Am Med Assoc* 2004; 292: 2357-2365.

**92.** Sreenan C, Idiko HA, Osiovič H. Successful chelation therapy in a case of neonatal iron overload following intravascular intrauterine transfusion. *J Perinatol* 2000; 20: 509-12.

**93.** Priscila BDP, Marcia LD, Giselli S, Marcio B, Larissa C, Machado R, Felipe DP, Emilio LS. Inhibition of brain creatine kinase activity after renal ischemia is attenuated by N-acetylcysteine and desferoxamine administration. *NL* 2008; 434: 139-143.

**94.** Sorond FA, Shaffer ML, Kung L, Lipsitz LA. Desferoxamine infusion increases cerebral blood flow: a potential association with hypoxia-inducible factor-1. *CS* 2009; 116: 771-779.

**95.** Jones AL. Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1998; 36: 277-285.

**96.** Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358

**97.** Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Academic, New York: 1974: 673-677.

**98.** Navarro-Gonzalves JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44: 679-681.

- 99.** Yi Sun, Lary W. Obertley, Ying Li. A simple method for clinical of superoxide dismutase. *Clin. Chem* 1988; 34/3: 497-500 .
- 100.** Caplan MS, Jilling T. New concepts in necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13: 111-115.
- 101.** Holman RC. Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979-85. *Am J Public Health* 1989; 79: 987-989.
- 102.** Chen J, Li B, Ran PX. N-acetyl-L-cysteine inhibits adenoviral E1A-involved transactivation of nuclear factor-kappaB in rat alveolar epithelial cells. *Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi*. 2010 Jan 33: 51-55
- 103.** Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regul Pept* 2003; 116: 53-60.
- 104.** Luig M, Lui K. Epidemiology of necrotizing enterocolitis Part II: Risks and susceptibility of premature infants during the surfactant era: a regional study. *J Paediatr Child Health* 2005;41: 174–179.
- 105.** Clark DA, Fornabaio DM, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Miller MJ. Contribution of oxygen-derived free radicals to experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Pathol* 1988; 130: 537-542.
- 106.** 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.
- 107.** Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Hsueh W. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Pathol* 1994; 14: 1017-1028.

- 108.** Sandoval M, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJ. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: attenuation by L-ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 489-495.
- 109.** Zamora R, Bryan NS, Boyle P, Wong C, Milsom AB, Jaffe R, et al. Nitrosative stress in an animal model of necrotizing enterocolitis. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1428-1437.
- 110.** Nycyk JA, Drury JA, Cooke RW. Breath pentane as a marker for lipid peroxidation and adverse outcome in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 79: F67-69.
- 111.** Wang X, Svedin P, Nie C, Lapatto R, Zhu C, Gustavsson M, Sandberg M, Karlsson JO, Romero R, Hagberg H, Mallard C. N-acetylcysteine reduces lipopolysaccharide- sensitized hypoxic-ischemic brain injury *Ann Neural* 2007;61: 263-271.
- 112.** Stephan R, David E. N-acetylcysteine protect striated muscle in a model of Compartment Syndrome. *Clin Orthop Relat Res.* 1999-2010; 1287: 7
- 113.** By Katarzyna BO; Katarzyna SM, Marcin K, Janusz B. The evaluation of the Protective action of antioxidants on small intestine of rabbits experimentally injured by ischemia and reperfusion. *JPS* 2004; 39: 1226-1229.
- 114.** Wang Y, Zhang ZZ, Chen SO, Zou ZD, Tu XH, Wang L. Proctive effect of N-acetylcysteine on the intestinal barrier dysfunction after radiation injury in rats. *Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi.* 2010 May 13: 219-222.
- 115.** Meirelles Junior R, Kubrusly MS, Bellodi-Privato M, Molan NAT, Machado MCC, D'Albuquerque LAC. Benefical effect of n-acetyl cysteine on pancreas and kidney following experimental pancreatic ischemic-reperfusion in rat. 2010; 65: 311-316.



- 116.** Mehrpour O, Shadnia S, Sanaei-Zadeh H. Late extensive intervenous administration of N- acetylcysteine can reverse hepatic failure in acetaminophen overdose. *Hum Exp toxicol.* 2010 Mar 23.
- 117.** El-Sayed ME, Abdel Aziz H, Gouda KH, Samira S, Ahmed SS. Protective affect of N-acetylcysteine against carmustine- induced myelotoxicity in rats. 2010;5.
- 118.** Sarikaya S, Karcioğlu O, Ay D, Cetin A, Aktac C, Serinken M. Acute mercury poisoning:a case report. *BMC Emergency Medicine.* 2010;10: 7.
- 119 .** Satpute RM, Hariharakrishnan J, Bhattacharya R. Effect of alpha-ketoglutarate and N-acetylcysteine on cyanide-induced oxidative stres mediated cell death in PC12 cells. *TIH* 2010: 1-12.
- 120.** Soghier LM, Brion LP. Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supplementttation in parenterally fed neonates. *Cochrane detabase syst Rev.* 2006 Oct 18; 4.
- 121.** Prasad A, Banakal S, Muralidhar K. N-acetylcysteine does not prevent renal dysfunction after off-pump coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol.* 2010; 17.
- 122.** Koivusalo A, Kauppinen H, Anttilla A, Rautelin H, Jusufovic J, Lindahl H, Rintala R. Intraluminal casein model of necrotizing enterocolitis for assessment of mucosal destruction, bacterial translocation, and the effects of allopurinol and N-acetylcysteine. *Pediatr Surg Int* 2002; 18: 712-717.
- 123.** Ocal K, Avlan D, Cinel I, Unlu A, Ozturk C, Yaylak F, Dirlik M, Camdeviren H, Aydın S. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stres in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *SDB* 2004; 30: 778-784.
- 124.** Magdalan J, Piotowska A, Gomulkiewicz A, Sozanski T, Podhorska M, Szelag A, Dziegiel P. Benzylpenicyllin and Acetylcysteine protection from alfa-amanitin-

induced apoptosis in human hepatocyte cultures. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2010.

**125.** Signorini C, Ciccoli L, Leoncini S, Carloni S, Perrone S, Comparti M, Balduini W, Bounocore G. Free iron, total F2- isoprostanes and total F4-neuroprostanes in a model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: neuroprotective effect of melatonin. *JPR* 2009; 46: 148-154.

**126.** Joseph L, Lelli Jr, Pradhan S, Mason Cobb L. Prevention of postischemic injury in immature intestine by deferoxamine. *JSR* 1993; 54: 34-38.

**127.** Box AH, Yuen C, Ponjevic D, Fick GH, Demetrick DJ. Signaling and apoptosis differences between severe hypoxia and desferoxamine treatment of human epithelial cells. *Biochem Cell Biol*. 2008; 86: 425-36.

**128.** Sadık N, Manal FI, Shaheem A. Effect of probucal and desferoxamine against adriamycin toxicity in cardiac and renal tissues of rats. *IJBB* 2008; 45: 44-50.

**129.** Weitzman SA, Weitberg AB. Asbestos-catalysed lipid peroxidation and its inhibition desferoxamine. *BBJ* 1985; 225: 259-262.

**130.** Bresgen N, Jaksch H, Lacher H, Ohlenschlager I, Uchida K, Eckl P.M. Iron-mediated oxidized oxidative stress plays an essential role in ferritin-induced cell death. *Free Radical Biology and medicine* 2010; 11.

**131.** Messer JG, Cooney PT, Kipp DE. Iron chelator deferoxamine alters iron-regulatory genes and proteins and suppresses osteoblast phenotype in fetal rat calvaria cells. Contents lists available at Science Direct *Bone* 2010; 46: 1408-1415.

**132.** Xing Y, Hua Y, Keep R, Xi G. Effects of desferoxamine on brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats with hyperglycemia. *BR* 2009; 291: 113-121.

- 133.** Omar J, Cassol Jr, Gislaine TR, Fabricia CP. Effects of N-Acetylcysteine/Deferoxamine, Taurine and RC-3095 on respiratory chain complexes and creatine kinase activities in rat brain after sepsis. *Neurochem Res* 2010; 35: 515-521.
- 134.** Bulucu F, Oktenli C, Kenar L, Koc B, Ocal R, Karadurmuş N, Inal V, Yamanel Y. Detrimental effect of N-acetylcysteine plus desferoxamine combination in an experimental nephrotic syndrome model. *IJT* 2007; 26: 525-532.
- 135.** Rober KM, Nankervis CA. Necrotizing enterocolitis: preventative strategies. *Clin Perinatol* 2004; 3: 157-167.
- 136.** Jane S, Richard A. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *SN* 2003; 8: 449-459.
- 137.** Yurtçu M, Aydoğdu B, Toy H, Gürbilek M, Günel E. Deneysel nekrotizan enterokolit modelinde ağızdan verilen immünglobilin G'nin etkisi *ÇCD* 2008; 22: 52-57.