

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

HİPOKSİ-REOKSİJENİZASYON YÖNTEMİYLE
BARSAK HASARI OLUŞTURULAN RATLARDA
KARNOZİN, GİNKGO ALKALOİDİ VE
KLARİTROMİSİNİN HİSTOPATOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLERE VE OKSİDATİF STRESE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ABDULLAH KARACA

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. HACER ERGİN

DENİZLİ-2010

Prof. Dr. Hacer ERGİN danışmanlığında Dr. Abdullah KARACA tarafından yapılan “**Hipoksi-Reoksijenizasyon Yöntemiyle Barsak Hasarı Oluşturulan Ratlarda Karnizin, Ginkgo Alkaloidi ve Klaritromisin'in Histopatolojik Değişikliklere ve Oksidatif Strese Etkileri**” konulu tezi jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.


Başkan : Prof. Dr. Serap SEMİZ

Üye : Prof. Dr. Hacer ERGİN

Üye : Prof. Dr. İlknur KILIÇ

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

30/03/2010


Prof. Dr. Zafer AYBEK
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimleriyle beni yetiştiren, ayrıca tezimin planlanması ve yürütülmesi sırasında bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Hacer ERGİN'e, ihtisasım süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve eğitimimde emeği geçen başta Anabilim Dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Serap SEMİZ ve diğer öğretim üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. İlknur KILIÇ, Prof. Dr. Aziz POLAT, Doç. Dr. Dolunay GÜRSES, Doç. Dr. Ahmet AKÇAY, Yrd. Doç. Dr. Mine CİNBIŐ, Yrd. Doç. Dr. Selçuk YÜKSEL, Uz. Dr. Özmert ÖZDEMİR, Uz. Dr. Yasemin IŞIK BALCI, Uz. Dr. Mehmet AKIN'a, tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY, Yrd. Doç. Dr Nilay ŐEN TÜRK, Vet. Hek. Barbaros ŐAHİN'e,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tanışmaktan onur duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, sağlık hizmetinin işleyişinde vazgeçilmez rol oynayan hemşire arkadaşlarıma ve sağlık personeline,

Bugünlere gelmemde hiçbir fedakarlığı esirgemeyen annem ve babama, eğitimim süresince gösterdiği özveri ve verdiği desteklerinden dolayı eşime, neşe kaynağım çocuklarım Eren ve Efla'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Abdullah KARACA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
NEKROTİZAN ENTEROKOLİT	3
SEMPTOMLAR VE KLİNİK BULGULAR	4
TEDAVİ	5
PATOGENEZ	6
İmmatür İntestinal Motilite, Sindirim ve Bariyer	
Fonksiyonu	7
Enteral Beslenme	8
Anormal Bakteriyel Kolonizasyon	8
İntestinal Hipoksi-iskemi	10
Nekrotizan Enterokolitte İnflamatuvar Mediatörler	11
KARNOZİN VE ETKİLERİ	15
GİNKGO BİLOBA EKSTRESİ VE ETKİLERİ	16
KLARİTROMİSİN VE ETKİLERİ	17
GEREÇ VE YÖNTEM	19
Çalışma Grupları	19
Hipoksi/Reoksijenizasyon Yöntemi ile NEK Modeli	
Oluşturma	20
Histopatolojik Değerlendirme	21
Biyokimyasal Değerlendirme	21
Dokuların Homojenizasyonu	22
Malonildialdehit Ölçümü	22
Nitrik Oksit Ölçümü	22

İnterlökin-6 Ölçümü	22
Tümör Nekrozis Faktör-α Ölçümü	23
İnterlökin-10 Ölçümü	23
Glutasyon Düzeyi, Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz, Katalaz Aktivite Ölçümü.....	23
İstatistiksel Analizler.....	24
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA.....	32
SONUÇLAR.....	46
ÖZET.....	48
YABANCI DİL ÖZETİ.....	50
KAYNAKLAR.....	52

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Sayfa No

Şekil-1	Nekrotizan enterokolit patogenezinin akış şeması.....	15
Şekil-2	Hava geçirmez kapalı ortamda hipoksi-reoksijenizasyon yönteminin uygulanışı.....	20
Şekil-3	Karbondioksit uygulamasından sonra rat yavrularının görünümü.....	20
Şekil-4	Terminal ileumdan doku örneği alınması.....	21
Şekil-5	Grup I ve Grup II deki ratların barsaklarının makroskopik görünümü.....	26
Şekil-6	Gruplardaki ratların histopatolojik skora göre dağılımı...	26
Şekil-7	Normal histoloji, <i>grade</i> 1 Grup I	27
Şekil 8	Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, <i>grade</i> 2 A: GrupIII, B: Grup IV	27
Şekil 9	Villus epitel hücre nekrozu, <i>grade</i> 3 A: Grup II, B:Grup V	27

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo-1	Nekrotizan enterokolitte modifiye Bell evrelemesi..... 5
Tablo-2	Gruplardaki rat yavrularının birinci, ikinci ve üçüncü gün ortanca vücut ağırlıkları ve dağılımı 25
Tablo-3	Gruplara göre rat barsaklarının histopatolojik değerlendirme (<i>grade</i>) skorları 28
Tablo-4	Grupların barsak doku (yaş doku başına) malonildialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) düzeyleri 30
Tablo-5	Grupların barsak doku (yaş doku başına) interlökin-10 (IL-10), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon peroksidaz (GR), katalaz (CAT) enzim aktiviteleri..... 31

KISALTMALAR

CAT	:	Katalaz
cGMP	:	Siklik guanozin monofosfat
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	:	Etilendiamin tetra asetik asit
eNOS	:	Endotelial nitrik oksit sentaz
GGK	:	Gaytada gizli kan
GİS	:	Gastrointestinal sistem
GR	:	Glutatyon redüktaz
GSH	:	Redükte glutatyon
GSH-Px	:	Glutatyon peroksidaz
GSSG	:	Okside glutatyon
H&E	:	Hemotoksilen-eosin
HHS	:	Histopatolojik hasar skoru
HIS	:	<i>Histopathologic injury score</i>
H/RO	:	Hipoksi-reoksijenizasyon
IL-1	:	İnterlökin-1
IL-6	:	İnterlökin-6
IL-8	:	İnterlökin-8
IL-10	:	İnterlökin-10
IL-18	:	İnterlökin-18
iNOS	:	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
ip	:	İntraperitoneal
LPS	:	Lipopolisakkarit
MDA	:	Malonildialdehit
NADP	:	Nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
NADPH	:	İndirgenmiş nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat

NEK	:	Nekrotizan enterokolit
NF-κB	:	<i>Nuclear factor-kappaB</i>
N/G	:	Nazogastrik
nNOS	:	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
PAF	:	<i>Platelet activating factor</i>
PAF-AH	:	<i>Platellet activating</i> faktör- asetil hidrolaz
PMSF	:	Fenilmetilsülfonil florür
PNL	:	Polimorfonükleer lökosit
RNA	:	Ribonükleik asit
SPSS	:	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TBA	:	<i>Thiobarbituric acid</i>
TLR	:	<i>Toll like</i> reseptör
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör alfa
YYBÜ	:	Yenidoğan yoğun bakım ünitesi

GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit, özellikle prematüre yenidoğanlarda görülen, en sık acil cerrahi müdahale gerektiren gastrointestinal sistem hastalığıdır (1). Sürfaktanın kullanıma girmesi respiratuvar distres sendromundan ölümleri azalttığından, güncel kanı, prematüre yenidoğanların ana ölüm nedeninin nekrotizan enterokolit olacağı yönündedir (2). Patogenezinin tam olarak aydınlatılamaması nedeniyle, 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.

Deneysel çalışmalarda, hipoksi-reoksijenizasyon sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin intestinal doku hasarlanmasına yol açtığı gösterilmiştir (3-8). Hasarlanmış mukozaya mikroorganizmanın bağlanması sonucu tümör nekrozis faktör-alfa, *platelet activating* faktör, nitrik oksit, interlökin-6 gibi birçok proinflamatuvar mediatörler açığa çıkmakta ve mukozal hasarlanma daha da artarak nekroz oluşmaktadır. (9). Antioksidan sistemler, serbest oksijen radikalleri ile ilişkili doku hasarında serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak koruyucu etki göstermektedir. Glutatyon metabolizması antioksidatif defans sisteminin en önemlilerinden birisidir (10). Yine antioksidan bir enzim olan katalaz hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalayarak zararlı etkilerden korur. Term bebeklere göre prematüre yenidoğanların, antioksidan defans sistemleri yetersiz olup; oksidatif strese karşı oldukça hassastırlar

Karnozin, hidroksil ve süperoksit radikallerini temizleyen (*scavenger*), *singlet* moleküler oksijeni inaktive eden (*quencher*) ve serbest oksijen radikallerinin üretilmesinde rol alan demir, bakır gibi geçiş metalleri ile kompleks oluşturarak güçlü antioksidan aktivite gösteren doğal bir dipeptiddir (11-14).

Gingko alkaloidi, antioksidan ve *platelet activating* faktör antagonisti etkilere sahip bitkisel bir ekstretdir. Serbest oksijen radikalleri için *scavenger* görevi yaptığı

(15-17), süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri arttırdığı, malonildialdehit ve nitrik oksit oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (15,18-21).

Klaritromisin, antibakteriyel etkinliğinin yanı sıra antiinflamatuvar etkinliğe de sahip makrolid grubu bir antibiyotiktir. Çalışmalarda tümör nekrozis faktör-alfa, nitrik oksit, interlökin-6, interlökin-8, interlökin-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin yapımını baskıladığı, inflamasyon alanına nötrofil göçünü engellediği gösterilmiştir (22,23).

Bu çalışmada, hipoksi-reoksijenizasyon modeli ile intestinal hasar oluşturulan *Wistar* Albino cinsi preterm ratlarda, hipoksi/reoksijenizasyondan sonra uygulanan karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin intestinal hasar oluşumundaki histopatolojik etkileri ile proinflamatuvar, antiinflamatuvar mediatörler ve antioksidatif sistemler üzerine biyokimyasal etkileri araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

Nekrotizan enterokolit (NEK), özellikle prematüre yenidoğanlarda görülen, mukozadan itibaren gastrointestinal sistemin tüm katmanlarını tutabilen, inflamasyon ve nekroz ile karakterize, en sık acil cerrahi müdahale gerektiren bir gastrointestinal sistem (GİS) hastalığıdır (1). İlk olarak yüzyılı aşkın süre önce tanımlanmasına, çok sayıda klinik ve deneysel araştırmalara rağmen NEK patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Hastalığın önlenmesi ve tedavisi konusunda benimsenmiş etkin bir yöntem yoktur (24). Bu nedenle mortalitesi ve morbiditesi yüksektir. Son 30 yıldan beri yapılan çalışmalara rağmen halen mortalite oranı %10-50 arasında değişmektedir (25-27).

Son dekatlarda yenidoğan yoğun bakım ünitesi (YYBÜ) imkanlarının iyileştirilmesi, teknolojik gelişmeler ve sürfaktanın kullanıma girmesiyle birlikte çok düşük doğum ağırlıklı ve prematüre doğan bebeklerin yaşam oranı artmakta, buna paralel olarak NEK insidansı da artış göstermektedir (28-30). NEK insidansı, merkezler arasında farklılık görülmekle birlikte %3-28 arasında değişmektedir (1). İnsidans gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı ile ters orantılıdır. Tüm NEK olgularının %10'nunu term yenidoğanlar, %90'ını ise prematüreler oluşturmaktadır (30). 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.

NEK, intrauterin dönemde görülmemekte, doğumdan sonra gelişmektedir. Genel olarak hayatın 3.-10. günleri arasında başlamakla birlikte, ilk üç ay içinde de görülebilir (31). Hiç beslenmemiş bebeklerde daha az sıklıkta görüldüğü bildirilmektedir. NEK'li hastaların %90'ından fazlası daha önce enteral beslenmiş bebeklerdir. Anne sütü ile beslenmenin mama ile beslenmeye göre NEK riskini üç-on kat azalttığı gösterilmiştir (32,33)

NEK ile cinsiyet ve ırk arasında ilişki saptanmamıştır. NEK olguları genellikle sporadik görülür ve mevsimsel dağılımı yoktur. Bazen salgınlar şeklinde gelişebilir (34). NEK epidemileri sırasında tek bir etken değil, birden çok enfeksiyöz etken izole edilmiştir.

SEMPTOMLAR VE KLİNİK BULGULAR

Hastalığın ortaya çıkış zamanı gestasyonel yaş ile ters orantılıdır. Term bebeklerde semptom ve bulgular yaşamın ilk birkaç gününde ortaya çıkarken, prematüre bebeklerde genellikle ikinci haftada ortaya çıkmaktadır. NEK, GİS semptom ve bulguları yanında, sistemik semptom ve bulgularla karşımıza çıkabilir. Sıklıkla en erken bulgu beslenme intoleransı ve gastrik boşalmada gecikmedir (35). Abdominal distansiyon, abdominal hassasiyet, abdominal duvar renk değişikliği, hemotokezya, safralı kusma, ısı düzensizliği, letarji, apne ve bradikardi, taşikardi, solunum sıkıntısı ve dolaşım bozukluğu, C reaktif protein yüksekliği, nütropeni, trombositopeni, metabolik asidoz, hiponatremi gibi semptom ve bulgular görülebilir (1,31). İlerlemiş olgularda ise intestinal perforasyon, bakteriyemi, sepsis, asidoz, şok ve dissemine intravasküler koagülasyon gelişebilir. Gaitada gizli kan (GGK) pozitifliği, nazogastrik (N/G) tüp ile beslenen prematüre bebeklerin %60-75'inde görülebildiği için NEK tanısında yararlı bir belirteç değildir (1). Klinik olarak NEK'ten şüphelenildiğinde tanıyı kesinleştirmek ve tedaviye yol göstermek amacıyla radyolojik inceleme yapılmalıdır. Radyolojik incelemede başlangıçta barsak dilatasyonu, ileus, pnömotosis intestinalis gibi bulgular saptanırken, ileri dönemde barsak perforasyonu sonucu pnömoperitoneum ve portal venede gaz gözlenebilir (36,37). Bell ve arkadaşları tarafından 1978 yılında NEK'li hastaları klinik ve radyolojik olarak sınıflandıran kriterler yayınlanmış, bu kriterler Walsh ve Kleigman tarafından 1986 yılında modifiye edilmiştir (38,39). 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 1).

Tablo-1: Nekrotizan enterokolitte modifiye Bell evrelemesi

Sınıflama	Klinik Bulgular	Radyolojik Bulgular
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	Pnömotosis intestinalis ve/veya Portal vende gaz
III (Ağır NEK)	Evre II'ye ek olarak Hipotansiyon Belirgin asidoz Dissemine intravasküler koagülasyon Nötropeni	Evre II'ye ek olarak Pnömoperitoneum

TEDAVİ

NEK'in etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamadığından spesifik bir tedavi yöntemi yoktur. Enteral beslemenin kesilmesi, N/G ile mide dekompresyonu, sıvı-elektrolit desteği, kan basıncının düzeltilmesi, asidoz, anemi ve trombositopeninin düzeltilmesi gibi destek tedavileri 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 ve aminoglikozit veya üçüncü kuşak sefalosporin önerilmekle birlikte, intestinal perforasyon şüphesi varsa anaerobik mikroorganizmalara etkili bir ilaç da sıklıkla tedaviye eklenir (1). Yedi-on günlük parantral beslenme ve antibiyotik tedavisi önerilmekle birlikte, güncel yayınlar ultrasonda portal vendeki gaz kaybolduktan sonra beslenmenin başlanabileceğini belirtmektedir (40).

NEK'li hastalara medikal tedavi uygulanmasına rağmen hastaların %20-40'ında cerrahi tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır (41-44). Cerrahi tedavinin pek çok yazar tarafından kabul edilmiş tek endikasyonu intestinal perforasyondur. Ancak bazı radyolojik bulgular (sabit barsak ansı, portal vende gaz, asit, asimetrik intestinal distansiyon) ve laboratuvar bulguları (şiddetli trombositopeni, nötropeni veya asidoz) cerrahi tedaviye ihtiyaç duyulacak kadar ağır hastalığa işaret edebilir (30). İntestinal perforasyonu olan NEK olgularında laparotomi veya primer peritoneal drenaj olmak üzere iki cerrahi yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden hangisinin tercih edileceği tartışmalı olmakla birlikte, çok merkezli, randomize, kontrollü, güncel bir çalışmaya göre bu cerrahi yöntemler arasında mortalite, hastanede kalış süresi ve total paranteral beslenme süresi bakımından anlamlı fark bulunmamaktadır (45). Bazı çalışmalarda cerrahi geçiren hastalarda mortalitenin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (46). Operasyon sonrası batın içi apse, intestinal yapışıklıklar, yara yerinin geç iyileşmesi gibi komplikasyonlar görülebilmekle birlikte, en ciddi komplikasyon kısa barsak sendromudur.

NEK olup iyileşen olgularda nörolojik ve işlevsel komplikasyonlar gelişebilir. Güncel bir çalışmada NEK geçiren olgular düzeltilmiş yaşları 18-22 ay arasında değerlendirildiğinde; büyüme-gelişme geriliği, serebral palsi, işitme ve görme yetersizliği, Bayley skoru düşüklüğü açısından büyük risk altında oldukları gösterilmiştir (47). Hem erken hem de geç dönemde gelişen komplikasyonlar hastanın hayatını ciddi şekilde tehdit ederken, yüksek maddi kayıplara da neden olmaktadır.

PATOGENEZ

NEK patogenezi, hakkında birçok araştırma yapılmasına rağmen halen 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 (1,9,24,30).

İmmatür İntestinal Motilite, Sindirim ve Bariyer Fonksiyonu

İntestinal motilite lümen içindeki antijenik maddelerin temizlenmesinde kırıktık öneme sahiptir. GİS motilitesi ikinci trimesterde gelişmeye başlamasına rağmen, üçüncü trimestire kadar olgunlaşmaz. Gebelik yaşı 34 haftaya ulaşana kadar intestinal sistem boyunca dalgalanma olmaz (48). Dış faktörler intestinal motiliteyi değiştirebilir. Enteral beslenme maturasyonu artırırken (49), fetal hipoksi veya perinatal asfiksi motiliteyi azaltır (50). İntestinal sistemdeki itici etkinin azalması ile mikroorganizma ve toksik ürünlerin epitel ile temas olasılığı artar. Bu da intestinal hasara neden olabilir. Buna ek olarak prematürelde besinlerin sindirim ve absorpsiyon yeteneği henüz gelişmemiştir (51). Sindirilmemiş moleküller de intestinal hasara katkıda bulunabilir.

İntestinal bariyer fonksiyonu yapısal ve biyokimyasal bileşenlerden oluşmuştur. Eğer bu bileşenler tam olarak olgunlaşmamışsa mikroorganizmalar daha derin dokulara ilerleyebilir ve inflamasyona neden olabilir.

Yapısal bariyer *tight junction* komplekslerinden oluşmuştur. Bu kompleksler 10. gebelik yaşında biçimlenir (52). Ancak, sıvı sekresyonu ve besin absorpsiyonu için bariyer fonksiyonunun tam gelişmiş olması gerekir. Bu fonksiyon 26. gebelik haftasından itibaren terme kadar amniotik sıvı etkisi ile gelişir (51). İntestinal lümeden istenmeyen patojenleri ve toksinleri uzaklaştırmada enterositler, Cl⁻ iyonlarını ve suyu (sekretuar daire) kullandığı için konak savunmasında sıvı sekresyonu yeteneği önemli bir yer tutmaktadır (53). Bu nedenle prematüre yenidoğanlar patojenleri ve toksinleri etkili bir şekilde uzaklaştıramazlar.

Goblet hücrelerinden salınan müsin ile mukoza yüzeyinde kalın koruyucu bir tabaka oluşur. Bu tabaka mikroorganizmaların doğrudan epitele bağlanmasını ve agregasyonunu engelleyerek ortamdan uzaklaştırılmalarını sağlar. Müsin gen ekspresyonu 23-27. gebelik haftalarında erişkin tipe benzer. Gelişmemiş müsin tabakası intestinal permeabilite artışına ve mikroorganizmaların bağlanmasına neden olur. Bu durum intestinal hasara zemin hazırlar.

Paneth hücreleri ince barsak kriptlerinde bulunan özelleşmiş enterositlerdir. Lizozim, fosfolipaz A₂, küçük antimikrobiyal peptidler salgırlar. Bu salgılar intestinal biyokimyasal bariyeri oluşturmaktadır. *Defensin* (α ve β) ve *cathelicidin* olmak üzere iki önemli antimikrobiyal peptid vardır. *Paneth* hücreleri α *defensin*, intestinal epitel hücreleri β *defensin* salgırlar. Bu antimikrobiyal peptidler antiinflamatuvar sitokinlerin salınmasında, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda ve Cl⁻ iyonlarının salınımında görev alırlar (54,55). *Paneth* hücre sayısı prematüre yenidoğanlarda erişkinlere göre daha düşük düzeyde saptanmıştır (30).

Enteral Beslenme

NEK'li olguların %90-95'i enteral olarak beslenen ve hızlı volüm artışına maruz kalan bebeklerdir. Hiperozmolar formula, yüksek volümlü ve hızlı beslemenin NEK riskini arttırdığı bildirilmektedir. Enteral besleme ile NEK arasındaki ilişki bilinmesine rağmen patogenezi tam olarak açık değildir. Özellikle yüksek volümlü agreziv beslemenin mide distansiyonu yaratarak splenik dolaşımı bozacağı ve intestinal iskemiyeye yol açabileceği belirtilmektedir (1). Berseth ve arkadaşlarının çalışmasında, minimal enteral beslenme uygulanan ve volüm artışı yavaş yapılan bebeklerde, hızlı volüm arttırılanlara göre daha az NEK geliştiği gösterilmiştir (56).

İnsan ve hayvan çalışmalarında ise anne sütü ile beslemenin NEK insidansını azalttığı gösterilmiştir. Anne sütü, içerdiği sekretuar immünglobulin A, lökosit, laktoferrin, lizozim, müsin, sitokin, epidermal *growth* faktör, enzimler, oligosakkarid, poliansatüre yağ asitleri ve *platelet activating* faktör-asetil-hidrolaz (PAF-AH) gibi birçok madde ile antibakteriyel, antiinflamatuvar ve mukoza koruyucu etkilere sahiptir (1,31). Anne sütü ile beslenen yenidoğanlarda GİS florası probiyotik *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria*'dan oluşurken, mama ile beslenenlerde koliform bakteriler, entrokoklar, bakteroides gibi patojenlerden oluşmaktadır (35).

Anormal Bakteriyel Kolonizasyon

NEK, çoğunlukla yaşamın ikinci haftasında, intestinal kolonizasyon tamamlandıktan sonra gelişmektedir. Bugüne kadar intrauterin NEK vakası bildirilmemiştir (25). Patolojik örnekler intestinal nekroza neden olan diğer hastalıklar dikkate alınarak incelendiğinde, NEK'te bakteriyel çoğalmanın daha fazla

olduğu bildirilmiştir. Ayrıca NEK'te sıkça görülen bir bulgu olan pnömotozis intestinalisin, bakterilerin beslenme ile alınan karbonhidatları hızla hidrojen, karbondioksit ve metan gibi gazlara fermente etmesiyle olduğu bilinmektedir. Yine bakteri hücre duvarı ürünü olan endotoksin verilmesinden sonra NEK benzeri lezyonların olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Bütün bu kanıtlar NEK patogenezinde bakterilerin kiritik rolü olduğunu düşündürmektedir (9,25).

Barsaklarda kolonize olan mikroorganizmalar (kommensal bakteriler) enterositlerle simbiyotik olarak etkileşmekte ve sindirim, anjiogenezis, bariyer fonksiyonunda önemli gen ekspresyonunu regüle etmektedir (57). İnvitro çalışmalarda birçok kommensal bakteri ürünlerinin transkripsiyon faktörü olan ve proinflamatuvar mediatörlerin üretimini arttıran *nuclear factor-kappaB* (NF-κB)' yi inhibe ederek inflamasyonu azalttığı gösterildi (58-61). 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 (1,35,62). GİS'de anormal kolonizasyon veya kommensal bakterilerle patojenik bakteriler arasındaki tersine dönmüş denge NEK patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Caplan ve arkadaşlarının çalışmasında, enteropatojen kolonizasyonunu önleyen ve intestinal olarak yararlı etkileri saptanan *Bifidobacterium infantis* verilen yenidoğan farelerde NEK insidansının azaldığı gösterilmiştir (63).

NEK vakaları sıklıkla sporadik olduğu için neden olan spesifik bir ajan düşünülmemektedir. NEK'li olguların sadece %20-30'unun kan kültüründe üreme saptanabilirken, bakteriyemi oranının daha sık olabileceği belirtilmektedir (1,35). NEK'te en sık *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* gibi gram negatif bakteriler saptanırken; *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium butyricum*, koagülaz negatif stafilokoklar gibi gram pozitif bakteriler, *corona* virüs, rota virüs ve enterovirüsler de saptanabilir (35).

Toll-like reseptörler (TLR) barsak epitel yüzeyinde bulunur ve infeksiyon algılayıcısı gibi davranırlar. İnflamasyonun başlangıcında ve immün defansta görev

alırlar. Hem patojenik bakteriler hem de kommensal bakteriler TLR'lere bağlanan molekül salgırlar. Şimdiye kadar 10'un üzerinde TLR tanımlandı. TLR'in kommensal bakteriler tarafından aktivasyonu intestinal epitel bütünlüğünün korunmasında önemlidir. TLR'ler ile bağlanan moleküller arasında spesifite mevcuttur. Örneğin bakteri hücre duvarı komponenti olan lipopolisakkarit (LPS) TLR4'e bağlanırken, lipoteikoik asit TLR2'ye bağlanmaktadır (62). Bu reseptörlerin aktivasyonu NF-κB'nin translokasyonu ile sonuçlanmakta ve proinflamatuvar sitokinler salınmaktadır (64). İntestinal epitel hücrelerinde TLR4 ve TLR2 ekspresyonu düşüktür. Bu düşük düzey sürekli bakteriyel ürünlere maruz kalan epitel hücrelerini inflamasyondan korumaktadır (65,66). Son yıllarda TLR'in NEK patogenezinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Anne sütü ile beslenen ratlarda TLR4 ekspresyonu azalırken mama ile beslenenlerde ve asfiksiye maruz kalanlarda arttığı gösterilmiştir (64).

İntestinal Hipoksi-iskemi

Term bebeklerde konjenital kalp hastalığı, intrauterin büyüme geriliği, polistemi, annenin kokain kullanması gibi intestinal kan akımını azaltan durumlar NEK riskini arttırmaktadır. Hipoksik-iskemik stres durumunda kan akımı splenik yataktan beyin, kalp ve adrenal bezler gibi hayati organlara yönelmektedir (*Diving* refleksi). 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 (9). 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.

Term bebeklerde oluşan NEK hipoksik-iskemik stres ile ilişkili olarak yaşamın ilk günleri meydana gelirken, prematürelere genellikle ikinci haftada ortaya çıkmaktadır. Bu durum "prematürelere oluşan NEK farklı mekanizmalarla mı meydana geliyor?" sorusunu gündeme getirmektedir. Güncel çalışmalar immatür barsaklarda vazokonstrüksiyon ve vazodilatasyon arasındaki denge üzerine odaklanmıştır (24). Prematüre yenidoğanlarda intestinal damarların yüksek oranda

kanlanması, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından üretilen ve güçlü bir vazodilatör olan nitrik oksit (NO)'le yakından ilişkilidir. Endotel hücre fonksiyonundaki bozulma kan akımında anormal değişikliklere yol açmaktadır. İskemi izleyen reperfüzyon sonrası intestinal vasküler rezistans artmaktadır. Bu artış endotelde sentezlenen NO üretiminin ve bazal NO düzeyinin azalmasından kaynaklanmaktadır. Vasküler rezistans artışı sonucu meydana gelen düşük kan akımı endotelin 1 gibi güçlü vazokonstrüktör maddelerin salınımı arttırmaktadır. Böylece doku hipoksisi / iskemisi devam etmektedir. Mikrosirkülasyondaki bozulmanın NEK gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (67).

Hipoksi-iskemi sonrası oksijenizasyon ile ortamda oluşan serbest oksijen radikallerinin ana kaynağı, ksantin dehidrogenaz / ksantin oksidaz enzim kompleksidir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O^{\cdot-}$) ve hidroksil anyonu (OH^{\cdot}) hasardan sorumlu en önemli serbest oksijen radikalleri olarak bilinirler. Hidroksil anyonu reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, proteinlerin disülfid bağlarında bozulma, deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı oluşturarak ve inflamatuvar hücrelerde aktivasyona neden olarak hücre hasarına yol açmaktadır (31,35,68). Antioksidan sistemler, serbest oksijen radikalleri ile ilişkili doku hasarında serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak koruyucu etki göstermektedir. Glutasyon metabolizması antioksidatif defans sisteminin en önemlilerinden birisidir (10). Yine antioksidan bir enzim olan katalaz (CAT) hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalayarak zararlı etkilerden korumaktadır. Deneysel çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ya da etkisini önleyen maddeler verildiğinde intestinal hasar ve NEK gelişiminin azaldığı gösterilmiştir (69,70). Hayvan modellerinde hipoksi-reoksijenizasyon (H/RO) sonrası, oksidatif strese bağlı barsak doku hasarlanmasında lipid peroksidasyonunun önemli olduğu ve bu durumun da lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehit (MDA) ölçümü ile saptanabildiği gösterilmiştir (3,5,7).

Nekrotizan Enterokolitte İnflamatuvar Mediatörler

Hasarlanmış mukozaya mikroorganizmanın bağlanması sonucu birçok proinflamatuvar mediatörler açığa çıkmaktadır. Bu mediatörler NEK patogenezinde

önemli bir yer tutmaktadır. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), *platelet activating* faktör (PAF), NO, interlökin-6 (IL-6) bu mediatörlerin en önemlileridir.

TNF- α , NEK patogenezinde başlangıç anahtar mediatör olarak bilinmektedir (31,64,71). Makrofajlar, lenfositler, polimorfonükleer lökositler (PNL), endotel hücreleri, düz kas hücreleri, intestinal epitel hücreleri tarafından salınmaktadır (72). İnterlökin-1 (IL-1) üretimini arttırmakta, PNL aktivasyonu ve migrasyonunda, apoptozis indüksiyonunda, endotel adezyon moleküllerinin ekspresyonunda, anjiogenezisde, akut faz cevabı ve ateşin ortaya çıkmasında görev almaktadır (31,72). Aynı zamanda TNF- α 'nın ekstrasellüler matriksi parçalayarak doku yıkımına neden olan matriks metalloproteinazların üretimini arttırdığı gösterilmiştir (73).

Caplan ve arkadaşları, NEK geçirmiş yenidoğan bebeklerde kontrol grubuna göre TNF- α 'yı anlamlı yüksek saptarken (74), deneysel güncel bir çalışmada da TNF- α üretimini azaltan pentoksifilin uygulanması ile NEK insidansının ve şiddetinin azaldığı gösterilmiştir (71).

PAF, NEK gelişiminde en önemli inflamatuvar mediatördür (72). Endotoksin ve hipoksiye maruziyet sonrası fosfolipaz A₂ aracılığı ile kapiller endotel, makrofaj, PNL, intestinal epitel hücreleri gibi birçok hücreden salınan endojen bir fosfolipiddir (31). Vazokonstrüksiyon, kapiller geçirgenliğin artması, PNL-trombosit agregasyonu, degranülasyonu, bronkokonstrüksiyon, hipotansiyon, şok ve iskemik barsak nekrozu gibi birçok biyolojik etkilere sahiptir. PAF, güçlü vazokonstrüktör etkisi ile intestinal iskemi sonucu mukoza hasarına neden olurken, aynı zamanda PAF reseptörlerinin aktivasyonu TNF- α , IL-1, IL-6 gibi proinflamatuvar mediatörlerin üretimini arttırmakta, intestinal epitel hücrelerinin apoptozisini tetiklemekte, mukozal permeabiliteyi artırarak bakterilerin girişini kolaylaştırmaktadır (35). İnaktif metaboliti olan *lyso-PAF* formuna dönüşümü PAF-AH enzimi ile katalize edilen PAF'ın, NEK patogenezinde temel inflamatuvar mediatör olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (1,75-80). PAF antagonisti verilen farelerde ve domuzlarda intestinal nekrozun azaldığı gösterilmiştir. (81). Deneysel çalışmalarda olduğu gibi klinik çalışmalarda da PAF'ın NEK gelişiminde önemli rol

oynadığı belirtilmiştir. Wang ve arkadaşları polimeraz zincir reaksiyonu ile sekiz organ içinde PAF reseptör ekspresyonunun en çok ileumda olduğunu ve bu durumun intestinal inflamasyon gelişiminde önemli olduğunu vurgulamışlardır (82). Prematürelde PAF yıkımından sorumlu enzim olan PAF-AH düzeylerinin düşük olduğu, normal düzeylerine ancak altıncı haftada ulaştığı ve deneysel olarak PAF-AH verildiğinde intestinal hasarın azaldığı saptanmıştır (83,84). Amer ve arkadaşlarının çalışmasında, prematürelde enteral beslenme ile birlikte gaytada PAF konsantrasyonunun arttığı ve yüksek PAF konsantrasyonuna sahip bebeklerde NEK geliştiği gösterilmiştir (85).

NO, kısa ömürlü reaktif bir moleküldür. Doku hemostazının sağlanması, nörotransmisyon ve inflamasyon gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda görev almaktadır. Hem yağda hem de suda eriyebilir olmasından dolayı kanal ve reseptöre ihtiyaç duymadan hücre membranlarından kolayca geçebilir. Eşsiz, bir elektronu olduğu için serbest radikal gibi değerlendirilir. Diğer serbest radikallerin varlığında doku hasarını arttırmaktadır (2).

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) yardımıyla L-arginin ve oksijenden sentezlenir. NOS'un üç izoenzimi vardır; endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS), *inducible* NOS (iNOS). Her biri farklı bir gen tarafından kodlanmaktadır. Normal durumlarda sentezlenmeyen iNOS, inflamasyon süresince yüksek düzeylere ulaşmaktadır. NO, *invivo* olarak eritrositlerdeki hemoglobin ile reaksiyona girerek temizlenmektedir.

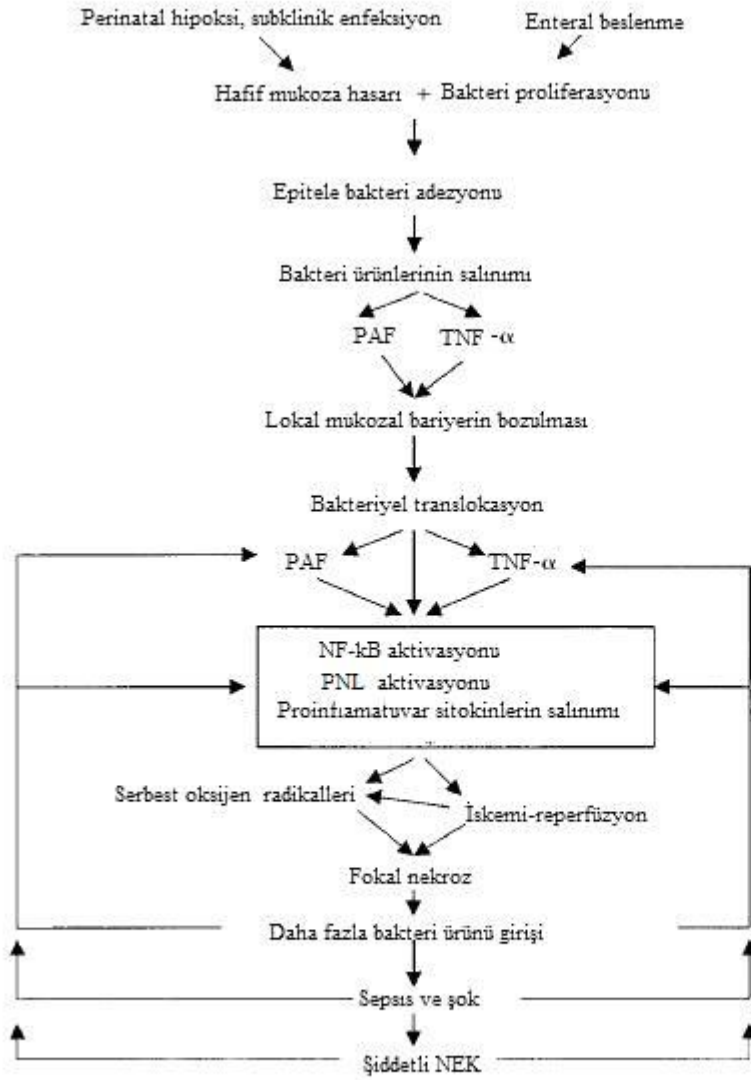
eNOS ve nNOS tarafından sentezlenen NO doku perfüzyonunu sağlarken, iNOS tarafından sentezlenen NO hücre hasarına ve intestinal bariyer bozukluğuna yol açmaktadır (86). Şöyle ki, iNOS tarafından üretilen NO yüksek konsantrasyonda olduğundan ve hızlı temizlenemediğinden süperoksit radikali ile reaksiyona 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 etmektedir. Oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Enterosit proliferasyonunu sağlayan büyüme faktörleri, tirozin

kinaz rezidülerinin fosforillenmesi ve reseptörlerine bağlanması yoluyla etki göstermektedirler. Peroksinitrit tirozin rezidülerini nitratlayarak nitrotirozin oluşturur. Böylece enzim aktivitesini değiştirerek enterosit proliferasyonunu önlerler (2,86,87).

IL-6 salınımı IL-1, TNF- α , bakteri ürünleri tarafından uyarılmaktadır. İntestinal makrofajlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri tarafından salınan IL-6, B ve T hücre proliferasyonunu, B hücrelerinin antikor üretimini, akut faz proteinlerinin üretimini arttırmaktadır. NEK olan bebeklerin plazma ve gaytasında IL-6 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (88). Goepfert ve arkadaşlarının çalışmasında, umbilikal kordaki yüksek IL-6 konsantrasyonu ile NEK ve sistemik inflamatuvar cevap sendromu gibi hastalıklar arasındaki anlamlı ilişki gösterilmiştir (89).

Barsak hemostazının devamı için proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sinyallerin denge içinde olması gerekir. İnterlökin 10 (IL-10) antiinflamatuvar sitokinlerden en önemlisi olup T *helper* 2, monosit ve B hücrelerinden sentezlenmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin üretimini, makrofajların, T hücrelerinin ve *natural killer* hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe ettiği bildirilmiştir (31). Öztürk ve arkadaşları tarafından NEK oluşturulmuş ratlara verilen rekombinant IL-10 ile mukozal hasarın azaldığı (7), bir başka çalışmada da farelerde IL-10 eksikliğinin inflamatuvar kolit gelişimine zemin hazırladığı gösterilmiştir (90).

Sonuç olarak, NEK halen patogenezi tam olarak aydınlatılmamış kompleks bir hastalıktır. Prematürite ile birlikte kısa epizodlu perinatal hipoksi veya subklinik infeksiyon gibi travmaların hafif mukozal hasara yol açtığı düşünülmektedir. Enteral beslenme sonucu çoğalan bakterilerin hasarlanmış mukozaya bağlanması ile inflamatuvar cevap ortaya çıkmakta; bakteri translokasyonu ile PNL'lerin katılımı ve aktivasyonu sonucu inflamatuvar cevap artmaktadır. Devam eden uygunsuz vazokonstrüktör cevap iskemi ve reperfüzyona yol açmakta; en sonunda kısır döngü sonucunda nekroz ve perforasyon oluşmaktadır (9,25) (Şekil-1).



Şekil-1: Nekrotizan enterokolit patogenezinin akış şeması (N9).

(Wei Hsueh'den izin alınarak kullanılmıştır)

KARNOZİN (β -ALANYL-L-HISTIDINE) VE ETKİLERİ

İlk kez 1900 yılında Gulewitsch ve Amiradzibi tarafından et ekstresinden izole edilen karnozin, vücutta endojen olarak sentezlenen histidin türevi bir dipeptiddir. Özellikle beyin, iskelet ve kalp kasında yüksek konsantrasyonlarda, mide ve böbrekte düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (11,13). Sitolik bir enzim olan karnozin sentetaz enzimi tarafından β -alanin ve L-histidin aminoasitlerinden sentezlenmektedir. Doku karnozin düzeyleri metilasyon ve hidroliz reaksiyonları ile kontrol edilmektedir. Metilasyon ile *anserine* ve *ophidine*'e yıkılırken, karnozinaz

enzimi tarafından hidrolize edilerek histidin ve β -alanine yıkılmaktadır (11,91). Karnozinle ilgili birçok çalışma olmasına rağmen biyolojik etkileri hakkında birçok teori mevcuttur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda antioksidan, immun sistem güçlendirici, tamponlama ve nörotransmitter olarak görev aldığı gösterilmiştir (11).

Karnozin, hidroksil ve süperoksit radikallerini temizleyen (*scavenger*), *singlet* moleküler oksijeni inaktive eden (*quencher*) doğal bir dipeptiddir (11-14). Bununla birlikte iskemi süresince peroksidasyon gelişmesinde ve serbest oksijen radikallerinin üretilmesinde rol alan demir, bakır gibi geçiş metalleri ile kompleks oluşturarak antioksidan aktivite sağlamaktadır (11,13,14). Karnozin lipitlerin peroksidasyonunu engellemekte, aynı zamanda peroksidasyon süresince oluşan MDA gibi ürünlerin düzeyini de azaltmaktadır (13). Suda çözünme özelliğinden dolayı karnozin, geçiş metalleri ve oksijen radikalleri gibi suda çözünen oksidasyon moleküllerinin yüksek konsantrasyonda bulunduğu sitozolik çevrede antioksidan özellik göstermektedir. Oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında α -tokoferol gibi lipitte çözünen antioksidanlara karşılık, karnozinin suda çözünen antioksidan savunma sistemini temsil ettiği düşünülmektedir (92).

Karnozinin, iskemik hasarlanma sonucu kardiyak yetmezlik gelişen ratlarda, antioksidan özelliğinin yanı sıra direkt Ca kanalına (RYR2) etki ederek, hücre içi kalsiyum dengesini değiştirdiği ve böylece kardiyak kontraktiliteyi iyileştirdiği ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini arttırarak vazodilatatör etki gösterdiği bildirilmiştir (93,94). Ayrıca insanlarda yapılan bir çalışmada IL-1 β üretimini arttırarak ve apoptozisi inhibe ederek immün cevabı düzenleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir (95).

GİNKGO BİLOBA EKSTRESİ (EGb 761) VE ETKİLERİ

Ginkgo biloba ekstresi aynı isimli bitkinin yapraklarından elde edilen ve yıllardır Çin'de ve batıda pek çok ülkede kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için kullanılan bir ajandır. EGb 761'in aktivitesinden %24 oranında içerdiği *flavanoid* ve %6 oranında içerdiği *terpenoid* fraksiyonları sorumlu tutulmaktadır. Birçok çalışmada iskemi-reperfüzyon hasarında nöroprotektif ve kardiyoprotektif olduğu gösterilmiştir (15-17).

EGB 761'in karnozine benzer olarak serbest oksijen radikalleri için temizleyici (*scavenger*) görevi yaptığı ve bu özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonunu önleyerek antioksidan aktivitelerinin olduğu belirtilmiştir (15-17). Bununla birlikte deneysel çalışmalarda süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri arttırdığı, MDA üretimini azalttığı rapor edilmiştir (18-21). Ayrıca NEK patogenezinde önemli yere sahip olan NO oluşumunu iNOS ekspresyonunu inhibe ederek azalttığı gösterilmiştir (15,20,21). Son zamanlarda bu etkisinin NF- κ B'nin süpresyonu sonucu da olabileceği belirtilmektedir (96). iNOS ve TNF- α gen ekspresyonunda primer düzenleyici olarak görülen NF- κ B'nin NEK patogenezinde proinflamatuvar faktör olarak rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca vazodilatör etkiyle doku perfüzyonunu sağlayan ve eNOS tarafından üretilen NO sentezini arttırmaktadır (97). PAF antagonisti etkiye de sahip olan ginkgo bilobanın, trombosit agregasyonunu ve kan viskozitesini azalttığı gösterilmiştir (17,98).

KLARİTROMİSİN VE ETKİLERİ

Klaritromisin, eritromisine bir metil grubunun eklenmesiyle elde edilen semisentetik makrolid grubu bir antibiyotiktir. 50S ribozomal ribonükleik asite (RNA) geridönüşümlü bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir. Bu şekilde bakteriyostatik olarak antibakteriyel etkinliğini göstermektedir (99). Çoğunlukla gram (+) kok ve atipik patojenlere karşı etkilidir. Makrolidler, antibakteriyel etkinliğinin yanı sıra immünmodülatör ve antiinflamatuvar etkinliğe de sahiptir. Bu etkileri ilk olarak eritromisinin, kronik inflamatuvar bir hastalık olan diffüz panbronşiolitli hastalarda hayatta kalma oranını belirgin olarak düzeltmesiyle gösterilmiştir (100). Bundan sonra pek çok insan ve hayvan çalışmalarında klaritromisinin de immünmodülatör ve antiinflamatuvar etkinliği gösterilmiştir (22,23,101-106).

Toplumdan kazanılmış pnömonisi olan hastalara yedi gün süreyle oral yolla verilen klaritromisin tedavisi ile proinflamatuvar olan IL-6 düzeyinin azaldığı, antiinflamatuvar olan IL-10 düzeyinin arttırdığı gösterilmiştir (101) *Mycoplasma pneumoniae* ile infekte edilmiş farelerin akciğer histopatolojik ve bronkoalveolar lavaj sıvısının biyokimyasal incelemelerinde, klaritromisin tedavisi ile histopatolojik

belirgin düzelme, TNF- α , gama interferon, IL-6 ve interlökin-8 (IL-8) düzeylerinde belirgin azalma olduğu saptanmıştır (23). Plörezi modeli oluşturulan ratlarda yapılan bir çalışmada akut inflamasyon markırlarından TNF- α , IL-6, IL-1 β düzeyleri ve NO üretimi klaritromisin tedavisi ile belirgin azalmıştır. Bu çalışma ile klaritromisinin inflamatuvar mediatör ve sitokin salınımını inhibe ettiği ve dokuya lökosit birikimini azalttığı gösterilmiştir (22). Tekrarlayan akut vizing atağı geçiren çocuklarda yapılan çift kör randomize plasebo kontrollü bir çalışmada, klaritromisin tedavisi alanların nazofaringeal TNF- α , IL-1 β , IL-10 düzeylerinin anlamlı düşük olduğu saptanmıştır (106).

Çoklu ilaç direnci olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ile piyelonefrit modeli oluşturulan rat ve tavşanlarda, *Escherichia coli* ile sepsis modeli oluşturulan tavşanlarda, klaritromisin tedavisi ile serum MDA ve TNF- α düzeylerinde belirgin azalma olduğu gösterilerek, ilacın antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri olduğu bildirilmiştir (102,104,105,107).

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'nun 01.08.2007 tarih ve 12 sayılı kararı ile etik kurul onayı alınan bu deneysel çalışma, *Wistar*-albino cinsi ratlarda, Temmuz 2008'de, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nde yapıldı. Toplam 35 adet bir günlük rat yavruları randomize olarak her bir grupta yedi 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. Çalışma süresince tüm rat yavruları annelerini emerek beslenirken, anne ratlar standart fare yemi olan %21 protein içeren Pellet yem ile beslendi.

Çalışma Grupları:

Kontrol grubu (Grup I, n:7): Herhangi bir girişim yapılmadı ve ilaç uygulanmadı.

NEK grubu (Grup II, n:7): Herhangi bir ilaç uygulanmadı, doğumdan sonra 24 saatini dolduran ratlarda hipoksi / reoksijenizasyon (H/RO) yöntemi ile NEK modeli oluşturuldu (3).

NEK+Karnozin grubu (Grup III, n:7): Doğumdan sonra 24. saate H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulduktan hemen sonra ilk dozu verilmek üzere 250 mg/kg/gün, tek dozda, toplam üç gün süreyle (24. saat, 48.saat, 72. saat) intraperitoneal (ip) karnozin (*L-Carnosine* 5 g Flakon, 0.5 g/ml, *BioChemica, Sigma-Aldrich, Pf, D-89555 Steinheim, Swetzerland*) uygulandı.

NEK+Ginkgo alkaloid (EGb 761) grubu (Grup IV, n:7): Doğumdan sonra 24. saate H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulduktan hemen sonra ilk dozu verilmek üzere 100 mg/kg/gün, tek dozda toplam üç gün süreyle (24. saat, 48.saat, 72. saat) ip ginkgo alkaloidi (Ginkgo biloba Hevert injekt, Dil. D3 2 ml, *Hevert-Arzneimittel GmbH & Co. KG Nussbaum, Deutschland*) uygulandı.

NEK+Klaritromisin grubu (Grup V, n:7): Doğumdan sonra 24. saate H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulduktan hemen sonra ilk dozu verilmek üzere 40 mg/kg/gün, tek dozda toplam üç gün süreyle (24. saat, 48.saat, 72. saat) ip klaritromisin (Klacid Flakon, 50 mg/ml, *Abbott* Laboratuvarları İth. İhr. ve Tic. Ltd. Şt. İstanbul-Türkiye) uygulandı.

Hipoksi/Reoksijenizasyon Yöntemi ile NEK Modeli Oluşturma

Doğumdan sonra 24. saatte rat yavruları hava geçirmez kapalı bir ortamda beş dakika süreyle %100 CO₂ solutularak hipoksiye sokuldu, hemen ardından beş dakika süreyle %100 O₂ solutularak reoksijenizasyon uygulandı (3) (Şekil 2). Hipoksi periyodu sonrası tüm hayvanların siyanotik oldukları, gasping yaptıkları ve dışkılamalarının olduğu gözlemlendi (Şekil 3).



Şekil 2 : Hava geçirmez kapalı bir ortamda hipoksi-reoksijenizasyon yönteminin uygulandığı.



Şekil 3: Karbondioksit uygulamasından sonra rat yavrularının görünümü.

Günlük vücut ağırlığı takibi yapılan çalışma gruplarındaki tüm ratlara H/RO'dan hemen sonra ilk dozları verilmek üzere toplam üç gün süreyle (24., 48., 72. saatlerde) belirtilen dozda ve şekilde ilaçlar uygulandı. Doğum sonrası dördüncü günde (96. saatinde) servikal dislokasyon ile dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası 30 dakika içinde tüm rat yavrularının terminal ileumundan en az 2 cm olacak şekilde rezeksiyon yapıldı (Şekil 4). Alınan barsak doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik inceleme için, bir kısmı ise biyokimyasal tetkikler için ayrıldı.



Şekil 4: Terminal ileumdan doku örneği alınması (Grup II)

Histopatolojik Değerlendirme

Alınan barsak örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda %10 formalin ile fikse edilerek parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5 mikrometrelilik 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 (8).

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.

Biyokimyasal Değerlendirme

Terminal ileumdan alınan barsak doku örnekleri sıvı nitrojen ile dondurularak saklama kabında MDA, NO, IL-6, TNF- α , IL-10, redükte glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) glutatyon redüktaz (GR), CAT analizi için Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bir biyokimya uzmanı tarafından değerlendirilinceye kadar -85 °C'de saklandı.

Dokuların Homojenizasyonu

Dokular proteaz inhibitörü, Fenilmetilsülfonil florür (PMSF, 100 mikrog/ml), aprotinin (1 mikrog/ml), 0.001 EDTA (Etilendiamin tetraasetikası), 0.01 M Tris-HCL, 0.1 M NaCl içeren lizis tamponu (PN 7.6) ile +4 derecede polytron homogenizer (B. BRAUN, Germany) kullanılarak homogenize edildi. MDA ve GSH hesaplamalarında tüm doku homojenatı kullanıldı. Daha sonra homojenat 14.000 rpm de +4 °C de 10 dk süreyle santrüfjüje edildi. Elde edilen karışım NO (nitrit+nitrat), IL-6, TNF- α , IL-10, GSH-Px, GR, CAT ölçümlerinde kullanıldı

Malonildialdehit Ölçümü

Barsak doku hasarlanması, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın doku düzeyi ölçümüyle gösterilmektedir. Çalışmamızda MDA ölçümü Ohkawa yöntemine göre yapıldı (108). MDA, *thiobarbituric acid* (TBA) varlığında 532 nm'de ölçülebilen renkli bir kompleks yapmaktadır. Bu absorbans Shimadzu UV-160 spektrofotometresi ile ölçüldü. Standart olarak *1,1', 3,3' -Tetraetoksipropan* kullanıldı ve sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ yaş doku olarak belirlendi.

Nitrik Oksit Ölçümü

Çalışmamızda NO (nitrit + nitrat) ölçümü kadmiyum redüksiyon metodunun bir modifikasyonu olan Navarro-Gonzalves yöntemi ile değerlendirildi (109). Nitrit üretimi sülfanilamidin diazotizasyonu ve naftiletlen diamine bağlanması ile saptanır. Dört yüz mikrolitre örnek, 80 mikrolitre %30 ZnSO₄ ile denatüre edildi ve 10000 devirde 4 °C'de 20 dakikada santrifüj edildi. Daha sonra glisin-NaOH tamponu içinde CuSO₄ solüsyonu kullanılarak kadmiyum granülleri aktive edildi ve ardından 100 μl deproteinize örnek ile standart solüsyon eklendi. Böylece kadmiyum kullanılarak nitratın nitrite indirgenmesi sağlandı ve örnekler spektrofotometrik olarak değerlendirilip, KNO₃ standartına karşı otomatik olarak ölçüldü ve sonuçlar $\mu\text{M/g}$ yaş doku olarak verildi.

İnterlökin-6 Ölçümü

Doku homojenatında IL- 6 düzeylerinin ölçümlerinde rat ELİSA kiti (Bender MedSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2 A-1030 Vienna, Austria, katalog

numarası BMS625) kullanıldı. Test sonuçları bioelisa reader Elx800 standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/mg yaş doku olarak belirlendi.

Tümör Nekrozis Faktör- α Ölçümü

Doku homojenatında TNF- α düzeylerinin ölçümlerinde rat ELİSA kiti (Bender MedSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2 A-1030 Vienna, Austria, katalog numarası BMS622) kullanıldı. Test sonuçları bioelisa reader Elx800 standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/g yaş doku olarak belirlendi.

İnterlökin-10 Ölçümü

Doku homojenatında IL-10 düzeylerinin ölçümlerinde *human* ELİSA kiti (Bender MedSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2 A-1030 Vienna, Austria, katalog numarası BMS215/2) kullanıldı. Test sonuçları bioelisa reader Elx800 standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/g yaş doku olarak belirlendi

Glutasyon Düzeyi, Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz, Katalaz Aktivite Ölçümü

Çalışmamızda doku örneklerindeki total GSH içeriğinin tespiti için metafosforik asit kullanılarak protein çöktürülmesi ve 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona sokularak renk değişimi oluşturuldu. Ortaya çıkan renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar mg/g yaş doku olarak belirlendi (110).

GSH-Px aktivitesi için 75 mmol fosfat tamponu (pH 7.0) solüsyonundan 2.0 ml, 60 mmol GSH'den 50 mikrolitre, 30 U/ml glutasyon redüktazdan 0.1 ml, 15 mmol EDTA'nın disodyum tuzundan 0.1 ml, 3 mmol indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'dan 0.1 ml ve doku örneğinden de bir miktar olarak 3.0 ml'lik bir karışım hazırlandı. Bu karışıma 7.5 mmol H₂O₂'den 0.1 ml eklenerek, NADPH'in nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺)'a dönüşümü sağlandı. Bu dönüşüm absorbans değişim oranı olarak üç dakika süreyle 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar mU/g yaş doku olarak belirlendi (111).

GR aktivitesi 340 nm'de 37°C'de NADPH'ın oksidasyonunun izlenmesi yoluyla Racker ve arkadaşlarının metoduna göre saptandı (112). Reaksiyon, 50 µl örneğin, 1.0 ml deney karışımı (Tris tampon, pH 7.6, Na₂EDTA, okside GSH ve NADPH) içeren kuartz bir küvet içine konması ile başladı. Örnek yerine su kullanılarak, aynı şekilde kör çalışılarak elde edilen sonuç, örneklerden elde edilen sonuçtan çıkartıldı. Reaksiyon 37°C'de iki-üç dakika izlendi. Sonuçlar mU/g yaş doku ağırlığı olarak belirlendi.

Doku homojenatında CAT aktivite ölçümünde Aebi yöntemi kullanıldı (113). Karışım 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0), 10 mM H₂O₂ ve eritrosit lizat ile hazırlandı. H₂O₂'nin indirgeme oranı oda ısısında spektrofotometride 240 nm'de 30 saniyede saptandı. Sonuçlar U/g yaş doku olarak hesaplandı.

İstatistiksel Analizler

Vücut ağırlıkları, histopatolojik ve biyokimyasal bulgular ortanca ve minimum-maksimum aralıklara göre verildi. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemede non-parametrik test *Kruskal Wallis* ve *Mann-Whitney U* testi kullanıldı. Saptanan sonuçlar arasındaki farklılık p<0.05 ise istatistiksel bakımdan 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

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 2).

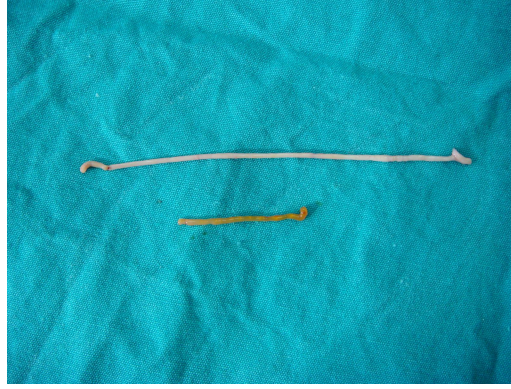
Tablo-2: Gruplardaki rat yavrularının birinci, ikinci ve üçüncü gün ortanca vücut ağırlıkları ve dağılımı (min-max)

Gruplar* (Sayı)	1. gün (gr)	2. gün (gr)	3. gün (gr)
Grup I (Kontrol, n:7)	5.9 (4.8-6.9)	6.9 (5.5-8.2)	8.1 (6.0-9.5)
Grup II (NEK, n:7)	5.9 (5.1-6.3)	6.2 (5.6-7.0)	7.3 (6.7-8.5)
Grup III (NEK+Karnozin, n:7)	5.7 (5.1-6.6)	6.6 (5.5-7.0)	7.4 (6.4-8.0)
Grup IV (NEK+EGb 761, n:7)	5.7 (4.6-6.7)	6.1 (5.2-7.0)	7.0 (6.3-7.5)
Grup V (NEK+klaritromisin, n:7)	6.1 (5.2-6.9)	6.3 (5.7-7.8)	6.7 (6.1-8.5)

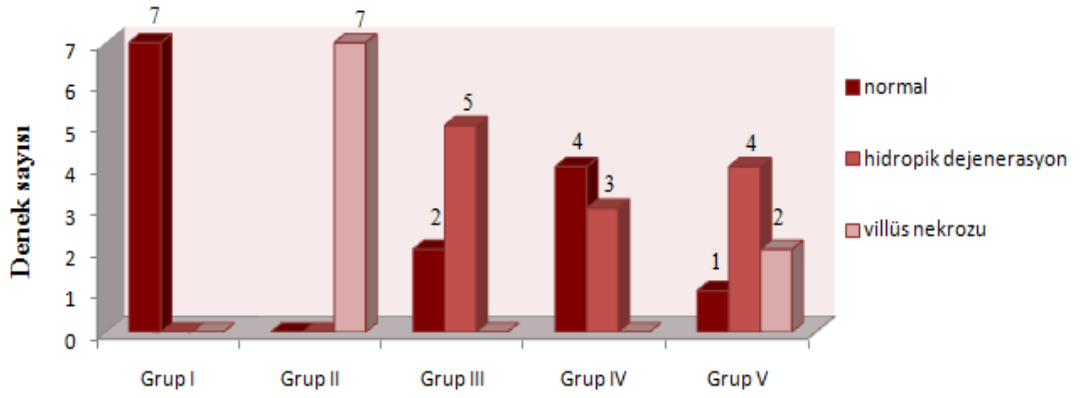
* : Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Barsakların histopatolojik incelemesinde; Grup I'deki ratların hepsi normal histopatolojik (*grade* 1) yapıya sahipken (Şekil 5,7), grup II'deki tüm ratların barsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar, mikroskopik olarak villüs epitel hücre nekrozu (*grade* 3) saptandı (Şekil 5,9-A). Barsakların histopatolojik incelemesi Grup III ve grup IV ratlarda *grade* 1 ile *grade* 2, grup V ratlarda *grade* 1 ile *grade* 3 arasında değişiyordu (Şekil 6,8,9-B). Grup I, III, IV ve V ile karşılaştırıldığında, grup II ratların barsak histopatolojik skoru istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.008$, Tablo 3). Bu bulgular ışığında H/RO yöntemiyle rat

yavrularının barsaklarında histopatolojik olarak *grade 3* hasarlanma meydana geldiği, karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisin H/RO modeli ile NEK oluşturulan rat yavrularının barsaklarında NEK'e karşı histopatolojik olarak belirgin iyileşme sağladığı görüldü.



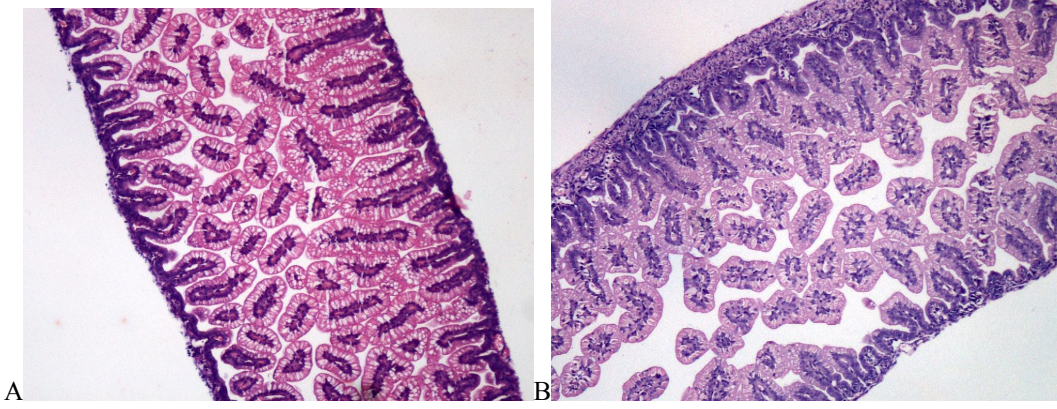
Şekil-5: Grup I ve Grup II deki ratların barsaklarının makroskobik görünümü



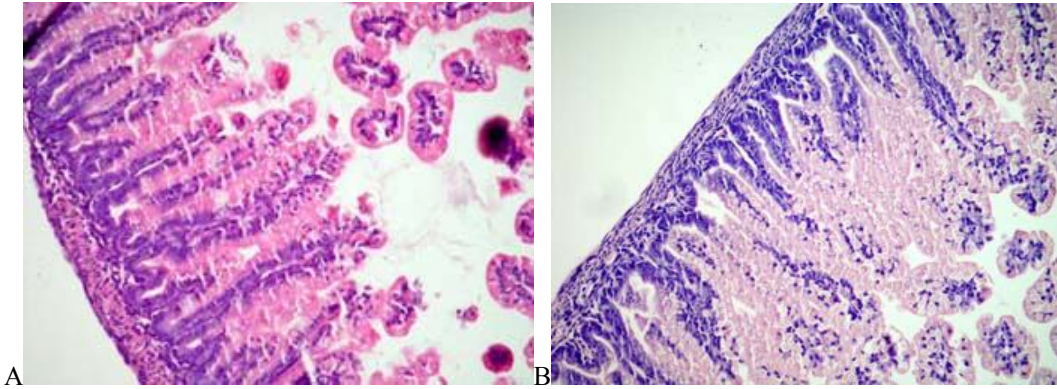
Şekil-6: Gruplardaki ratların histopatolojik skora göre dağılımı



Şekil-7: Normal histoloji, *grade 1*. Grup I (H&E, x1/100).



Şekil-8: Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, *grade 2*. A: Grup III, H&E, x1/100.
B: Grup IV, H&E, x1/100.



Şekil-9: Villus epitel hücre nekrozu, *grade 3*. A: Grup II, H&E, x1/160. B: Grup V, H&E, x1/200.

Tablo-3: Gruplara göre rat barsaklarının histopatolojik değerlendirme (*grade*) skorları (median ve dağılımı).

Gruplar	Histopatolojik <i>Grade</i> Median (Range)
Grup I (Kontrol)	1.0 (1-1)
Grup II (NEK)	3.0 (3-3)*
Grup III (NEK+Karnozin)	2.0 (1-2)
Grup IV (NEK+EGb 761)	1.0 (1-2)
Grup V (NEK+Klaritromisin)	2.0 (1-3)

*: Grup II ile grup I, III, IV ve V arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.008$).

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın barsak doku düzeyi değerlendirildiğinde, grup I'de en düşük, grup II'de en yüksek MDA düzeyi saptandı. Grup II barsak doku MDA düzeyinin grup I'e göre belirgin artış gösterdiği saptandı ($p = 0.003$). Grup III, IV, V'deki ratların MDA düzeyleri grup II ile karşılaştırıldığında, MDA düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu (sırasıyla $p = 0.03$, $p = 0.009$, $p = 0.004$), grup I ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p > 0.05$). H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ratlarda, H/RO'nun NEK'te barsak doku MDA düzeyini belirgin arttırdığı, karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin barsak MDA düzeyini anlamlı azalttığı saptandı (Tablo 4).

NEK patogenezinde önemli bir mediatör olan NO'nun barsak doku düzeyleri incelendiğinde, en yüksek NO düzeyi grup II'de saptandı. Grup II'deki ratların barsak doku NO düzeyinin grup I'e göre belirgin artış gösterdiği görüldü. ($p = 0.004$). Grup III, IV'deki NO düzeylerinin grup II'ye göre anlamlı olarak daha düşük olduğu (sırasıyla $p = 0.009$, $p = 0.003$), grup I ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı görüldü. Grup V deki NO düzeyi hem grup I, hem grup II'ye göre anlamlı düşük saptandı. ($p = 0.01$, $p = 0.002$). NO'nun barsak doku düzeyinin NEK'te belirgin olarak arttığı, karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin NEK'te oluşan NO düzeyini belirgin olarak azalttığı saptandı (Tablo 4).

Proinflamatuvar bir mediatör olan IL-6'nın barsak doku düzeyleri değerlendirildiğinde, en yüksek IL-6 düzeyi grup II'de saptandı. Grup II'nin barsak doku IL-6 düzeyinin grup I'e göre belirgin yüksek olduğu saptandı ($p=0.01$). Grup III, IV, V deki IL-6 düzeylerinin, grup II ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğu (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.02$, $p=0.02$), grup I ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p>0.05$). H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulan rat yavrularında, H/RO'nun NEK'te barsak doku IL-6 düzeyini belirgin arttırdığı, karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin barsak IL-6 düzeyini anlamlı azalttığı saptandı (Tablo 4).

NEK'te başlangıç mediatör olarak kabul edilen TNF- α düzeyleri değerlendirildiğinde, en yüksek TNF- α düzeyi grup II'de saptandı. Grup II'nin barsak doku TNF- α düzeyinin grup I'e göre belirgin yüksek olduğu saptandı ($p=0.03$). Grup III'deki TNF- α düzeyi grup II'ye göre daha düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup IV ve V'deki TNF- α düzeyi, grup II ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşük idi (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.004$). Grup I ile grup III, IV ve V'in TNF- α düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). TNF- α 'nın barsak doku düzeyinin NEK'te belirgin olarak arttığı, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin NEK'te barsak doku TNF- α düzeyini belirgin olarak azalttığı saptandı (Tablo 4).

Antiinflamatuvar bir mediatör olan IL-10'nun doku düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek IL-10 düzeyinin grup II'de olduğu, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 5).

Antioksidatif sistem değerlendirilmesinde, en yüksek doku GSH düzeyi grup I'de saptandı. Grup I'deki GSH düzeyi grup II'ye göre yüksek olmakla birlikte tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 5).

Doku GSH-Px enzim aktivitesi değerlendirildiğinde, doku GSH-Px enzim aktivitesi grup I'de en yüksek, grup III'de en düşük saptandı. Gruplar karşılaştırıldığında, grup I'deki GSH-Px aktivitesinin grup III'e göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görüldü ($p=0.01$). Grup II'deki GSH-Px aktivitesi Grup III'e

göre yüksek, ancak istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$). Grup IV ve V deki GSH-Px enzim aktivitesi grup II'ye göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$) (Tablo 5).

Tablo-4: Grupların barsak doku (yaş doku başına) malonildialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) düzeyleri (median ve dağılımı)

Gruplar	MDA $\mu\text{mol/g}$	NO $\mu\text{mol/g}$	IL-6 pg/mg	TNF- α ng/g
Grup I (Kontrol)	0.20* (0.08-0.48)	1.1‡ (0.6-1.9)	149.0¶ (88.5-269.0)	8.9†† (2.9-14.3)
Grup II (NEK)	0.65† (0.33-0.82)	2.3§ (1.3-3.3)	252.5** (197.5-436.8)	15.1‡‡ (7.4-33.3)
Grup III (NEK+Karnozin)	0.5 (0.16-0.63)	1.2 (0.6-1.5)	130.5 (89.5-190.5)	9.6 (5.1-14.1)
Grup IV (NEK+EGb 761)	0.35 (0.14-0.41)	1.0 (0.3-1.3)	193.0 (110.5-251.5)	4,3 (0.1-8,1)
Grup V (NEK+Klaritromisin)	0.30 (0.23-0.40)	0.7 (0.4-0.9)	157.5 (76.5-262.5)	2,0 (0.06-9.5)

* : Grup I ile grup II arasında $p<0.05$ ($p=0.003$).

† : Grup II ile grup III, IV ve V arasında $p<0.05$ (sırasıyla $p=0.03$, $p=0.009$, $p=0.004$).

‡ : Grup I ile grup II arasında $p<0.05$ ($p=0.004$)

§ : Grup II ile grup III ve IV arasında $p<0.05$ (sırasıyla $p=0.009$, $p=0.003$).

|| : Grup V ile grup I ve II arasında $p<0.05$ (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.002$).

¶ : Grup I ile grup II arasında $p<0.05$ ($p=0.01$).

** : Grup II ile grup III, IV ve V arasında $p<0.05$ (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.02$, $p=0.02$).

†† : Grup I ile grup II arasında $p<0.05$ ($p=0.03$).

‡‡ : Grup II ile grup IV ve V arasında $p<0.05$ (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.004$).

Doku GR enzim aktivitesi değerlendirildiğinde, grup I'deki GR enzim aktivitesi grup II, III, V'e göre yüksek, grup IV'e göre düşük olmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Grup III, IV ve

V'deki GR aktivitesi grup II'ye göre yüksek bulundu, ancak grup IV ve V ile grup II arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.001$) (Talo 5).

Antioksidan enzimlerden doku CAT enzim aktivitesi incelendiğinde, grup I'deki CAT enzim aktivitesi grup II, III, IV, V'e göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık grup I ile grup II ve III arasında saptandı (sırasıyla $p=0.03$, $p=0.004$). Grup III, IV ve V'deki katalaz aktivitesi grup II'ye göre düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 5).

Tablo-5: Grupların barsak doku (yaş doku başına) interlökin-10 (IL-10), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon peroksidaz (GR), katalaz (CAT) enzim aktiviteleri (median ve dağılımı)

Gruplar	IL-10 pg/g	GSH mg/g	GSH-Px mU/g	GR mU/g	CAT U/g
Grup I (Kontrol)	13.8 (3.6-76.5)	6.9 (3.7-19.4)	2694* (1911-4981)	9125 (2163-13900)	37.9‡ (27.5-118.0)
Grup II (NEK)	63.0 (24.4-194.8)	3.9 (3,5-7,1)	2096 (1060-3403)	6159† (2871-6721)	27.6 (13,6-54,5)
Grup III (NEK+Karnozin)	26.6 (9.0-49.2)	3.8 (3.5-5.7)	1405 (1060-2231)	7382 (3767-12862)	22,4 (15.0-28.6)
Grup IV (NEK+EGb 761)	60.4 (48.3-71.7)	4.2 (3.8-7,8)	2675 (2059-4784)	10183 (7993-14154)	26.6 (13.3-55.1)
Grup V (NEK+Klaritromisin)	41.1 (21.8-54.0)	4.1 (3.7-5.0)	2219 (1874-3181)	8554 (7739-10081)	23.3 (13.3-55.0)

* : Grup I ile grup III arasında $p<0.05$ ($p=0.01$).

† : Grup II ile grup IV ve V arasında $p<0.05$ (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.001$).

‡ : Grup I ile grup II ve III arasında $p<0.05$ (sırasıyla $p=0.03$, $p=0.004$).

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 (2). Hastalığın önlenmesi ve tedavisi konusunda benimsenmiş etkin bir yöntem bulunmadığından; mortalitesi ve morbiditesi yüksektir (24). Son 30 yıldan beri yapılan çalışmalara rağmen halen mortalite %10-50 arasında değişmektedir (25-27). Yüksek mortalite oranı, uzun dönemde ciddi komplikasyonların gelişmesi ve hastane masraflarının fazla olması, NEK tedavisine yönelik çalışmalara ne kadar ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Nekrotizan enterokolit olgularının %90'nını prematüre yenidoğan bebekler oluşturmaktadır (1,30). Deneysel çalışmalarda 7-14 günlük ratların santral sinir sistemi gelişiminin term bebeklere, yedi günden küçük rat yavrularında ise bu gelişimin preterm bebeklere karşılık geldiği belirtilmektedir (114). NEK bir prematüre hastalığı olduğu için, çalışmamıza prematüre yenidoğana karşılık gelen postnatal 1-4 günlük rat yavruları alındı.

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 (30). Bu faktörler eşliğinde serbest oksijen radikalleri, aktive lökositler, PAF, TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar mediatörler aracılığıyla NEK'te ortak son olan barsak nekrozu gelişmektedir (1,9,35,64,69).

Bugüne kadar oluşturulan NEK modelleri, patogeneze en fazla suçlanan prematürite, hipoksik-iskemik hasar, formula mama ile beslenme, enfeksiyon

temeline dayandırılmaktadır. Bu modellerle oluşturulan barsak hasarlarında histopatolojik ve biyokimyasal olarak NEK benzeri değişiklikler gösterilmiştir.

Caplan ve arkadaşları patogeneizde suçlanan faktörleri araştırmışlar; 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 asfiksinin NEK'te kritik başlangıç faktör olduğu belirtilmiştir (115).

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 (69,70). Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, proteinlerin disülfid bağlarında bozulma, DNA hasarı oluşturarak ve inflamatuvar hücrelerde aktivasyona neden olarak hücre hasarını gerçekleştirmektedir.

Okur ve arkadaşları rat yavrularında yeni bir yöntemle, 5 dakika %100 CO₂ solutarak hipoksi, 5 dakika %100 O₂ solutarak reoksijenizasyon sağladıklarını, bunun sonucunda deneklerin barsak kesitlerinde ışık mikroskobunda kolayca izlenebilen NEK'in karakteristik değişikliklerini oluşturduklarını bildirmişlerdir (3). Başka pek çok deneysel çalışmada Okur ve arkadaşlarının yöntemi uygulanmış, histopatolojik ve biyokimyasal olarak insanlardaki NEK'e benzer barsak doku hasarlanmasının meydana geldiği gösterilmiştir (3-8). Çalışmamızda da Okur ve arkadaşlarının yöntemi uygulandı. Bu yöntemi tercih etmemizin nedeni sonuçların tatminkar düzeyde olması, kolay uygulanabilir olması, tamamen anne bağımlı yenidoğan ratlarda formula mama ile oluşturulacak bir modelin uygulama güçlüğüdür.

Bu çalışmada H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulan rat yavrularına karnozin 250 mg/kg/gün, ginkgo alkaloidi 100 mg/kg/gün, ve klaritromisin 40 mg/kg/gün, ip uygulanarak, bu ilaçların histopatolojik ve biyokimyasal olarak NEK'te etkinliği araştırıldı. Karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin H/RO sonrası NEK'teki etkinliğini araştırılan bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Caplan ve arkadaşları, suçlanan etkenlere (hipoksi, formula ile beslenme, bakteri) maruziyetten sonra ilk 36 saat içinde NEK'in başladığını belirtmişlerdir (115). Bu çalışmada, H/RO ile intestinal hasar oluşturulan ratlarda, belirtilen ilaçların erken uygulamasının inflamatuvar mediatörlerin ve serbest oksijen radikallerinin hücre hasarı yapıcı etkilerini ortadan kaldırmada profilaktik tedavi kadar etkin olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisin ilk dozları H/RO'dan hemen sonra uygulandı ve NEK şiddetinde azalma olduğu gösterildi. NEK'te oluşan intestinal hücre harabiyeti nedeniyle, oral yoldan verilen ilaçların emiliminin gerçekleşmeyeceğini düşünerek, karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisin ip olarak uygulandı.

Çalışmamızda H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen ratların terminal ileumundan alınan barsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar, mikroskopik olarak villüs epitel hücre nekrozu (*grade 3*) saptanırken, kontrol grubu tümüyle normal histolojiye (*grade 1*) sahipti. Histopatolojik değerlendirmede bulgularımız, uyguladığımız H/RO modeli ile yapılan önceki deneysel çalışmalardaki NEK grubu barsak histopatolojik bulguları ile benzerdi (3,7). Caplan ve arkadaşları hipoksinin hafif mukozal hasar yaparak NEK başlangıcında kritik rol oynadığını, enfeksiyon gibi diğer etkenlerin katkısıyla mukozal hasarın daha da arttığını belirtmişlerdir (9). Çalışmamızda NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen grupta *grade 4* ve *5* hasar elde edilememesinin, patogenezi multifaktöriyel olan NEK'te sadece H/RO yöntemini uygulamamızdan kaynaklandığını düşünüyoruz. Bununla birlikte çalışmamızda, önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi H/RO'nun NEK patogenezinde önemli bir risk faktörü olduğu gösterildi.

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 belirteçdir. H/RO yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ratlarda MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (3-8). Çalışmamızda, literatürdeki çalışmalara benzer olarak NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen grupta barsak doku MDA düzeylerini kontrol grubuna göre

belirgin yüksek saptadık. Bu çalışma ile serbest oksijen radikallerinin NEK patogenezinde rol oynadığı bir kez daha gösterilmiş oldu.

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) yardımıyla L-arginin ve oksijenden sentezlenmektedir. NO düzeyi NOS'un üç izoenzimi tarafından kontrol edilmektedir. NO vücutta hem prooksidan hem de antioksidan etkiye sahip bir moleküldür. Bu etkinlik NO'in hangi izoenzim tarafından sentezlendiği ile ilişkilidir. eNOS ve nNOS tarafından üretilen NO sitoprotektif etkiye sahipken, iNOS tarafından üretilen NO süperoksit radikali ile reaksiyona girerek son derece toksik olan peroksinitrite dönüşmektedir. (2).

Sandoval ve arkadaşları, insan intestinal epitel hücrelerinin ve mürin makrofajların peroksinitrit ile inkübasyon sonucu apoptozise uğradığını; 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 (87,116).

Zamora ve arkadaşları H/RO 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 (117). Zhang ve arkadaşları, çalışmamızdaki gibi H/RO yöntemiyle NEK oluşturdukları ratlarda kontrol grubuna göre barsak doku NO düzeyini belirgin yüksek saptamışlardır (4). Çalışmamızda NEK grubunda barsak doku NO düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptadık. Çalışmamızın sonuçları ve literatür bilgileri ışığında NO'nun NEK gelişiminde inflamatuvar bir mediatör olarak çok önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

TNF- α , PAF ile birlikte NEK'e neden olan inflamatuvar kaskadın oluşumunda ana rol oynamaktadır. TNF- α , PAF'ın da içinde bulunduğu birçok proinflamatuvar mediatörlerin üretimini, PNL'den serbest oksijen radikallerinin salınımını, barsak epitel hücrelerinin apoptozisini başlatmaktadır (71).

Caplan ve arkadaşları NEK'li yenidoğanlarda plazma TNF- α düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğunu saptamış ve TNF- α 'nın NEK patogenezindeki önemini vurgulamışlardır (74). Travadi ve arkadaşları NEK oluşturulan preterm ratlara TNF- α üretimini azaltan pentoksifilin uygulaması ile plasebo grubuna göre NEK şiddetinin ve insidansının azaldığını göstermişlerdir (71).

Halpern ve arkadaşlarının yaptığı bir başka deneysel çalışmada, NEK oluşturulmuş preterm ratlara verilen monoklonal TNF- α antikorunun, tedavi verilmeyen NEK grubuna göre NEK insidansını ve şiddetini anlamlı azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada tedavi verilen grupta hepatik TNF- α , hepatik ve barsak doku interlökin-18 (IL-18) düzeylerinin belirgin azaldığı saptanmıştır (118). Zhang ve arkadaşları NEK oluşturdukları ratlarda kontrol grubuna göre barsak doku TNF- α düzeyinin anlamlı yüksek olduğunu göstermişlerdir (4). Çalışmamızda da NEK modeli oluşturulan grupta kontrol grubuna göre TNF- α düzeyini belirgin yüksek saptadık. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumlu bulundu.

Başka bir proinflamatuvar mediatör olan IL-6 düzeyinin NEK'te arttığı önceki çalışmalarda gösterildi (89,119,120). IL-6 ve onunla ilişkili reseptörler barsak endotel hücreleri, makrofajlar ve epitel hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Sitotoksik T hücrelerin farklılaşmasını ve B hücrelerinin antikor sekresyonunu uyaran IL-6, aynı zamanda akut faz reaktanların major aktivatörüdür (72).

Goepfert ve arkadaşları, 32 haftanın altında doğan 309 prematüre bebekte umbilikal kord plazma IL-6 düzeyi ile morbidite arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve sistemik inflamatuvar cevap sendromu, NEK, periventriküler lökomalazi ve respiratuvar distres sendromu gelişen yenidoğanlarda IL-6 düzeyinin anlamlı yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bunun sonucunda umbilikal kord plazma IL-6 düzeyi artışı ile neonatal morbidite artışı arasında progressif bir ilişki olduğunu savunmuşlardır (89).

Duffy ve arkadaşları tarafından 60 prematüre bebekte yapılan başka bir çalışmada ise, evre II ve III NEK gelişen yenidoğanların gaytasındaki IL-6 düzeyinin NEK gelişmeyenlere göre anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır (119). Romagnoli ve

arkadaşları NEK, sepsis, pnömoni nedeniyle hastaneye kabul edilen 39 prematüre yenidoğanın plazma IL-6 düzeyinin kontrol grubuna göre belirgin yüksek olduğunu göstermişlerdir (120). Çalışmamızda NEK grubunda barsak dokusunda IL-6 düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptadık. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgilerini destekler nitelikte bulundu.

IL-10, proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe eden güçlü antiinflamatuvar sitokin olarak bilinmektedir. T *helper* 2, monosit ve B hücrelerinden sentezlenir. Riordian ve arkadaşları 131 meningokoksemili çocuk hastada IL-10 konsantrasyonu ile TNF- α ve IL-6 konsantrasyonları arasında pozitif korelasyonunun olduğunu, ölen çocuklarda IL-10 düzeyinin anlamlı yüksek olduğunu saptamışlardır (121).

Edelson ve arkadaşlarının çalışmasında evre III NEK olan yenidoğanlarda IL-10 düzeyinin belirgin yüksek olduğu gösterilmiştir (122). Romagnoli ve arkadaşları yukarıda sözü edilen çalışmada IL-6 ile birlikte IL-10 düzeyinin de kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğunu göstermişlerdir (120). Bu bulgular hastalığın akut fazından sonra artan inflamatuvar cevabı azaltmak için sistemik antiinflamatuvar cevabın oluştuğunu ve bu yüzden IL-10 artışının meydana geldiğini düşündürmektedir.

Öztürk ve arkadaşları çalışmamızda uygulanan H/RO yöntemiyle NEK oluşturdukları ratlarda, *recombinant human* IL-10 ile mukoza hasarında ve barsak doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu göstermişlerdir (7). Bu çalışma inflamasyonu baskılamada IL-10'un önemini vurgulamaktadır. Çalışmamızda barsak IL-10 düzeyi NEK grubunda en yüksek saptanmakla birlikte, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı. İnflamasyona yanıt olarak arttığı düşünülen IL-10 düzeyinde anlamlı artışın olmamasını ileri derecede intestinal hasarlanma elde edememizden kaynaklandığını düşünüyoruz.

Hipoksi-reoksijenizasyon sonrası yoğun olarak ortama salıverilen 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.

Hücre içi en önemli antioksidan defans sistemlerinden birisi glutatyon metabolizmasıdır (10). Önemli bir indirgeyici ajan olan glutatyon, hücrenin oksidoreduksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. GSH-Px, selenyum içeren ve sitozolde bulunan bir enzimdir. GSH'yi kullanarak çeşitli hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini sağlar. Böylece oksidatif hasara karşı hücreleri korur. GR, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar GSH'ye dönüşümünü katalize eder. 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.

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 (10,68).

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 değerlendirildiğinde de kord total antioksidan kapasite ile gestasyonel yaşın pozitif korelasyonu gösterilmiştir (68). Ancak bu çalışmada total antioksidan kapasite ile serbest oksijen radikalleri ile ilişkili hastalıklar arasında anlamlılık saptanmamıştır.

Nycyk ve arkadaşları ventilatöre bağlı 57 prematüre yenidoğanın soluk 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 (123). Bu literatür bilgileri altında prematüre yenidoğanlarda antioksidan kapasitenin yetersiz oluşu NEK gelişimine katkıda bulunabilir. Çalışmamızda, antioksidan defans sistemlerinden GSH düzeyi, GSH-Px, GR, CAT enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde, dört parametrenin de NEK grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu, ancak sadece CAT aktivitesi düşüklüğünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Böylece antioksidatif defans sistemlerinden birisi olan CAT enzim aktivitesinin NEK'te belirgin olarak azalmış olduğu gösterildi.

Suda çözünme özelliğinden dolayı karnozin, geçiş metalleri ve oksijen radikalleri gibi suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin yüksek konsantrasyonda bulunduğu sitozolik çevrede antioksidan özelliği göstermektedir. Karnozin aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerini temizlemekte ve *singlet* oksijen molekülünü çok kuvvetli olarak inaktive etmektedir (11-14). Ayrıca, demir veya bakır gibi elementlerle geçici şelasyonlar yapması da antioksidan etkisine katkıda bulunmaktadır. Karnozinin antioksidan özelliği sayesinde lipid peroksidasyonunu engellemesinin yanısıra, aynı zamanda peroksidasyon süresince oluşan MDA gibi ürünlerin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (13). Önceki çalışmalarda bu özelliklerinden yola çıkılarak birçok deneysel modelde etkisi denenmiştir. Çalışmamızda da 250 mg/kg tek dozda uygulanan karnozinin NEK'te etkinliği araştırıldı.

Baykara ve arkadaşları iskemi-reperfüzyon ile ratlarda oluşturdukları karaciğer hasarında iskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyondan hemen sonra 250 mg/kg dozda ip olarak uygulanan karnozinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda karnozinin, iskemi-reperfüzyon grubuna göre karaciğer hasarında

histopatolojik olarak belirgin düzelme sağladığı, GSH düzeyini anlamlı olarak arttırdığı, oksidatif strese yanıt olarak lökositlerden salınan miyeloperoksidaz enzimini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (124).

Yan ve arkadaşları farelerde asetaminofen ile oluşturulan karaciğer hasarından önce dört hafta boyunca oral verilen karnozinin ve histidinin etkisini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda karnozinin ve histidinin, belirgin olarak GSH'yı arttırdığı, GSSG, MDA, serbest oksijen radikallerini azalttığı, GSH-Px ve CAT aktivitelerini arttırdığı, böylece asetaminofenin neden olduğu oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada karnozinin, asetaminofen tarafından arttırılan TNF- α , IL-6, IL-10 ve monosit kemoatraktan proteinini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre karnozinin antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajan olduğu belirtilmiştir (125).

Fujii ve arkadaşları tarafından iskemi-reperfüzyon modeliyle akut renal yetmezlik oluşturulan ratlarda, iskemiden 5 dakika önce ve reperfüzyondan 5 dakika sonra 10 μ g/kg dozda verilen karnozinin her iki grupta da, tedavi verilmeyen akut renal yetmezlikli gruba göre artmış olan sempatik aktiviteyi anlamlı azaltarak renal fonksiyonları düzelttiği gösterilmiştir (126).

Stvolinsky ve arkadaşlarının karotid arter oklüzyonu ile global beyin iskemisi oluşturdukları ratlarda, oklüzyondan 30 dakika önce 150 mg/kg dozda verilen karnozinin, yaşam süresini anlamlı olarak arttırdığı tespit edilmiştir. Bu etkinin karnozinin antioksidan özelliğinin yanında, Na/K-ATPase ve monoaminooksidaz B enzimini arttırarak ortaya çıktığı gösterilmiştir (127). Rajanikant ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada, kalıcı serebral iskemi oluşturdukları farelere iskemi öncesi ve sonrası uygulanan karnozinin serbest oksijen radikallerini azalttığı, ekstra selüler matriksi parçalayarak doku yıkımına neden olan matriks metallo proteinaz enzim aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (128). Hipkiss ve arkadaşlarının çalışmasında karnozinin, rat beyin endotel hücrelerini MDA toksisitesine karşı koruduğu gösterilmiştir (129). Nicoletti ve arkadaşlarının çalışmasında ise rat astroglial hücre kültürlerinde, karnozinin NO ile direkt etkileşime girerek NO'in zararlı etkilerinden koruduğu saptanmıştır (130).

Karnozinin, iskemik hasarlanma sonucu kardiyak yetmezlik gelişen ratlarda, antioksidan özelliğinin yanı sıra direkt Ca kanalına (RYR2) etki ederek, hücre içi kalsiyum dengesini değiştirdiği ve böylece kardiyak kontraktiletiyi iyileştirdiği gösterilmiştir (93). Ririe ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı başka bir çalışmada ise cGMP düzeyini arttırarak vazodilatatör etkinliği gösterilmiştir (94).

Çalışmamızda, karnozinin histopatolojik olarak NEK'te belirgin düzelme sağladığı gösterildi. Ayrıca, proinflamatuvar mediatörlerden IL-6, NO düzeyini ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'yı NEK grubuna göre anlamlı oranda azalttığı, ancak antioksidatif defans sistemlerinden GSH, GSH-Px, GR ve CAT düzeyini etkilemediği saptandı. Elde ettiğimiz sonuçlar karnozinin antioksidan etkinliğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışma ile karnozinin antioksidatif enzim aktivitelerini etkilemediği gösterildi. Biz de antioksidan etkisini önceki çalışmalarda belirtildiği gibi serbest oksijen radikalleri ile direk etkileşime girerek veya geçiş metal iyonları ile şelasyon oluşturarak gösterdiği kanısındayız. Bu çalışma ile literatürde ilk kez karnozinin NEK'te antioksidatif özellikleriyle belirgin düzelme sağladığı gösterildi.

Ginkgo biloba ekstresinin iskemi-reperfüzyon ile hasar oluşturulmuş dokular üzerine etkisini araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır. Önceki çalışmalarda EGb 761'in serbest oksijen radikalleri için *scavenger* görevi yaptığı ve bu özelliğinden dolayı lipit peroksidasyonunu önlediği (15-17), süperoksit dismutaz, CAT gibi antioksidan enzimleri arttırdığı, MDA üretimini azalttığı gösterilmiştir (18-21). Ayrıca NEK patogenezinde önemli yere sahip olan NO oluşumunu iNOS ekspresyonunu inhibe ederek azalttığı saptanmıştır (15,20,21). Çalışmamızda, EGb 761'in bu özellikleri göz önünde tutularak literatürde ilk kez H/RO yöntemiyle NEK oluşturulan ratlardaki etkinliği araştırıldı.

Çolak ve arkadaşları strongülasyon ileusu oluşturdukları ratlarda reperfüzyondan sonra 100 mg/kg tek dozda verdikleri EGb 761 in barsak üzerine etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda EGb 761'in plasebo grubuna göre MDA düzeyini anlamlı azalttığını, CAT aktivitesini anlamlı arttırdığını rapor

etmişlerdir (19). Yenilmez ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada ise iskemi- reperfüzyon modeli ile mesane hasarı oluşturulan ratlarda iskemiden 60 dakika önce ip uygulanan EGb 761'in, iskemi reperfüzyon grubuna göre mesane kontraksiyonunu anlamlı derecede arttırdığı, lökosit infiltrasyonunu ve apoptotik hücre sayısını anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır. Aynı çalışmada 50 mg/kg dozda uygulanan EGb 761'in değil, 100 mg/kg dozda verilen EGb 761'in iskemi-reperfüzyon grubuna göre mesane kontraksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (131). Bu literatür bilgileri ışığında çalışmamızda EGb 761 dozunu 100 mg/kg olarak uygulandı.

Şener ve arkadaşları, iskemi-reperfüzyon yöntemi ile oluşturdukları böbrek hasarında, iskemiden 15 dakika önce ve reperfüzyondan hemen sonra 50 mg/kg iki dozda ip uyguladıkları EGb 761'in histopatolojik ve biyokimyasal etkilerini araştırmışlardır. İskemi-reperfüzyon grubuna göre EGb 761'in histopatolojik olarak belirgin düzelme sağladığı, böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği, doku TNF- α , MDA düzeyini, miyeloperoksidaz aktivitesini, reaktif oksijen ürünlerini anlamlı azalttığı, GSH düzeyini koruduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda EGb 761'in renoprotektif etkisinin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı belirtilmiştir (132).

Liu ve arkadaşlarının intestinal iskemi-reperfüzyon modeli ile akciğer hasarı oluşturdukları yetişkin ratlarda, iskemi-reperfüzyon öncesi 100 mg/kg oral yolla yedi gün uygulanan EGb 761'in akciğer hasarlanmasını belirgin olarak azalttığı histopatolojik olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada EGb 761'in miyeloperoksidaz aktivitesini, MDA düzeyini ve NO üretimini belirgin şekilde azalttığı, buna karşın süperoksit dismutaz aktivitesini belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir. NO düzeyinin azalması iNOS ekspresyonunun baskılanması ile açıklanmıştır (21). Başka bir çalışmada ise iskemi-reperfüzyon modeli ile miyokard hasarı oluşturulan ratlarda EGb 761'in serbest oksijen radikallerini inhibe ederek lipid peroksidasyonunu önlediği, NO düzeylerini etkileyerek kalp üzerine koruyucu etkisi gösterilmiştir (16).

Calapai ve arkadaşlarının iskemi-reperfüzyon modeli ile oluşturdukları beyin hasarında, iskemiden önce 15 gün süre ile oral yoldan verdikleri EGb 761'in plasebo

grubuna göre doz bağımlı (75 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında) olarak MDA düzeyini, NO üretimini ve beyin ödemi anlamlı olarak azalttığı, nöron ölümünü geciktirdiği gösterilmiştir (20).

Cheung ve arkadaşları, rat endotel hücre kültürleri ile inkübe edilen EGb 761'in, kontrol grubuna göre iNOS *messenger* RNA ve protein konsantrasyonu ile birlikte iNOS aktivitesini %28 azalttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada EGb 761'in yapısal NOS protein konsantrasyonunda ve aktivitesinde değişiklik oluşturmadığı saptanmış ve iNOS'u spesifik olarak inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (133).

Ilieva ve arkadaşları, LPS ile gözde oluşturulan inflamasyonda, EGb 761 ile prednisolonun antiinflamatuvar etkinliğini karşılaştırmışlardır. Çalışmada EGb 761'in, tedavi verilmeyen inflamasyon grubuna göre prostoglandin E2, TNF- α , NO düzeylerini anlamlı azalttığı ve bu etkinin prednisolon grubu ile benzer olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada EGb 761'in iNOS protein ekspresyonunu anlamlı azalttığı saptanmıştır (134). iNOS, TNF- α , siklookijenaz 2, NF- κ B gibi inflamasyonda görevli enzim ve mediatörlerin transkripsiyon faktörleri aynı bağlanma bölgesine sahiptirler. Dolayısıyla birbirlerinin düzeylerini etkilerler. EGb 761'in antiinflamatuvar etkisini iNOS ekspresyonunu inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, EGb 761'in NEK'te histopatolojik olarak belirgin düzelme sağladığı gösterildi. Bununla birlikte proinflamatuvar mediatörlerden IL-6, NO ve TNF- α düzeyini ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'yı NEK grubuna göre anlamlı oranda azalttığı, antioksidatif enzimlerden GR aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı saptandı. Diğer antioksidan enzim aktivitelerini değiştirmedeği görüldü. Elde ettiğimiz sonuçlara göre EGb 761'in antioksidan etkileri ile NEK'te belirgin düzelme sağladığını düşünmekteyiz.

Makrolid grubu antibiyotikler, antibakteriyel özelliklerinden bağımsız olarak, antiinflamatuvar amaçla diffüz panbronşiolit, kistik fibrozis gibi kronik inflamasyonla seyreden hastalıklarda başarıyla kullanılmaktadır (99,100).

Klaritromisin, makrolid grubu bir antibiyotik olup, çalışmalarda mukus salınımını azalttığı, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yapımını baskıladığı, inflamasyon alanına nötrofil göçünü engellediği gösterilmiştir. Çalışmamızda klaritromisinin antiinflamatuvar etkisinden yola çıkarak inflamasyon ve nekrozla seyreden NEK'teki etkinliği araştırıldı.

Hardy ve arkadaşları, *mycoplasma pneumoniae* ile farelerde oluşturdukları pnömonide 25 mg/kg dozda subkutan uygulanan klaritromisinin plasebo grubuna göre bronkoalveoler lavaj sıvısındaki TNF- α , IL-6, IL-8, γ interferon düzeylerini ve *mycoplasma pneumoniae* miktarını anlamlı olarak azalttığını, histopatolojik olarak belirgin düzelmeye sağladığını göstermişlerdir. Çalışmanın sonucunda klaritromisinin antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkisi ile yarar sağladığı belirtilmiştir (23).

Ianora ve arkadaşlarının çalışmasında plörezi oluşturulan ratlara işlem öncesi sırasıyla 10, 20 ve 40 mg/kg dozda oral yolla klaritromisin verilmiş ve ilacın antiinflamatuvar yanıtı değerlendirilmiştir. Klaritromisinin 10 mg/kg dozda histolojik ve biyokimyasal olarak değişikliğe neden olmazken; 20-40 mg/kg dozda plevral eksuda sıvısında NO, TNF- α ve IL-6 düzeylerini belirgin olarak azalttığı; ancak sadece 40 mg/kg dozda anlamlı olarak eksuda sıvısını azalttığı, lökosit migrasyonunu engellediği gösterilmiştir (22). Çalışmada klaritromisinin antiinflamatuvar etkisinin iNOS ve siklooksijenaz 2 enzim inhibisyonu ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

Giamarellos-Bourboulis ve arkadaşlarının çoklu ilaç direnci olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* ile oluşturdukları sepsis modelinde 80 mg/kg dozda intravenöz uygulanan klaritromisinin, plasebo grubuna göre serum MDA ve TNF- α düzeylerini belirgin oranda azalttığı saptanmış ve bu etki klaritromisinin nötrofilik oksidatif yıkımı engellemesine ve monositlerden TNF- α salınımını azaltmasına bağlanmıştır (102,107). Ayrıca başka bir çalışmada klaritromisinin NF- κ B inhibisyonu aracılığıyla inflamasyonda görev alan IL-8' in üretimini azalttığı gösterilmiştir (103). Çalışmalar sonucunda klaritromisinin antiinflamatuvar etkisinin olduğu ancak etki mekanizmasının tam olarak açıklanamadığı belirtilmektedir.

Çalışmamızda 40 mg/kg dozda ip uygulanan klaritromisinin histopatolojik olarak NEK'te belirgin düzelme sağladığı saptandı. Bununla birlikte proinflamatuvar mediatörlerden IL-6, NO ve TNF- α düzeyini ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'yı NEK grubuna göre anlamlı oranda azalttığı gösterildi. Ayrıca literatürde ilk kez antioksidatif enzimlerden GR aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı saptandı. Bugüne kadar tek bir çalışmada makrolid grubu antibiyotik olan eritromisin NADPH oksidaz enzim aktivitesini inhibe ederek süperoksit anyon üretimini azalttığı gösterilmiştir (135). Makrolid grubu antibiyotiklerin antioksidatif etkileri açısından daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız. Elde ettiğimiz sonuçlara göre klaritromisin antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi ile NEK'te belirgin düzelme sağladığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, çalışmamızda yenidoğan ratlarda hipoksi/reoksijenizasyon yöntemiyle oluşturulan barsak hasarında ilk kez kullanılan karnozin, EGb 761 ve klaritromisin histopatolojik hasarı ve proinflamatuvar mediatörleri azalttığı gösterildi. Ancak kullanılan ajanların klinikte uygulanabilirliği açısından daha çok çalışmaya 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 ratların hepsi *grade* 3 yapıya sahipti. NEK+Karnozin ve NEK+EGb 761 gruplarındaki ratlarda histopatolojik hasar skoru *grade* 1 ile *grade* 2, NEK+ klaritromisin grubundaki ratlarda *grade* 1 ile *grade* 3 arasında değişmekte idi. Karnozin, EGb 761 ve klaritromisinin NEK'te belirgin olarak histopatolojik iyileşme sağladığı saptandı.
3. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyi NEK grubunda en yüksek, kontrol grubunda en düşük bulundu. Karnozin, EGb 761 ve klaritromisinin barsak MDA düzeyini NEK grubuna göre belirgin azalttığı saptandı.
4. NEK patogenezinde önemli bir mediatör olan NO'nun barsak doku düzeyi, NEK grubunda kontrol grubuna belirgin yüksek bulundu. Karnozin, EGb 761 ve klaritromisinin barsak NO düzeyini NEK grubuna göre anlamlı azalttığı saptandı.
5. Proinflamatuvar bir mediatör olan IL-6'nın barsak doku düzeyi, NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulundu. Karnozin, EGb 761 ve klaritromisinin barsak IL-6 düzeyini NEK grubuna göre belirgin azalttığı saptandı
6. NEK'te başlangıç mediatör olarak kabul edilen TNF- α 'nın barsak doku düzeyi NEK grubunda kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulundu. EGb 761 ve klaritromisinin barsak TNF- α düzeyini NEK grubuna göre anlamlı azalttığı, karnozinin ise etkisinin olmadığı görüldü.
7. Antiinflamatuvar bir mediatör olan IL-10'nun barsak doku düzeylerinin, NEK grubunda en yüksek olduğu, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı görüldü.

8. Antioksidatif sistem değerlendirilmesinde, en yüksek barsak doku GSH düzeyi kontrol grubunda saptandı. Kontrol grubundaki GSH düzeyi NEK grubuna göre yüksek olmakla birlikte tüm gruplar arasında istatikselsel olarak anlamlı fark saptanmadı.

9. Barsak doku GSH-Px enzim aktivitesi, en yüksek kontrol grubunda, en düşük NEK+Karnozin grubunda saptandı. EGb 761 ve klaritromisinin NEK grubuna göre GSH-Px enzim aktivitesini arttırmakla birlikte istatikselsel farklılığın olmadığı görüldü.

10. Barsak doku GR enzim aktivitesi, kontrol grubunda NEK, NEK+karnozin, NEK+klaritromisin grubuna göre yüksek, NEK+EGb 761 grubuna göre düşük saptanmakla birlikte, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatikselsel farklılığın olmadığı görüldü. Karnozin, EGb 761 ve klaritromisinin NEK grubuna göre GR aktivitesini arttırdığı, ancak anlamlı farklılığın EGb 761 ve klaritromisin verilen grupta olduğu saptandı.

11. Kontrol grubunda barsak doku CAT enzim aktivitesi NEK ve NEK+Karnozin grubuna göre anlamlı yüksek saptandı. Karnozin, EGb 761 ve klaritromisin verilen grupta, NEK grubuna göre CAT aktivitesi azalmakla birlikte istatikselsel olarak anlamlı fark saptanmadı.

12. Bu sonuğlarla karnozinin, EGb 761 ve klaritromisinin H/RO yöntemiyle oluşturulanan barsak hasarında histopatolojik ve biyokimyasal olarak etkili olduğu saptandı.

ÖZET

Hipoksi-reoksijenizasyon yöntemiyle barsak hasarı oluşturulan ratlarda karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin histopatolojik değişikliklere ve oksidatif strese etkileri, Dr. Abdullah Karaca

Nekrotizan enterokolit (NEK), patogenezi tam bilinmeyen, prematürelere acil gastrointestinal bir hastalıktır. 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 karnozin, ginkgo alkaloidi (EGb 761) ve klaritromisinin histopatolojik ve biyokimyasal etkileri araştırıldı.

Bir günlük, 35 adet *Wistar* albino cinsi rat yavruları randomize olarak kontrol, NEK, NEK+karnozin, NEK+EGb 761 ve NEK+klaritromisin olarak beş gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki rat yavruları 24. saatte hava geçirmez kapalı bir ortamda beş dakika süreyle %100 CO₂ solutularak hipoksiye sokuldu; hemen ardından beş dakika süreyle %100 O₂ solutularak reoksijenizasyon uygulandı. H/RO'dan sonra üç gün süreyle karnozin (250 mg/kg), EGb 761 (100 mg/kg) ve klaritromisin (40 mg/kg) intraperitoneal 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), malonildialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-10 (IL-10), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) aktiviteleri araştırıldı.

Grupların vücut ağırlığı bakımından istatistiksel farklılık saptanmadı. En ağır hasarın NEK grubunda olduğu (HHS: 3), karnozin, EGb 761 ve klaritromisinin histopatolojik hasar skorunu belirgin azalttığı saptandı (sırasıyla HHS; 2,1,2 ve p=0.001, p=0.001, p=0.008). Ayrıca EGb 761 ve klaritromisinin barsak doku MDA,

NO, IL-6, TNF- α düzeylerini belirgin azalttığı (sırasıyla p=0.009, p=0.004; p=0.003, p=0.002; p=0.02, p=0.02; p=0.003, p=0.004), GR enzim aktivitesini belirgin arttırdığı (p= 0.002, p=0.001), karnozinin ise barsak doku MDA, NO, IL-6 düzeyini belirgin azalttığı (sırasıyla p=0.03, p=0.009, p=0.002) saptandı. Gruplar arasında diğer biyokimyasal parametreler bakımından anlamlı farklılık saptanmadı.

Sonuç olarak, yenidoğan ratlarda hipoksi/reoksijenizasyon yöntemiyle oluşturulan barsak hasarında karnozinin, ginkgo alkaloidi (EGb 761) ve klaritromisin'in histopatolojik hasarı ve proinflatuvar mediatörleri azalttığı gösterildi.

SUMMARY

The effects of carnosine, ginkgo biloba extract and clarithromycin on histopathological alterations and oxidative stress in rats with hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury. Dr. Abdullah Karaca

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 carnosine, ginkgo biloba extract (EGb 761) and clarithromycin were investigated in newborn rats with hypoxia/reoxygenation (H/RO) induced intestinal injury.

One day old, 35 *Wistar* albino rat pups were randomly divided into five groups as control, NEC, NEC+carnosine, NEC+EGb 761 and NEC+ clarithromycin. All rat pups except for control group were placed into a chamber of 100% CO₂ for five min, then they were reoxygenized with 100% O₂ for the next five min at 24th hour. After H/RO, carnosine (250 mg/kg), EGb 761 (100 mg/kg) and clarithromycin (40 mg/kg) were administered intraperitoneally for the next three days. Control and NEC groups were not administered any drugs. Rat pups fed with breast milk were weighed daily. On the fourth day (at 96th hour), all rats pups were killed with servical dislocation. Histopathologic injury scores (HIS), malonyldialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-10 (IL-10) reduced glutathione (GSH) levels, and glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) activities were investigated at intestinal tissue samples extracted terminal ileum.

There was no statistically significant difference between groups' body weight. It was found that NEC group had the worst HIS (HIS:3), and carnosine, EGb 761 and clarithromycin reduced HIS significantly (HIS: 2,1,2 and $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.008$ respectively). We also found that, EGb 761 and clarithromycin decreased intestinal tissue MDA, NO, IL-6, TNF- α levels ($p=0.009$, $p=0.004$; $p=0.003$,

p=0.002; p=0.02, p=0.02; p=0.003, p=0.004, respectively), increased GR enzyme activity significantly (p= 0.002, p=0.001 respectively) while carnosine reduced intestinal tissue MDA, NO, IL-6 levels significantly (p=0.03, p=0.009, p=0.002 respectively). The other biochemical parameters were not statistically significant among the groups.

As a result, it was shown that carnosine, ginkgo biloba extract (EGb 761) and clarithromycin decreased histopathologic injury and proinflammatory mediators in newborn rats with hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. 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.
3. Okur H, Kkaydin M, Kse K, Konta O, Doġam P, Kazez A. Hipoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995;30: 1416-1419.
4. 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.
5. 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.
6. Kabaroglu C, Akisu M, Habif S, Mutaf I, Turgan N, Parildar Z, et al. Effects of L-arginine and L-carnitine in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Pediatr Int* 2005;47: 10-14.
7. Oztrk H, Dokucu AI, Ogun C, Bykbayram 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.** 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.
- 9.** 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.
- 10.** Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13: 147-153.
- 11.** Gariballa SE, Sinclair AJ. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing* 2000;29: 207-210.
- 12.** Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85: 3175-3179.
- 13.** Babizhayev MA, Seguin MC, Gueyne J, Evstigneeva RP, Ageyeva EA, Zheltukhina GA. L-carnosine (β -alanyl-l-histidine) and carbinine (β -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem J* 1994;304: 509-516.
- 14.** Stvolinsky SL, Dobrota D. Anti-ischemic activity of carnosine. *Biochemistry (Mosc).* 2000;65: 849-855.
- 15.** Ahlemeyer B, Krieglstein J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cell Mol Life Sci* 2003;60: 1779-1792.
- 16.** Shen J, Wang J, Zhao B, Hou J, Gao T, Xin W. Effects of EGb 761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1998;28: 228-2236.

17. Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64: 465-472.
18. Bridi R, Crosetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in rats. *Phytother Res* 2001;15: 449–451.
19. Colak O, Sahin A, Alataş O, Inal M, Yaşar B, Kiper H. The effect of Ginkgo biloba on the activity of catalase and lipid peroxidation in experimental strangulation ileus. *Int J Clin Lab Res* 1998;28: 69-71.
20. Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Marciano MC, Squadrito F, Inferrera G, et al. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 2000;67: 2673-2783.
21. Liu KX, Wu WK, He W, Liu CL. Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide. *World J Gastroenterol* 2007;13: 299-305.
22. Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Sautebin L, Rombola L, Carnuccio R, et al. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292: 156-163.
23. Hardy RD, Rios AM, Chavez-Bueno S, Jafri HS, Hatfield J, Rogers BB, et al. Antimicrobial and immunologic activities of clarithromycin in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae*-induced pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47: 1614-1620.
24. Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol* 2008;32: 70-82.
25. Henry MC, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2004;28: 221-233.

- 26.** Caplan MS, Jilling T. New concepts in necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 2001;13: 111-115.
- 27.** Holman RC. Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979-85. *Am J Public Health* 1989;79: 987-989.
- 28.** 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.
- 29.** Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 1995;4: 200-206.
- 30.** Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006;368: 1271-1283.
- 31.** Schnabl KL, Van Aerde JE, Thomson AB, Clandinin MT. Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure. *World J Gastroenterol* 2008;14: 2142-2161.
- 32.** Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1990;336: 1519–1523.
- 33.** McGuire W, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88: 11–14.
- 34.** Boccia D, Stolfi I, Lana S, Moro ML. Nosocomial necrotising enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. *Eur J Pediatr* 2001;160: 385–391.
- 35.** Yurdakök M. What next in necrotizing enterocolitis? *Turk J Pediatr* 2008;50: 1-11.

- 36.** Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996;43: 409-432.
- 37.** Kleigman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis. *N Eng J Med* 1984;310: 1093-1112.
- 38.** 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.
- 39.** Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: Treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986;33: 179-201.
- 40.** Bohnhorst B, Müller S, Dördelmann M, Peter CS, Petersen C, Poets CF. Early feeding after necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr* 2003;143: 484-487.
- 41.** Guthrie SO, Gordon PV, Thomas V, Thorp JA, Peabody J, Clark RH. Necrotizing enterocolitis among neonates in the United States. *J Perinatol* 2003;23: 278–285.
- 42.** 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.
- 43.** Sankaran K, Puckett B, Lee DS, Seshia M, Boulton J, Qiu Z, et al. Variations in incidence of necrotizing enterocolitis in Canadian Neonatal Intensive Care Units. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39: 366–372.
- 44.** Sharma R, Tepas JJ 3rd, Hudak ML, Wludyka PS, Mollitt DL, Garrison RD, et al. Portal venous gas and surgical outcome of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2005;40: 371–376.

- 45.** 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.
- 46.** 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.
- 47.** 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.
- 48.** Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine. *Am J Clin Nutr* 1999;69: 1028-1034.
- 49.** Berseth CL. Gestational evolution of small intestine motility in preterm and term infants. *J Pediatr* 1989;115: 646-651.
- 50.** Berseth CL, McCoy HH. Birth asphyxia alters neonatal intestinal motility in term neonates. *Pediatrics* 1992;90: 669-673.
- 51.** Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *J Parenter Enteral Nutr* 1999;23: S3-S6.
- 52.** Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279: 851-857.
- 53.** Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol* 1999;277: 351-358.

- 54.** Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21: 147–151.
- 55.** 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.
- 56.** 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.
- 57.** Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;291: 881-884.
- 58.** Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000;289: 1560-1563.
- 59.** Collier-Hyams LS, Neish AS. Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 2005;62: 1339-1348.
- 60.** Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118: 229-241.
- 61.** Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007;19: 70-83.
- 62.** Gibbs K, Lin J, Holzman IR. Necrotizing enterocolitis: the state of the science. *Indian J Pediatr* 2007;74: 67-72.

- 63.** 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.
- 64.** Frost BL, Jilling T, Caplan MS. The importance of pro-inflammatory signaling in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008;32: 100-106.
- 65.** Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 2003;170: 1406-1415.
- 66.** Naik S, Kelly EJ, Meijer L, Pettersson S, Sanderson IR. Absence of Toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32: 449-453.
- 67.** Nankervis CA, Giannone PJ, Reber KM. The neonatal intestinal vasculature: contributing factors to necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008;32: 83-91.
- 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.** Cueva JP, Hsueh W. Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 1988;29: 1207-1212.
- 70.** 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.
- 71.** 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.

72. Markel TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Pitcher J, Tsai BM, Meldrum DR. Cytokines in necrotizing enterocolitis. *Shock* 2006;25: 329-337.
73. 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.
74. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;116: 960-964.
75. XW Qu, RA Rozenfeld, W Huang, GB Bulkley, W Hsueh. The role of xanthine oxidase in platelet activating factor induced intestinal injury in the rat. *Gut* 1999;44: 203-211.
76. 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.
77. AK Ewer, W Al-Salti, AM Coney, JM Marshall, P Ramani, IW Booth. The role of platelet activating factor in a neonatal piglet model of necrotising enterocolitis. *Gut* 2004;53: 207-213.
78. Hsueh W, Gonzalez-Crussi F, Arroyave JL. Platelet-activating factor: an endogenous mediator for bowel necrosis in endotoxemia. *FASEB J* 1987;1: 403-405.
79. 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.
80. 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.

- 81.** 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.
- 82.** 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.
- 83.** 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.
- 84.** Caplan M, Hsueh W, Kelly A, Donovan M. Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins* 1990;39: 705-714.
- 85.** Amer MD, Hedlund E, Rochester J, Caplan MS. Platelet-activating factor concentration in the stool of human newborns: effects of enteral feeding and neonatal necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate* 2004;85: 159-166.
- 86.** Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. *World J Surg* 2002;26: 806-811.
- 87.** 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.
- 88.** Martin CR, Walker WA. Intestinal immune defences and the inflammatory response in necrotising enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11: 369-377.
- 89.** 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.

- 90.** Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274.
- 91.** Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12: 2203-2315.
- 92.** Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine : its properties, function and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 1992;13: 379-444.
- 93.** Roberts PR, Zaloga GP. Cardiovascular effects of carnosine. *Biochemistry (Moscow)* 2000;65: 856-861.
- 94.** Ririe DG, Roberts PR, Shouse MY, Zaloga GP. Vazodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition* 2000;16: 168-172.
- 95.** Tan KM, Candlish JK. Carnosine and anserine as modulators of neutrophil function. *Clin Lab Haematol* 1998;20: 239-244.
- 96.** Wadsworth TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact* 2001;137: 43-58.
- 97.** Li Z, Nakaya Y, Niwa Y, Chen X. K(Ca) channel-opening activity of Ginkgo Biloba extracts and ginsenosides in cultured endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28: 441–445.
- 98.** Macovschi O, Prigent A, Nemoz G, Pacheco H. Effects of an extract of Ginkgo biloba on the 3'-5'-cyclic AMP phosphodiesterase activity of the brain of normal and triethyltin-intoxicated rats. *J Neurochem* 1987;49: 107–114.
- 99.** Shinkai M, Rubin BK. Macrolides and airway inflammation in children. *Paediatr Respir Rev* 2005;6: 227-235.

- 100.** Rubin BK, Henke MO. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease. *Chest* 2004;125: 70S-78S.
- 101.** Demartini G, Esposti D, Marthyn P, Lapidari A, Frascini F, Scaglione F. Effect of multiple doses of clarithromycin and amoxicillin on IL-6, IFN gamma and IL-10 plasma levels in patients with community acquired pneumonia. *J Chemother* 2004;16: 82-85.
- 102.** Giamarellos-Bourboulis EJ, Antonopoulou A, Raftogiannis M, Koutoukas P, Tsaganos T, Tziortzioti V, et al. Clarithromycin is an effective immunomodulator when administered late in experimental pyelonephritis by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infect Dis* 2006;6: 31-40.
- 103.** Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, Gomi K, Kobayashi T, Takahashi H, et al. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *J Antimicrob Chemother* 2002;49: 745-755.
- 104.** Giamarellos-Bourboulis EJ, Adamis T, Lauotaris G, Sabracos L, Koussoulas V, Mouktaroudi M, et al. Immunomodulatory clarithromycin treatment of experimental sepsis and acute pyelonephritis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: 93-99.
- 105.** Giamarellos-Bourboulis EJ, Tziortzioti V, Koutoukas P, Baziaka F, Raftogiannis M, Antonopoulou A, et al. Clarithromycin is an effective immunomodulator in experimental pyelonephritis caused by pan-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2006;57: 937-944.
- 106.** Fonseca-Aten M, Okada PJ, Bowiware KL, Chavez-Bueno S, Mejias A, Rios AM, et al. Effect of clarithromycin on cytokines and chemokines in children with an acute exacerbation of recurrent wheezing: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97: 457-463.

- 107.** Giamarellos-Bourboulis EJ, Baziaka F, Antonopoulou A, Koutoukas P, Kousoulas V, Sabracos L, et al. Clarithromycin co-administered with amikacin attenuates systemic inflammation in experimental sepsis with *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25: 168-172.
- 108.** Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95: 351-358.
- 109.** Navarro-Gonzalves JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998;44: 679-681.
- 110.** Beutler E, Durgun O, Kely BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;51: 882-888.
- 111.** Kakkar R, Mantha VS, Radhi J, Prasad K, Karla J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science* 1998;94: 623-632.
- 112.** Racker E. Glutathione reductase (liver and yeast). In: Colowick SP and Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1955: 722-729.
- 113.** Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York : Academic, 1974: 673-677.
- 114.** 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.
- 115.** 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.

- 116.** 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.
- 117.** 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
- 118.** Halpern MD, Clark JA, Saunders TA, Doelle SM, Hosseini DM, Stagner AM, et al. Reduction of experimental necrotizing enterocolitis with anti-TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290: G757-764.
- 119.** Duffy LC, Zielesny MA, Carrion V, Griffiths E, Dryja D, Hilty M, et al. Concordance of bacterial cultures with endotoxin and interleukin-6 in necrotizing enterocolitis. *Dig Dis Sci* 1997;42: 359-365.
- 120.** Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP, et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr* 2001;160: 345-350.
- 121.** Riordan FA, Marzouk O, Thomson AP, Sills JA, Hart CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in meningococcal disease. *Arch Dis Child* 1996;75: 453-454.
- 122.** Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1999;103: 766-771.
- 123.** 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.

- 124.** Baykara B, Tekmen I, Pekcetin C, Ulukus C, Tuncel P, Sagol O, et al. The protective effects of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Acta Histochem* 2009;111: 42-51.
- 125.** Yan SL, Wu ST, Yin MC, Chen HT, Chen HC. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *J Food Sci* 2009;74: H259-265.
- 126.** Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, et al. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;474: 261-267.
- 127.** Stvolinsky S, Kukley M, Dobrota D, Mezesova V, Boldyrev A. Carnosine protects rats under global ischemia. *Brain Res Bull* 2000;53: 445-448.
- 128.** Rajanikant GK, Zemke D, Senut MC, Frenkel MB, Chen AF, Gupta R, et al. Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2007;38: 3023-3031.
- 129.** Hipkiss AR, Preston JE, Himswoth DT, Worthington VC, Abbot NJ. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 1997;238: 135-138.
- 130.** Nicoletti VG, Santoro AM, Grasso G, Vagliasindi LI, Giuffrida ML, Cuppari C, et al. Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection. *J Neurosci Res* 2007;85: 2239-2245.
- 131.** Yenilmez A, Kilic FS, Sirmagul B, Isikli B, Aral E, Oner S. Preventive effects of Ginkgo biloba extract on ischemia-reperfusion injury in rat bladder. *Urol Int* 2007;78: 167-172.

- 132.** Sener G, Sener E, Sehirli O, Oğünç AV, Cetinel S, Gedik N, et al. Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Res* 2005;52: 216-222.
- 133.** Cheung F, Siow YL, Chen WZ, Karmin O. Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1999;58: 1665-1673.
- 134.** Ilieva I, Ohgami K, Shiratori K, Koyama Y, Yoshida K, Kase S, et al. The effects of Ginkgo biloba extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp Eye Res* 2004;79: 181-187.
- 135.** Umeki S. Anti-inflammatory action of erythromycin. Its inhibitory effect on neutrophil NADPH oxidase activity. *Chest* 1993;104: 1191-1193.