

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

**NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİ OLUŞTURULAN  
RATLARDA PROFLAKTİK OLARAK KULLANILAN  
KARNOZİN, GİNKGO ALKALOİDİ VE KLARİTROMİSİNİN  
GASTROİNTESTİNAL SİSTEME, OKSİDATİF STRESE VE  
KLARİTROMİSİNİN BAKTERİYEL TRANSLOKASYONA  
ETKİLERİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**  
**DR. ÖZMERT M.A. ÖZDEMİR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF.DR. HACER ERGİN**

**DENİZLİ-2008**

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

**NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİ OLUŞTURULAN  
RATLARDA PROFLAKTİK OLARAK KULLANILAN  
KARNOZİN, GİNKGO ALKALOİDİ VE KLARİTROMİSİNİN  
GASTROİNTESTİNAL SİSTEME, OKSİDATİF STRESE VE  
KLARİTROMİSİNİN BAKTERİYEL TRANSLOKASYONA  
ETKİLERİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**  
**DR. ÖZMERT M.A. ÖZDEMİR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF.DR. HACER ERGİN**

**DENİZLİ-2008**

Prof.Dr.Hacer ERGİN'in danışmanlığında Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR'in tarafından yapılan "Nekrotizan Enterokolit Modeli Oluşturulan Ratlarda Profilaktik Olarak Kullanılan Karnozin, Ginkgo Alkaloidi ve Klaritromisin'in Gastrointestinal Sisteme, Oksidatif Strese ve Klaritromisin'in Bakteriyele Translokasyona Etkileri" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı/Neonatoloji Bilim Dalı'nda YANDAL 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 onaylarım.

04/12/2008

Prof. Dr. Cüneyt Orhan KARA  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Dekan V.

## TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Neonatoloji Bilim Dalı'nda geçen yan dal uzmanlık eğitimim süresince, eğitimimde çok büyük katkı ve emekleri geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Hacer Ergin ve Prof.Dr. İlknur Kılıç'a, ünitelerinde rotasyon yaptığım Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Neonatoloji Bilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof.Dr. Nilgün Kültürsay, Prof.Dr. Mete Akisu ve Doç.Dr. Mehmet Yalaz'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tezimin istatistiksel aşamasında yardımını esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Mehmet Zencir'e ve tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman manevi desteklerini aldığım çok sevdiğim eşim ve çocuklarıma ayrı ayrı teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Özmert M.A. Özdemir

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

<b>GİRİŞ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>NEKROTİZAN ENTEROKOLİT</b> .....	3
<b>PATOGENEZİ</b> .....	5
Prematürite.....	5
İntestinal İskemi / Asfiksi.....	6
Enteral Besleme.....	9
Bakteriyel Kolonizasyon ve Sepsis.....	10
<b>KARNOZİN VE ETKİLERİ</b> .....	12
<b>GİNKGO BİLOBA VE ETKİLERİ</b> .....	14
<b>KLARİTROMİSİN VE ETKİLERİ</b> .....	14
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	16
Çalışma Grupları.....	16
Hipoksi/Reoksijenizasyon Yöntemi ile NEK Modeli Oluşturulması.....	17
Histopatolojik Değerlendirme.....	18
Biyokimyasal Değerlendirme.....	18
Malonildialdehit Ölçümü.....	18
Glutasyon Düzeyi, Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz Aktivitesi Ölçümü.....	19
Nitrik Oksit Ölçümü.....	20
Bakteriyel Translokasyonun Değerlendirilmesi.....	20
İstatistiksel Analizler.....	21
<b>BULGULAR</b> .....	22

<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>30</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>40</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>41</b>
<b>YABANCI DİL ÖZETİ.....</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>55</b>

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Sayfa No

<b>Şekil-1</b>	Serbest oksijen radikallerinin hücre düzeyindeki zararlı etkileri.....	7
<b>Şekil-2</b>	NEK gelişimini etkileyen faktörler.....	12
<b>Şekil-3, 4</b>	Hava geçirmez kapalı ortamda hipoksi-reoksijenizasyon yönteminin uygulanışı.....	17
<b>Şekil-5, 6</b>	NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen rat yavrusu barsaklarının makroskopik görünümü.....	22
<b>Şekil 7</b>	Kontrol grubu. Normal histoloji, <i>grade 1</i> .....	24
<b>Şekil 8</b>	Yüzey epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, <i>grade 2</i> . A: Karnozin, B: Klaritromisin grubu.....	24
<b>Şekil 9</b>	Villi epitel hücre nekrozu, <i>grade 3</i> . A: NEK, B: EGb 761 grubu.....	24

## TABLolar ÇİZELGESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo-1</b>	Nekrotizan enterokolitte modifiye Bell evrelemesi.... 4
<b>Tablo-2</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının birinci, ikinci ve üçüncü gün vücut ağırlıkları..... 23
<b>Tablo-3</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarının histopatolojik değerlendirme ( <i>grade</i> ) skorları... 23
<b>Tablo-4</b>	Biyokimyasal olarak çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz, nitrik oksit ve malonidialdehit düzeyleri... 26
<b>Tablo-5</b>	Kontrol, NEK ve klaritromisin + NEK gruplarında kan, mezenterik lenf nodu, karaciğer, dalak ve gayta kültür sonuçlarına göre bakteriyel translokasyon insidansı..... 27
<b>Tablo-6</b>	Kontrol, NEK ve klaritromisin + NEK gruplarında kan, mezenterik lenf nodu, karaciğer, dalak ve gayta kültürlerinde mikroorganizma üremeleri..... 29
<b>Tablo-7</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının birinci gün vücut ağırlıkları..... 55
<b>Tablo-8</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının ikinci gün vücut ağırlıkları..... 55
<b>Tablo-9</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının üçüncü gün vücut ağırlıkları..... 56
<b>Tablo-10</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının intestinal sistem histopatolojik değerlendirme ( <i>grade</i> ) skorları..... 56



<b>Tablo-11</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki malonildialdehit düzeyleri.....	57
<b>Tablo-12</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki nitrik oksit düzeyleri.....	57
<b>Tablo-13</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki katalaz düzeyleri.....	58
<b>Tablo-14</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri.....	58
<b>Tablo-15</b>	Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki glutatyon düzeyleri.....	59

## KISALTMALAR

<b>NEK</b>	:	Nekrotizan enterokolit
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:	Tümör nekrozis faktör alfa
<b>PAF</b>	:	<i>Platelet activating factor</i>
<b>İİ/R</b>	:	İntestinal iskemi reperfüzyon
<b>MDA</b>	:	Malonildialdehit
<b>MPO</b>	:	Myeloperoksidaz
<b>CAT</b>	:	<i>Catalase</i>
<b>SOD</b>	:	Süperoksid dismutaz
<b>NO</b>	:	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	:	Nitrik oksit sentaz
<b>iNOS</b>	:	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
<b>H/R</b>	:	Hipoksi-reoksijenasyon
<b>YYBÜ</b>	:	Yenidoğan yoğun bakım ünitesi
<b>GGK</b>	:	Gaytada gizli kan
<b>N/G</b>	:	Nazo-gastrik
<b>sİgA</b>	:	Sekretuar immünglobulin A
<b>LTB4</b>	:	Lökotrien B4
<b>LTC4</b>	:	Lökotrien C4
<b>PAF-AH</b>	:	<i>Platelet activating factor acetylhydrolase</i>
<b>TLR</b>	:	<i>Toll like receptor</i>
<b>LPS</b>	:	Lipopolisakkarit
<b>SCFA</b>	:	<i>Short chain fatty acid</i>
<b>cGMP</b>	:	Siklik guanozin monofosfat
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo nükleik asit
<b>NF-kB</b>	:	<i>Nuclear factor-kappaB</i>

<b>COX</b>	:	Siklooksijenaz
<b>H&amp;E</b>	:	Hemotoksilen-eosin
<b>GSH</b>	:	Glutatyon
<b>GSH-Px</b>	:	Glutatyon peroksidaz
<b>TBA</b>	:	<i>Thiobarbituric acid</i>
<b>EDTA</b>	:	Etilendiamin tetra asetik asit
<b>NADP</b>	:	Nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
<b>EMB</b>	:	Eozin metilen blu
<b>CFU</b>	:	<i>Colony forming unit</i>
<b>BT</b>	:	Bakteriyel translokasyon
<b>SPSS</b>	:	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>

## GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit, özellikle prematüre yenidoğanları etkileyen, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin en önemli gastrointestinal acil sorunudur. Bilimsel ve teknolojik alanlardaki gelişmelere rağmen etyopatogenezi tam olarak bilinmemektedir. Spesifik bir tedavisi olmayan nekrotizan enterokolit, prematüre yenidoğanlarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Prematürite, enteral besleme, intestinal iskemi/asfiksi, bakteriyel kolonizasyon gibi birçok neden nekrotizan enterokolitte temel risk faktörleri olup, ortak son yol intestinal inflamasyon ve nekrozdur (1).

Deneyisel çalışmalarda, hipoksinin nekrotizan enterokolit patogenezinde önemli bir risk faktörü olduğu, intestinal iskemi ve reperfüzyon sonucu serbest oksijen radikallerinin de etkisiyle intestinal doku hasarlanmasının geliştiği gösterilmiştir (2). Bu hasarlanmada pro-inflamatuvar mediyatörler ile anti-inflamatuvar mediyatörlerin etkileşimi, özellikle *platelet activating* faktör ile birlikte tümör nekrozis faktör alfanın anahtar rol oynadığı belirtilmektedir (1,3).

Vazodilatatör etkinliği de olan karnozin, lipid peroksidasyon ürünleri, süperoksit anyonu ve hidroksil radikalleri gibi serbest oksijen radikalleri ile direkt olarak non-enzimatik etkileşime girerek, bu radikalleri yok eden, güçlü antioksidan özelliğe sahip doğal bir dipeptiddir (4,5).

Ginkgo bilabo (EGb 761), Alzheimer hastalığı ve nöronal hipoksi gibi oksidatif stres ile etyolojik ilişkisi olan hastalıklarda ve kardiyovasküler sistem hastalıklarında iskemik reperfüzyona karşı kalbi koruduğu için yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır (6-8). Çalışmalarda EGb 761'in malonildialdehit, *myeloperoxidase* ve nitrik oksit düzeylerini azalttığı, *platelet activating* faktör antagonisti etkinliği, süperoksit dismutazı arttırdığı ve intestinal mukoza hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilen antioksidan ve antiinflamatuvar bir ilaçtır (9-11).

Klaritromisin, antibakteriyel etkinliğinin yanı sıra malonildialdehit, tümör nekrozis faktör alfa, interlökin-6, 8 ve 1β düzeylerini azaltarak antiinflamatuvar özelliği de gösterilmiş makrolid grubu bir antibiyotiktir (12-16).

Nekrotizan enterokolitte rol oynayan patofizyolojik olayların tam anlaşılması, intestinal mukoza bariyer bozukluğunun önlenmesi veya en aza indirilmesi ve bu hastalığı önleyici stratejilerin geliştirilmesi, nekrotizan enterokolitli bebeklerin morbidite ve mortalitesinin azaltılabilmesi açısından çok büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma, *Wistar* Albino cinsi yenidoğan sıçan yavrularında hipoksi–reoksijenizasyon modeli ile oluşturulan intestinal hasarda, hipoksi–reoksijenizasyon öncesi profilaktik olarak uygulanan karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin intestinal hasarlanmadan koruyucu etkisini araştırmak üzere planlandı.

## GENEL BİLGİLER

### NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

Nekrotizan enterokolit (NEK), etyopatogenezi tam olarak aydınlatılmayan, intestinal inflamasyon ve nekroz ile karakterize, özellikle prematüre yenidoğanları etkileyen, bu dönemdeki morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir (1). Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi (YYBÜ) bakım koşullarındaki bilimsel ve teknolojik gelişmelere rağmen, %10-30 gibi yüksek mortalite oranı bildirilen NEK, çok çeşitli semptom ve bulgular ile karşımıza çıkabilir. Gastrik rezidü, abdominal distansiyon, kusma, abdominal hassasiyet, abdominal duvar renk değişikliği, hemotokezya, letarji, apne ve bradikardi, taşikardi, nötropeni, trombositopeni, metabolik asidoz, solunum sıkıntısı ve dolaşım bozukluğu gibi birçok sistemi ilgilendiren semptom ve bulgular ile kliniğe yansır (1,18). İlerlemiş olgularda ise asidoz, şok, bakteriyemi, sepsis ve dissemine intravasküler koagülasyon gelişebilir. Gaytada gizli kan (GGK) pozitifliği, nazogastrik (N/G) tüp ile beslenen prematüre bebeklerin %60-75'inde görülebildiği için NEK tanısında yeri kısıtlıdır (1). Radyolojik olarak başlangıçta barsak dilatasyonu, ileus, pnömotosis intestinalis gibi bulgular saptanırken, ileri dönemde barsak perforasyonu sonucu pnömoperitoneum ve portal vena gaz gözlenebilir (19-21). Bell ve arkadaşları tarafından NEK'li hastaları klinik ve radyolojik olarak sınıflandıran kriterler yayınlanmış, bu kriterler Walsh ve Kleigman tarafından 1986 yılında modifiye edilmiştir (18,22) (Tablo 1).

Evre I, şüpheli NEK'de bulgular nonspesifiktir ve klinik olarak abdominal distansiyon, kusma, gastrik rezidü, apne, letarji ve GGK varlığı; radyolojik olarak ise normal grafi bulguları yanında barsak dilatasyonu ve hafif ileus saptanır. EvreII, kesin NEK'de evre I'e ek olarak abdominal hassasiyet, metabolik asidoz, trombositopeni saptanırken, radyolojik olarak pnömotosis intestinalis ve portal vena gaz gözlenir. Evre III, ağır NEK'dir; II. evreye ek olarak hipotansiyon, belirgin asidoz, nötropeni ve dissemine intravasküler koagülasyon görülür. Radyolojik olarak ise evre II'ye ek olarak barsak perforasyonu gelişirse pnömoperitoneum saptanır (1,18,22).

**Tablo-1:** Nekrotizan Enterokolitte Modifiye Bell Evrelemesi

Sınıflama	Klinik Bulgular	Radyolojik Bulgular
I (Şüpheli NEK)	Abdominal distansiyon GGK + Kusma/Gastrik rezidü Apne/letarji	İleus/dilatasyon
II (Kesin NEK)	Evre I'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 DİK Nötropeni	Evre II'ye ek olarak Pnömoperitoneum

Spesifik tedavisi olmamakla birlikte, enteral beslemenin kesilerek N/G ile mide dekompresyonu, sıvı-elektrolit desteği, 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 antibiyoterapi önerilmektedir. Antibiyotik olarak genellikle ampisilin ve aminoglikozit veya 3. kuşak sefalosporin önerilmekle birlikte, intestinal perforasyon şüphesi varsa anti-anaerobik bir ilaç da sıklıkla tedaviye eklenir (1). İntestinal perforasyon cerrahi müdahale için bir endikasyon olup, NEK olgularının %30 ile %50 kadarında cerrahi müdahale gerekmektedir (1). Ancak, son zamanlarda intestinal perforasyonu olan NEK'li olgularda, basit peritoneal drenaj yöntemi ile laparatomik cerrahi müdahale arasında benzer sonuçlar alındığı rapor edilmiştir (23).

NEK, erken dönemde yara enfeksiyonu, sepsis, intestinal perforasyon, dissemine intravasküler koagülasyon, çoklu organ yetmezliği gibi birçok ciddi

fatal olaya sebep olurken, nekroz ve uygulanan cerrahi sonrası uzun dönemde intestinal strüktür ve kısa barsak sendromuna yol açabilir. Hem erken hem de geç dönemde gelişen komplikasyonlar hastanın hayatını ciddi şekilde tehdit ederken, yüksek maddi kayıplara da neden olur. Cerrahi müdahale sonrası mortalite %60-80 gibi yüksek oranlara çıkabilmektedir (1,19,20,24).

## **PATOGENEZ**

Patogenezi tam olarak halen aydınlatılmayan bu hastalıkta, prematürite, enteral besleme, intestinal iskemi/asfiksi, bakteriyel kolonizasyon gibi birçok durum temel risk faktörleri olarak kabul edilirken; ortak son yol barsak nekrozudur (1).

### **1. Prematürite**

NEK'li olguların %90'dan fazlası prematüredir. Gebelik yaşı ve doğum ağırlığı düştükçe NEK riskinde artış gözlenir (1,25-27). Gebelik yaşı 37 hafta ve üzerindeki bebeklerde ise %5-10 oranında görülür. Bu term bebeklerin hemen hepsinde asfiksi, intrauterin büyüme geriliği (İUBG), polisitemi/hiperviskosite, kan değişimi, göbek kateteri, gastroşizis, konjenital kalp hastalığı veya miyelomeningosel gibi risk faktörleri bulunur (1,28). Prematürelere, intestinal mukozanın, antioksidan sistemler ve bağışıklık sisteminin immatür özellikler taşıması ve yetersiz dolaşım dinamikleri nedeniyle, NEK gelişimi daha kolaydır. Mide pH'sının yüksekliği, intestinal motilitenin azalması, absorpsiyon fonksiyonunun yetersizliği, immatür epitelyal yapının bakteriyel translokasyonu kolaylaştırması, immünglobulin A (İgA) sekresyonunun yetersizliği, koruyucu mukus düzeylerindeki düşüklük ve rejeneratif kapasitenin azalması gibi birçok faktör prematürelereki barsak immatüritesinde rol oynar. Bu nedenlerle diğer predispozan ve tetikleyici faktörlerle birlikte prematürelere NEK gelişimi matür olgulara göre daha siktir (1,18-20,29).

Prematürelere herhangi bir nedenle oluşan hipoksi-reoksijenizasyon (H/R) sürecinde gelişebilecek olan intestinal mukoza hasarlanmasından koruyucu antioksidan sistemler yetersizdir. Hipoksi-reoksijenizasyon sonrası yoğun olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri intestinal doku hasarından sorumlu temel



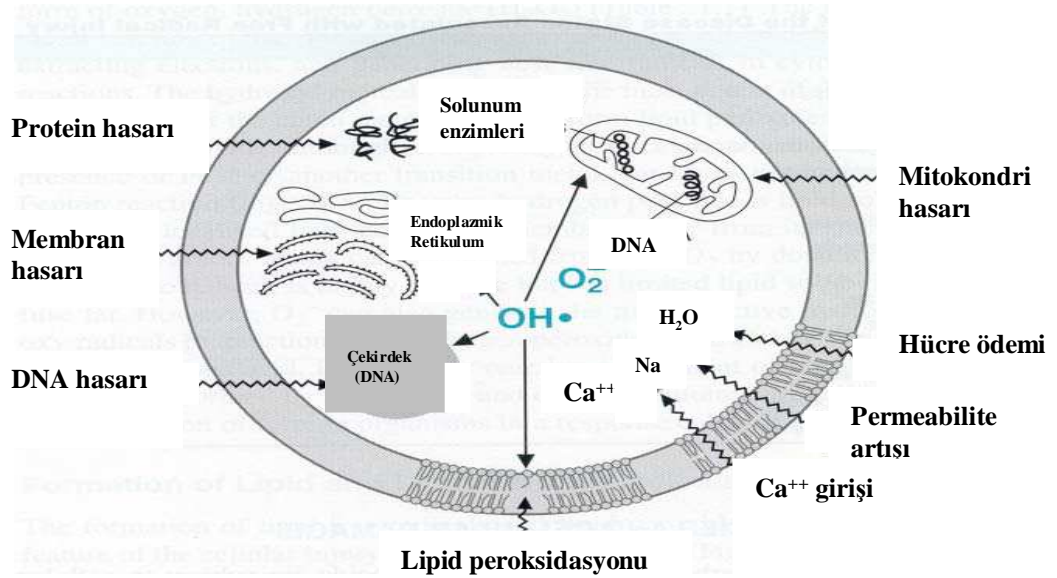
faktörlerdir (1,18,19,29,30). Bu radikaller, olayın meydana geldiği organda toksik etki göstererek doku hasarı ve apoptozise neden olur. Antioksidan sistemler, serbest oksijen radikalleri ( $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ) ile ilişkili doku hasarında serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak koruyucu etki gösterir. Glutasyon metabolizması antioksidatif defans sisteminin en önemlilerinden birisidir (31). Hayvan çalışmalarında, prematürelde barsaklarda antioksidatif enzimlerden katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin çok düşük olduğu ve yaş arttıkça SOD ve GSH-Px enzim düzeylerinin arttığı saptanmıştır (32,33). Ayrıca, H/R modeli ile NEK oluşturulmuş deneysel çalışmalarda, önceden SOD ve CAT gibi antioksidanların verilmesi ile NEK şiddetinin belirgin derecede azaltılabildiği gösterilmiştir (34,35).

Prematüre bebeklerde mide pH'sının yüksekliği, intestinal motilitenin azlığı ve immatür epitelyal yapının intestinal translokasyonu kolaylaştırması nedeniyle intestinal sistemde bakteri kolonizasyonu riski artar. NEK, sıklıkla intestinal sistemin terminal ileum ve proksimal kolon bölgesinde gelişir. İntestinal immün direnci sağlayan lenf foliküllerinin çoğu (Peyer plakları) bu bölgelerde yer alır. Prematürelde intestinal sekretuvar immunglobulin A (sİgA) düzeyleri, T ve B lenfosit sayı ve fonksiyonları, antikor yanıtları yetersizdir (1,19,20,29). Prematüre yenidoğanlarda intestinal T ve B lenfosit sayılarının, sİgA düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmış ve prematür yenidoğanlara oral olarak immunglobulin verilemesinin NEK şiddetini azalttığı gösterilmiştir (36). İntestinal immunitenin immatüritesi bakteriyel translokasyon ve kolonizasyona neden olarak bakteriyemi ve sepsis gelişimine yol açabilir.

## **2. İntestinal İskemi / Asfiksi**

İntestinal vasküler dolaşım ve hipoksiye vasküler cevap NEK gelişiminde önemli bir faktördür (1). Çeşitli nedenlerle fetüsün oksijen ihtiyacının sağlanamaması asfiksi ile sonuçlanır. Hipoksik stres durumunda kan akımı splanknik yataktan beyin, kalp ve adrenal bezler gibi hayati organlara yönelir (redistribisyon). Bunun sonucu çeşitli organlarda iskemik hasar gelişir (1,37). Hayvan çalışmalarında intestinal iskemiye takiben reperfüzyon sonucu barsak

nekrozu geliştiği gösterilmiştir (2,38,39). H/R sonrası intestinal zedelenme ortamdaki serbest oksijen radikalleri aracılığıyla gelişir. Ksantin oksidaz (XO) barsaktaki serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $O^-$ ) ve hidroksil anyonu ( $OH^-$ ) hasardan sorumlu en önemli serbest oksijen radikalleri olarak bilinirler. Bu serbest oksijen radikalleri lokal hasar gelişiminden ve sistemik bulgulardan sorumlu tutulmaktadır. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, nötrofil aktivasyonu ve deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı oluşturarak hücre ölümüne neden olurlar (2,19,20,33,40) (Şekil 1).



Şekil-1: Serbest oksijen radikallerinin hücre düzeyindeki zararlı etkileri.

Deneyisel çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ya da etkisini önleyen maddeler verildiğinde intestinal hasar ve NEK gelişiminin azaldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (2,34,35,41). H/R ile gelişen intestinal hasarlanma sonucu, epitelyal hücreler ve aktive nötrofillerden ortama çeşitli inflamatuvar mediatörler salınır. Bu inflamatuvar mediyatörlerin başlıcaları *platelet activating* faktör (PAF), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), nitrik oksit (NO), interlökin-6 (IL-6)'dır. Yapılan birçok çalışma ile NEK'de bu sitokinlerin lokal ve sistemik olarak arttığı ve doku hasarında önemli rol oynadığı saptanmıştır (1,3,19,20,29,30,40).

PAF, fosfolipaz A<sub>2</sub> aracılığı ile kapiller endotel, makrofaj, nötrofil, hepatosit, glial hücre, keratinosit ve intestinal epitelyal hücreler gibi birçok hücreden salınan endojen bir fosfolipiddir. Vazokonstrüksiyon, kapiller geçirgenliğin artması, pulmoner hipertansiyon, nötrofil-trombosit agregasyonu, degranülasyon, bronkokonstrüksiyon ve iskemik barsak nekrozu gibi birçok biyolojik etkilere sahiptir. İnaktif metaboliti olan *lyso*-PAF formuna dönüşümü PAF-spesifik asetil-hidrolaz (PAF-AH) enzimi ile katalize edilen PAF'ın, NEK patogeneğinde etkili temel inflamatuvar mediatör olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (1,29,42-47). PAF antagonisti verilen farelerde, intestinal nekrozun azaldığı gözlenmiştir (46). PAF, bilinen en güçlü mezenterik vazokonstrüktör maddedir. PAF, bu güçlü vazokonstrüktör etkisi ile intestinal iskemi sonucu mukoza hasarına ve NEK'e neden olabilirken; sekonder olarak serbest oksijen radikalleri, TNF- $\alpha$ , lökotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), lökotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) gibi inflamatuvar mediatörlerin üretim ve salınımını arttırarak da NEK'e neden olabilmektedir. Deneysel çalışmalarda PAF uygulandıktan sonra TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, noradrenalin, prostoglandin ve serbest oksijen radikallerinin artışı gösterilmiştir (29,35,47,48). NEK patogeneğinde TNF- $\alpha$ 'nın da önemli bir role sahip olduğu çalışmalarla saptanmıştır (3,47,48). Caplan ve arkadaşlarının çalışmasında NEK'li prematüre yenidoğanlarda yüksek plazma TNF- $\alpha$  düzeyleri saptanmış; sonraki çalışmalarda TNF- $\alpha$  ve lipopolisakkarid ilişkili intestinal hasarın PAF antagonistleri verilerek azaltılabildiği gösterilmiştir (43,49,50). Prematürelere PAF yıkımından sorumlu enzim olan PAF-asetilhidrolaz düzeyleri düşüktür ve normal düzeylerine ancak altıncı haftada ulaştığı ve deneysel olarak PAF-asetilhidrolaz verildiğinde intestinal hasarın azaldığı saptanmıştır (51).

LTB<sub>4</sub>, nötrofil kemotaksisi ve agregasyonunu sağlayarak, LTC<sub>4</sub> ise intestinal iskemi ve sonuçta intestinal inflamasyona yol açarak NEK patogeneğinde etkili olmaktadır (44,45). LTB<sub>4</sub>, nötrofil kemotaksisi ve agregasyonu için en güçlü inflamatuvar mediyatördür. İntestinal sistemde gelişen iskemi sırasında LTB<sub>4</sub> ve kompleman sistemi aracılığı ile nötrofillerin hasarlı bölgeye göçü ve agregasyonu gerçekleşir. Ayrıca intestinal iskemi sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin etkisi ile de nötrofiller aktive olur, hasarlı bölgeye migrasyonları sağlanır. Yine PAF ve lipopolisakkarit ile

oluşturulan deneysel NEK modelinde nötrofil aktivasyonun önemli rol oynadığı gösterilmiştir (52). Çeşitli nedenlerle gelişen nötrofillerin aktivasyonu sonucu *myeloperoxidase* (MPO) gibi enzimlerin üretimi ve salınımı gerçekleşir. Dokuda MPO aktivitesinin ölçümü ile nötrofil aktivasyonu indirekt olarak saptanabilir (53,54).

Deneysel çalışmalarda H/R 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 (2,55-57).

### **3. Enteral Beslenme**

NEK'li olguların %90'dan fazlası enteral olarak beslenen bebeklerdir. Enteral besleme ile NEK arasındaki ilişki tam olarak bilinmese de; hiperosmolar formula, yüksek volümlü ve hızlı beslemenin, özellikle prematüre bebeklerde kısa zincirli yağ asitleri ile beslemenin NEK riskini arttırdığı bildirilmektedir (1). Özellikle yüksek volümlü agresiv beslemenin mide distansiyonu yaratarak splanknik dolaşımı bozacağı ve intestinal iskemiye yol açabileceği belirtilmektedir (1). Berseth ve arkadaşlarının çalışmasında, minimal enteral beslenenler ve volüm artışı yavaş yapılanlarda, hızlı volüm arttıranlara göre daha az NEK geliştiği gösterilmiştir (58). Hayvan çalışmalarında kısa zincirli yağ asitleri ile beslemenin barsaklara zarar verdiği gösterilmiş ve bu durumun özellikle prematürelere belki de laktaz ve diğer barsak enzim aktivitelerinin yetersizliği nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (1).

İnsan ve hayvan çalışmalarında ise anne sütü ile beslemenin NEK insidensini azalttığı gösterilmiştir. Anne sütü, içerdiği; sİgA, lökosit, laktoferrin, lizozim, musin, sitokin, *growth* faktör (epidermal *growth* faktör), enzimler, oligosakkarid, poliansatüre yağ asitleri ve PAF-AH gibi birçok madde ile antibakteriyel, anti-inflamatuvar ve mukoza koruyucu etkilere sahiptir (1,29,51).

Prematürelere tek başına enteral beslenme ile NEK patogenezinde önemli rol oynayan PAF'ın plazma düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (59). Amer ve

arkadaşlarının çalışmasında prematüre ve term yenidoğanlarda enteral beslenmeden sonraki ilk mekonyum ile 14. gün dışkılarında PAF ve PAF-AH düzeyleri ve bunların NEK ile ilişkisi araştırılmış; sonuç olarak 14. gün dışkısında, mekonyuma göre PAF düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (60). NEK gelişen yenidoğanların dışkı PAF düzeylerinin, sağlıklı yenidoğanlara göre belirgin yüksek olduğu gösterilmiştir. PAF-AH düzeyleri arasında ise gruplar arasında belirgin bir fark saptanmamıştır. Sonuç olarak; enteral beslenmenin, intestinal dokuda lokal PAF üretimini artırarak NEK gelişiminde etkili olabileceği öne sürülmüştür.

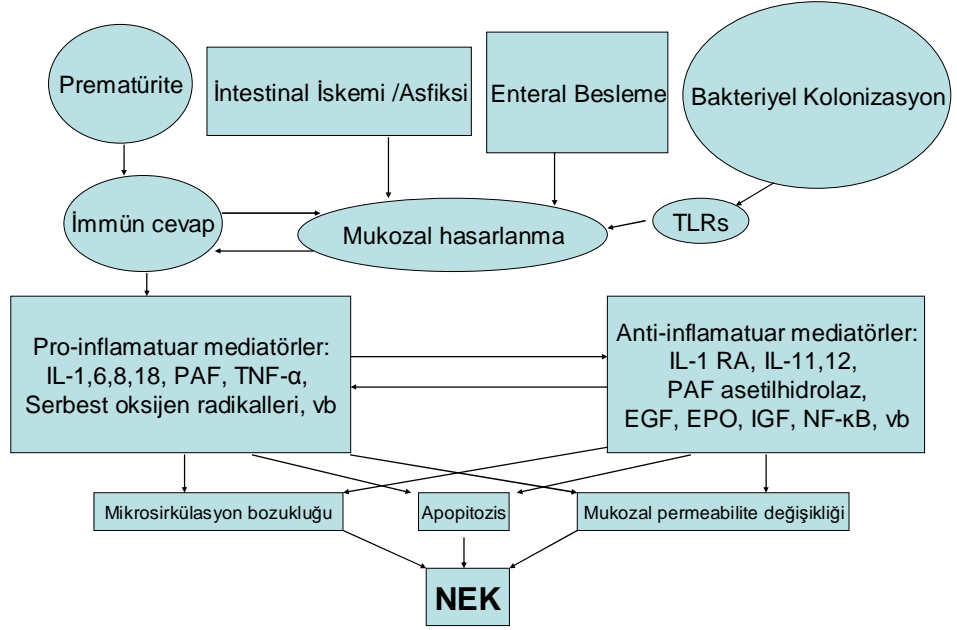
#### **4. Bakteriyel Kolonizasyon ve Sepsis**

Steril bir barsak ortamıyla doğan bebeklerde, intrauterin bir NEK olgusu şimdiye kadar tanımlanmamıştır (1). Ancak, NEK'in patofizyolojisinde infeksiyöz ajanların da rol aldığı bilinmektedir (61). Bu hastalıkta intestinal bakteri kolonizasyonu ve intestinal bakteri invazyonu önemlidir; ancak bakteri invazyonunun intestinal mokoza hasarlanmasına ikincil geliştiği düşünülmektedir (1,29,62). Anne sütü ile beslenen bebeklerde barsak *Bifidobacteria* ve *Lactobacilli* ile kolonize olurken, formula ile beslenenler koliform, enterekok ve *bacteriodes* cinsi bakterilerle kolonize olmaktadır. 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 (1,29,61). 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, mantarlar ve *corona virüs*, rota virüs ve enterovirüsler de saptanabilir (1,29,61). NEK'li olguların sadece %20-30'unun kan kültüründe üreme saptanabilirken, bakteriyemi oranının daha sık olabileceği belirtilmektedir (1,29). Lipopolisakkarit, lipoteikoik asit ve endotoksin gibi bakteri hücre duvarı komponentlerinin barsak epitelinde bulunan *Toll-like* reseptörlerini (TLR) aktive ettiği ve bunun da inflamatuvar kaskadı uyararak intestinal hasarlanmada rol aldığı belirtilmektedir (1,29,42). Lipopolisakkaridler (LPS) güçlü PAF sekretuarlarıdır ve LPS aracılı

intestinal hasarlanmada önemli rolleri vardır. PAF antagonistleri bu hasarlanmayı önlemektedir. TLR aktivasyonu sitokin cevabına ve belki de PAF'ın etkinliğini arttırarak NEK gelişimine katkıda bulunmaktadır (42). Bakteriler ayrıca endotoksinleri yoluyla da NEK patogenezinde rol oynarlar. Çalışmalarda bakteriyel endotoksinlerin intestinal sistemdeki PAF, TNF ve IL-1 üretimini aktive ederek inflamatuvar kaskadı uyardıkları ve intestinal hasar gelişimini sağladıkları gösterilmiştir (44,63). Caplan ve arkadaşlarının çalışmasında enteropatojen kolonizasyonunu önleyen ve intestinal olarak yararlı etkileri saptanan *Bifidobacterium infantis* verilen yenidoğan farelerde NEK insidansının azaldığı gösterilmiştir (64). Akısü ve arkadaşlarının çalışmasında yavru farelere oral olarak probiyotik bir ajan olan *Saccharomyces boulardi* verilmiş, kontrol grubuna göre bu farelerde intestinal hasarın daha az olduğu, intestinal hasarda major rol oynayan PAF düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmıştır (65).

Barsağın anaerobik ortamında, bakteriler beslenme ile alınan karbonhidratları hızla hidrojen, karbondioksit ve metan gibi gazlara ve asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerine (*short chain fatty acids* "SCFA") fermente eder (66). Pnömotosis intestinalis bu gazların oluşumu neticesinde gelişmektedir. Lin ve arkadaşlarının çalışmasında barsaklarda SCFA artışının bakterilerin aşırı çoğalmasına ve intestinal mukoza hasarlanmasına neden olabildiği gösterilmiştir (66,67). Savunma mekanizmaları ve laktaz gibi bazı enzim sistemleri yetersiz olan prematürelde, laktozlu besin alımı SCFA üretimine, aşırı SCFA üretiminin ise NEK patogenezinde anahtar bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (68).

Sonuç olarak, NEK halen patogenezi tam olarak anlaşılammış kompleks bir sendromdur. Genel görüş, prematürite ile birlikte hipoksik-iskemik hasar, formula ile beslenme, beslenme volümünün hızlı arttırılması, bakteriyel kolonizasyon ve sepsis, serbest oksijen radikalleri, aktive lökositler, lökotrienler, PAF, TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar mediatörler aracılığı ile ortak son yol hastalığı olan NEK'in geliştiği yönündedir (Şekil 2).



Şekil-2: NEK gelişimini etkileyen faktörler.

## KARNOZİN ( $\beta$ -ALANYL-L-HISTIDINE) VE ETKİLERİ

Karnozin  $\beta$ -alanin ve histidinden *carosine synthase* enzimi aracılığı ile sentezlenen, olfaktor bulbus ve hipokampus başta olmak üzere santral sinir sistemi, kalp kası, böbrek, mide ve iskelet kasında bolca bulunan endojen bir dipeptiddir (69-72). Nöroprotektif ve nöromodülatör bir etkiye sahip olan karnozinin iskelet kasındaki etkisinin laktik asidi nötralize edici önemli bir sitozolik tampon görevi olduğu sanılmaktadır (71). İlk kez 1900 yılında Gulewitsch ve Amiradzibi tarafından bulunan bu dipeptid, *carosinase* enzimi tarafından parçalanır (69,72). Bu enzim tek bir enzim olmayıp, geniş bir metalloproteaz ailesine dahil intraselüler ve ekstraselüler dipeptidaz grubundan oluşur (69). Karnozin, metilasyon ile *anserine* ve *ophidine*'e yıkılırken, hidrolizasyonu ile histidin ve  $\beta$ -alanin oluşur (70).

Karnozin, biyolojik yapılarda hasarlanmayı önlemekte ya da bozulmuş biyolojik yapıları restore etmektedir. Karnozin dehidrogenaz, fosforilaz b, ATPaz gibi bazı enzim ve enzim kompleksleri ve bazı iyon pompaları üzerinde koruyucu etkiye sahiptir (69). 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, ayrıca siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini arttırarak vazodilatatör etkinliği gösterilmiştir (73,74). Deneysel çalışmalarda gastrik mukozayı koruyucu etkinliği gösterilmiş, bu etkinin hücrel direnci arttırarak ve/veya lipid peroksidasyonu engelleyerek olabileceği belirtilmiştir (75,76). Çinko ve bakır aracılıklı nörotoksik etkiyi önlediği, bu elementlerin nöronal eksitabilite üzerine etkilerini düzenlediği belirtilmektedir (77). Nöron ve fibroblast kültürlerinde karnozinin koruyucu etkinliğinin mitokondri membranı ve sarkoplazmik retikülüm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle serbest oksijen radikallerinin biyolojik yapı üzerindeki zararlı etkilerini non-enzimatik olarak yok eden, güçlü doğal bir antioksidandır (69). Karnozinin antioksidan etkinliği özellikle histidin karboksil grubundan kaynaklanmakta, demir veya bakır gibi elementlerle şelasyon yapması da buna katkıda bulunmaktadır. Böylece peroksil radikallerine hidrojen atomu veren karnozin oksidatif zararlanmayı engellemektedir (78).

Akrolein, MDA gibi lipid peroksidasyon ürünleri, lizin, arginin, histidin gibi protein aminoasitleriyle etkileşime girerek, lipoprotein agregasyonları ve vasküler duvarda, ekstraselüler matriksde birikimlere neden olmaktadır. Bu olayların *atherogenesis* gelişiminde önemli olduğu belirtilmektedir. Karnozin, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA gibi çeşitli *unsaturated* aldehydlerle, hidroksil ve süperoksit radikalleri ile direkt reaksiyona girerek, hücre yapılarını bu serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktadır. Karnozin özellikle oksidatif stres esnasında ansatüre yağ asitlerinden oluşan ve biyolojik yapılar için toksik olan aldehyd, düşük moleküler ağırlıklı aldehyd, *trans-2-hexanal* ve diğer ( $\alpha$ ,  $\beta$ -*unsaturated aldehyd*) aldehydlerle reaksiyona girerek, DNA, protein ve membran gibi hücre yapılarını koruyucu etki gösterir (69-78). Karnozin, bulunduğu yıldan bu yana poliartrit, mide ve düdenal ülser, esansiyel hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları ve katarakt tedavisinde, yara iyileşmesinde antibakteriyel, antiinflamatuvar, antineoplastik, immünmodülatuvar ve nöroprotektif etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (69-78).



## **GİNGKO BİLOBA (EGb 761) VE ETKİLERİ**

Ginkgo biloba 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 %22-27 oranında içerdiği *flavanoid* ve %5-7 oranında içerdiği *terpenoid* sorumlu tutulmaktadır (6,11).

Nötrofillerin azurofilik granüllerinde lokalize olan ve dokulara nötrofil toplanmasında etkinliği saptanan MPO enzim aktivitesinin EGb 761 tarafından belirgin şekilde azaltıldığı, yine bu ajanın MDA üretimini inhibe ettiği, SOD aktivitesini arttırdığı ve NO oluşumunu *inducible* NOS (iNOS) ekspresyonunu *down* regüle ederek azalttığı gösterilmiştir (11,79). Son zamanlarda EGb 761’in NO üretimini azaltmadaki etkisinin iNOS ekspresyonunun inhibisyonu yanında, *nuclear factor-kappaB* (NF-kB)’nin süpresyonu sonucu da olabileceği belirtilmektedir (80). iNOS, COX-2 ve TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunda primer düzenleyici olarak görülen NF-kB’nin NEK patogenezinde pro-inflamatuvar faktör olarak rol aldığı bilinmektedir (1,80). EGb 761’in doza bağlı NO sentezini düzenleyerek ve vasküler endotel hücrelerinde intraselüler Ca düzeyini artırarak vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (81).

PAF antagonisti etkinliğe de sahip olan ginkgo bilobanın, hayvan deneylerinde iskemi/reperfüzyon ile intestinal hasarlanma modeli öncesi intravenöz 50 mg/kg tek doz uygulamalarında, MDA ve MPO düzeylerini ve intestinal mukoza hasarlanmasını azalttığı gösterilmiştir (9,10,82). Antioksidan özelliğe sahip EGb 761, bu etkisini hidroksil radikali ve süperoksid anyonuna karşı göstermekte, SOD düzeylerini arttırmaktadır (83-85).

## **KLARİTROMİSİN VE ETKİLERİ**

Klaritromisin, eritromisine bir metil grubunun eklenmesiyle elde edilen semisentetik makrolid grubu bir antibiyotiktir. Antibakteriyel etkinliği eritromisin ile benzer olan klaritromisin, 50S ribozomal ribonükleik asit (RNA)’ya bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir. Karaciğerde metabolize edilmektedir. Başlıca metaboliti olan 14-hidroksiklaritromisin ile birlikte aktif ilaç

esasen idrar ile aynı zamanda da safra ile atılmaktadır (12). Klaritromisin, antibakteriyel etkinliği yanı sıra immünmodülatör ve anti-inflamatuvar etkinliğe de sahiptir. Pek çok insan ve hayvan çalışmaları ile antibakteriyel etkinliği dışında klaritromisinin immünmodülatör ve anti-inflamatuvar etkinliği gösterilmiştir (86-90).

*M.pneumoniae* ile infekte edilmiş farelerin bronkoalveolar lavaj sıvısının histopatolojik ve biyokimyasal incelemelerinde, klaritromisin tedavisi ile histopatolojik belirgin düzelme, TNF- $\alpha$ , gama interferon, IL-6 ve IL-8 düzeylerinde belirgin azalma olduğu saptanmıştır (14). Plörezi modeli oluşturulan ratlarda yapılan çalışmada akut inflamasyon markırlarından TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  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 (16). Tekrarlayan akut *weezing* atağı geçiren çocuklarda çift kör randomize plasebo kontrollü bir çalışmada, klaritromisin tedavisi alanların nazofarengeal TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 düzeylerinin belirgin şekilde düşük olduğu saptanmıştır (86).

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- $\alpha$  düzeylerinde belirgin azalma olduğu gösterilerek, ilacın antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden bahsedilmiştir (13,90,91).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'na başvurularak onayı alınan bu deneysel çalışma, bir günlük ve ağırlıkları 5-8 gr olan yavru *Wistar*-albino ratlarda ağustos-aralık 2007 tarihinde 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. 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 veya ilaç uygulanmadı.

NEK grubu (Grup II, n:7): Herhangi bir ilaç uygulanmadı, doğum sonrası dördüncü günde hipoksi/reoksijenizasyon (H/R) yöntemi ile NEK modeli oluşturuldu (2).

Karnozin + NEK grubu (Grup III, n:7): Birinci günden itibaren üç gün süreyle 250 mg/kg/gün tek dozda intraperitoneal (ip) karnozin (*L-Carnosine* 5 g Flakon, 0.5 g/ml, *BioChemica, Sigma-Aldrich, Pf, D-89555 Steinheim, Swetzerland*) uygulandı ve dördüncü günde NEK modeli oluşturuldu.

Ginkgo alkaloid (EGb 761) + NEK grubu (Grup IV, n:7): Birinci günden itibaren üç gün süreyle 100 mg/kg/gün (100 mg/mL olacak şekilde dilüe edilerek) tek dozda peroral (po) ginkgo alkaloidi (Tebokan Fort Damla, 40 mg/ml, Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş. İstanbul-Türkiye) uygulandı ve dördüncü günde NEK modeli oluşturuldu.

Klaritromisin + NEK grubu (Grup V, n:7): Birinci günden itibaren üç gün süreyle 40 mg/kg/gün tek dozda subkütan (sc) klaritromisin (Klacid Flakon, 50 mg/ml, *Abbott* Laboratuvarları İth. İhr. ve Tic. Ltd. Şt. İstanbul-Türkiye) uygulandı ve dördüncü günde NEK modeli oluşturuldu.

## Hipoksi/Reoksijenizasyon Yöntemi ile NEK Modeli Oluşturma Metodu

Doğum sonrası ilk üç gün annelerinin yanında anne sütü ile beslenen ve yukarıda tanımlanan ilaçların uygulandığı rat yavruları dördüncü günde hava geçirmez kapalı bir ortamda beş dakika süreyle %100 CO<sub>2</sub> solutularak hipoksiye sokuldu; hemen ardından beş dakika süreyle %100 O<sub>2</sub> solutularak reoksijenizasyon uygulandı (2) (Şekil 3,4). Hipoksi periyodu sonrası tüm hayvanların siyanotik oldukları, gasping yaptıkları ve dışkılamalarının olduğu gözlemlendi.



Şekil 3, 4: Hava geçirmez kapalı bir ortamda H/R yöntemi uygulanışı.

Günlük vücut ağırlığı takibi yapılan çalışma gruplarındaki tüm hayvanlar doğum sonrası 4. günde (96 saatlikken), NEK modeli oluşturulanlar işlemden en az dört saat sonra servikal dislokasyon ile dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası 30 dakika içinde tüm rat yavrularının terminal ileumundan en az iki cm olacak şekilde rezeksiyon yapıldı (Şekil 5,6). Alınan barsak doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik inceleme için, bir kısmı ise biyokimyasal tetkikler için ayrıldı. Ayrıca kontrol, NEK ve klaritromisin+NEK gruplarının barsak (çekum) içeriği (gayta), dalak, karaciğer (KC), kan (vena kava inferiordan 0.5 ml) ve mezenterik lenf nodu (MLN) bakteriyel translokasyon değerlendirilmesi için steril olarak kültür örnekleri alındı.

## **Histopatolojik Değerlendirme**

Alınan barsak örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında %10 formalin ile fiske 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 (92).

### **Skorlama:**

*Grade 1:* Normal histoloji

*Grade 2:* (Minimal) Hidropik dejenerasyon ve/veya yüzeyel 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, CAT, glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve NO analizi için Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında bir biyokimya uzmanı tarafından değerlendirilinceye kadar -85 °C'de saklandı.

### **MDA Ölçümü**

H/R modeli ile barsak hasarlanması oluşturulan hayvan çalışmalarında, oksidatif stresin hücre düzeyindeki zararlı etkilerinden birisinin lipid peroksidasyonu olduğu, lipid peroksidasyonunun H/R sırasında arttığı ve NEK patogenezinde önem kazandığı bilinmektedir. Barsak doku hasarlanması lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın doku düzeyi ölçümüyle gösterilmektedir (2, 55-57). Çalışmamızda MDA ölçümü Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (93). 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 barsak dokusunun gramı başına  $\mu\text{mol/g}$  olarak verildi.

### **Glutasyon (GSH) Düzeyi, Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Katalaz Aktivite Ölçümü**

H/R sonrası yoğun olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri intestinal doku hasarından sorumlu temel faktörlerdir (1,18,19,29,30). Antioksidan sistemler ise serbest oksijen radikalleri ile ilişkili doku hasarında, serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak koruyucu etki gösterir. En önemli antioksidatif defans sistemlerinden birisi glutasyon metabolizması olup, hayvan çalışmalarında antioksidatif enzimlerden katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi enzim aktivitelerinin barsaklarda düşük aktivitede olduğu ve yaşla arttığı, üstelik NEK şiddetini belirgin azalttığı ortaya konmuştur (31-35).

Çalışmamızda doku örneklerindeki total GSH içeriğinin tespiti için metafosforik asit kullanılarak protein presipitasyonu ve 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona sokularak renk değişimi oluşturuldu. Ortaya çıkan renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar mg/g yaş doku olarak verildi (94).

GSH-Px aktivitesi için 75 mmol fosfat tamponu (pH7.0) solüsyonundan 2.0 ml, 60 mmol GSH'den 50 mikrolitre, 30 U/ml glutasyon redüktazdan 0.1 ml, 15 mmol etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)'in disodyum tuzundan 0.1 ml, 3 mmol NADPH'dan 0.1 ml ve doku örneğinden de bir miktar alarak 3.0 ml'lik bir karışım hazırlandı. Bu karışıma 7.5 mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 0.1 ml eklenerek, NADPH'ın  $\text{NADP}^{+}$  ye dönüşümü sağlandı. Bu dönüşüm absorban değişim oranı olarak 3 dk süreyle 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar mU/g yaş doku olarak verildi (95).

Katalaz aktivitesi ölçümü Aebi yöntemi ile yapıldı (96). Doku örneği 50 nM fosfat tamponu (pH 7.0), 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve eritrosit lizat ile bir karışım hazırlandı. Oda ısısında 30 sn'de 240 nm'de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşumu değerlendirildi ve katalaz aktivitesi U/g yaş doku olarak verildi

## **Nitrik Oksit Ölçümü**

NO, nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla argininin sitriline dönüşüm ürünüdür. NO süperoksit ile reaksiyona girerek potent bir oksidan olan peroksinitrite dönüşür (ONOO<sup>-</sup>). Oluşan peroksinitrit inflamatuvar yanıtta NO'in sitotoksik ve patolojik etkisinden sorumludur (97,98). Çalışmamızda NO (nitrit + nitrat) ölçümü kadmiyum redüksiyon metodunun bir modifikasyonu olan Navarro-Gonzalves yöntemi ile değerlendirildi (99). Nitrit varlığı sülfaniamidin diazotizasyonu ve naftiletilen daimine bağlanması ile tespit edildi. 400 mikrolitre örnek, 80 µl %30 ZnSO<sub>4</sub> ile denatüre edildi ve 10000 devirde 4 °C'de 20 dakikada santrifüj edildi. Daha sonra glisin-NaOH tamponu içinde CuSO<sub>4</sub> solüsyonu kullanılarak kadmiyum granülleri aktive edildi ve ardından deproteinize 100 µl örnek ile standart solüsyon eklendi. Böylece kadmiyum kullanılarak nitratın nitrite indirgenmesi sağlandı ve örnekler spektrofotometrik olarak değerlendirilip, KNO<sub>3</sub> standartına karşı otomatik olarak ölçüldü ve sonuçlar µM/g yaş doku olarak verildi.

## **Bakteriyel Translokasyonun Değerlendirilmesi**

Bakteriyel translokasyon (BT) çeşitli mikroorganizmaların veya bunların lipopolisakkarid gibi endotoksinlerinin sağlam intestinal bariyerden geçmesi olarak tanımlanır (100,101). NEK patofizyolojisinde intestinal bakteri invazyonu ve kolonizasyonu önemli olup, bakteriyel invazyonun intestinal mukoza hasarlanmasına ikincil geliştiği düşünülmektedir (1,29,62).

Kontrol, NEK ve klaritromisin+NEK gruplarındaki rat yavruları dekapite edildikten sonra 30 dakika içinde steril teknik ve aletler kullanılarak orta hattan batına girildi. Barsak (çekum) içeriği (gayta), dalak, karaciğer, kan (vena kava inferiordan 0.5 ml) ve mezenterik lenf nodundan aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların kantitatif kültürü için steril olarak doku ve kan örnekleri alındı. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında mesenterik lenf nodları, karaciğer, dalak ve gayta örnekleri daha önce darası alınmış steril tüplere konularak tekrar tartıldı. Alınan dokuların üzerine 1 ml steril serum fizyolojik eklenerek homojenize edildi. Homojenize edilen dokulardan bir öze dolusu (0.01ml) alınarak, kanlı agar ve *eosine methylen*

*blue* (EMB) agar besiyerlerine ekim yapıldı. Plaklar 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Daha sonra üreme olan plaklardaki koloniler uzman bir mikrobiyolog tarafından sayıldı ve dokudaki bakteri miktarı hesaplandı. Steril koşullarda 0.5 ml olacak şekilde alınan kan örnekleri 5ml *brain heart infusion broth* besiyerine konuldu. Kan kültürleri 37°C'de 7 gün inkübe edildi. Daha sonra kanlı agar ve EMB agar besiyerlerine sub kültürleri yapılarak uzman bir mikrobiyolog tarafından üremeleri değerlendirildi. Bakteri türlerinin tanımlanması standart mikrobiyolojik yöntemlere göre yapıldı. Kolonizasyon ise doku homojenizatının her bir gramındaki koloni oluşturan bakteri ünitelerinin (CFU) sayısı ile belirlendi. Bakteri sayısı 100 ve üzerinde olanlar BT için anlamlı kabul edilmektedir (102). Biz çalışmamızda bakteri sayısı 1000 ve üzerini BT için anlamlı kabul ettik.

### **İstatistiksel Analizler**

Vücut ağırlıkları, histopatolojik ve biyokimyasal bulgular ortanca ve minimum-maksimum aralıklara göre verilirken, mikrobiyolojik sonuçlarda kültür pozitifliği frekans ve yüzde olarak verildi. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemede non-parametrik test (*Kruskal Wallis* ve *Mann-Whitney U* testi) kullanıldı. Saptanan sonuçlar arasındaki farklılık için  $p < 0.05$  olduğu durumlar istatistiksel bakımdan anlamlı olarak değerlendirildi. 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

Deney boyunca annelerinin yanında kalan ve anne sütü ile beslen yavru ratların üç günlük izleminde; her bir grubun günlük vücut ağırlığı artışının olduğu ve gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı saptandı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2).

Barsakların histopatolojik incelemesinde; kontrol grubunun tümü normal histopatolojik (*grade* 1) yapıya sahipken, H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen rat yavrularının barsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar ile mikroskopik olarak hepsinde villüs epitel hücre nekrozu (*grade* 3) hasarlanma olduğu saptandı. Diğer gruplardaki rat yavrularının barsaklarının histopatolojik incelemesi *grade* 1 ile *grade* 3 arasında değişmekteydi (Şekil 5-9). NEK grubu (H/R ve tedavi verilmeyen) ile kontrol, Karnozin+NEK ve Klaritromisin+NEK grupları arasında barsak histopatolojik incelemeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla  $p=0.000$ ,  $p=0.023$  ve  $p=0.009$ , Tablo 3). NEK grubu ile EGb 761+NEK grubu arasında ise barsak histopatolojisi bakımından istatistiksel bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ , Tablo 3). Bu bulgular ile H/R yöntemiyle rat yavrularının barsaklarında histopatolojik olarak *grade* 3 hasarlanma meydana geldiği, karnozin ve klaritromisinin H/R modeli ile NEK oluşturulan rat yavrularının barsaklarında NEK'e karşı histopatolojik olarak koruyucu etkinliğe sahip olduğu, ancak ginkgo alkaloidinin koruyucu etkiye sahip olmadığı görüldü.



**Şekil-5, 6:** NEK modeli oluşturulan ve tedavi verilmeyen rat yavrusu barsaklarının makroskopik görünümü. Belirgin renk değişikliği, kanama odakları ve nekrotik alanlar dikkati çekiyor.

**Tablo-2:** Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının birinci, ikinci ve üçüncü gün vücut ağırlıkları (median  $\pm$  std deviasyon) ve dağılımı.

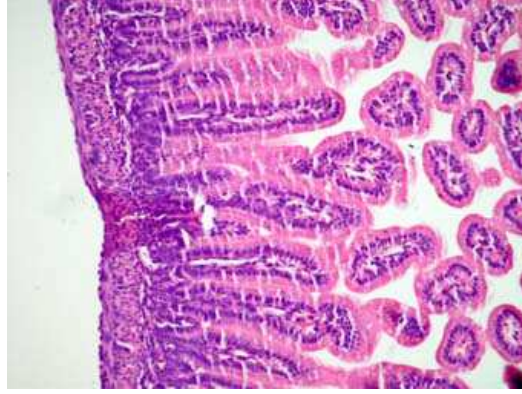
Gruplar* (Sayı)	1. gün	2. gün	3. gün
<b>Kontrol</b> (n:7)	6.0 $\pm$ 0.30 (5.40-6.20)	6.6 $\pm$ 0.39 (6.10-7.20)	7.5 $\pm$ 0.47 (6.90-8.10)
<b>NEK = H/R</b> (n:7)	5.5 $\pm$ 0.45 (4.80-6.20)	6.3 $\pm$ 0.32 (5.60-6.60)	7.2 $\pm$ 0.40 (6.40-7.60)
<b>Karnozin+NEK</b> (n:7)	5.7 $\pm$ 0.23 (5.30-6.00)	5.8 $\pm$ 0.60 (5.00-6.80)	6.8 $\pm$ 0.55 (6.20-7.80)
<b>EGb 761+NEK</b> (n:7)	6.0 $\pm$ 0.40 (5.30-6.30)	7.0 $\pm$ 0.44 (6.20-7.20)	7.6 $\pm$ 0.66 (6.80-8.40)
<b>Klaritromisin+NEK</b> (n:7)	6.0 $\pm$ 0.69 (4.90-6.60)	6.6 $\pm$ 0.69 (5.60-7.40)	7.6 $\pm$ 0.44 (6.80-8.00)

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

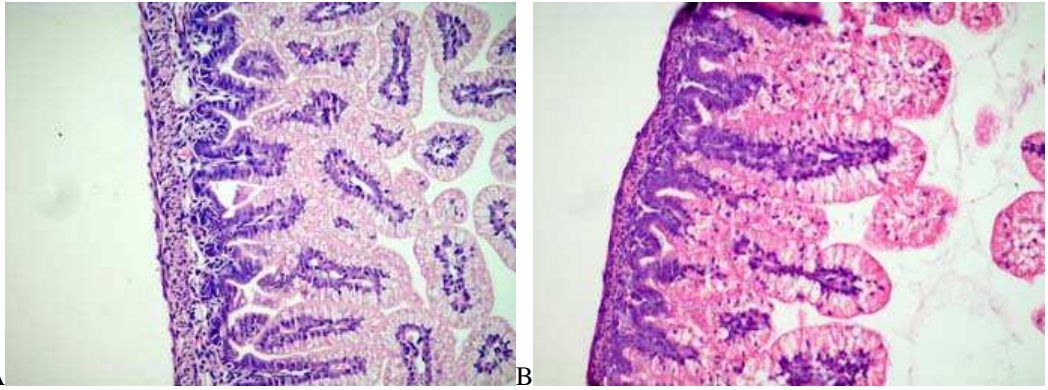
**Tablo-3:** Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının barsaklarının histopatolojik değerlendirme (*grade*) skorları.

Gruplar	Histopatolojik <i>Grade</i> Median (Range)
<b>Kontrol</b>	1.0 (1-1)
<b>NEK = H/R</b>	3.0 (3-3)*
<b>Karnozin + NEK</b>	2.4 (2-3)
<b>EGb 761 + NEK</b>	2.7 (1-3)
<b>Klaritromisin + NEK</b>	1.8 (1-3)

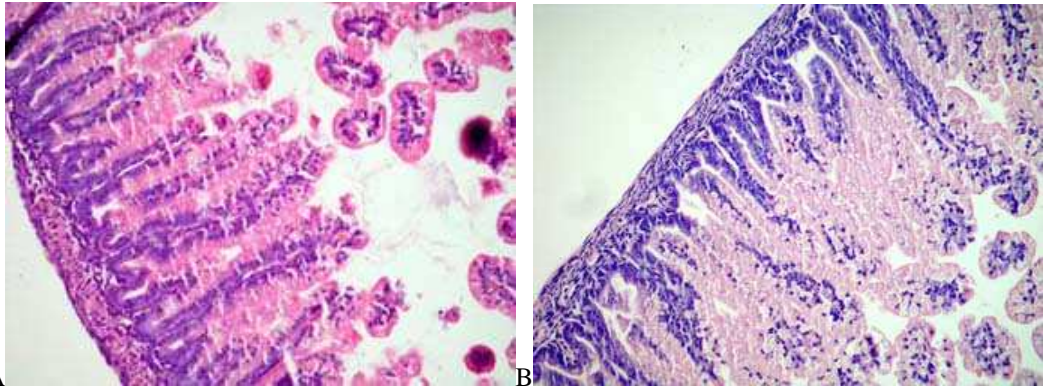
\* : NEK (H/R) grubu ile kontrol, karnozin + NEK ve klaritromisin + NEK gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla p=0.000, p=0.023 ve p=0.009).



**Şekil-7:** Kontrol grubu. Normal histoloji, *grade 1*. (H&E, x1/160).



**Şekil-8:** Yüzeş epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, *grade 2*. A: Karnozin grubu, H&E, x1/200. B: Klaritromisin grubu, H&E, x1/160.



**Şekil-9:** Villus epitel hücre nekrozu, *grade 3*. A: NEK grubu, H&E, x1/160. B: EGb 761 grubu, H&E, x1/200.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın barsak doku düzeyi değerlendirildiğinde, NEK grubunda en yüksek MDA düzeyi, kontrol grubunda ise en düşük MDA düzeyi saptanmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ). Çalışmaya alınan diğer gruplar MDA bakımından

karşılaştırıldığında, NEK grubuna göre karnozin ve özellikle klaritromisin grubunda barsak doku MDA düzeyleri düşüktü; ancak istatistiksel olarak bir farklılık yoktu ( $p>0.05$ ). EGb 761+NEK grubunda ise MDA düzeyi NEK grubu ile benzerdi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4). H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan rat yavrularında, H/R'nin NEK'te barsak doku MDA düzeyini arttırdığı, karnozin ve özellikle klaritromisinin barsak MDA düzeyini azalttığı, EGb 761'in ise değiştirmedığı saptanmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı.

NEK'te inflamatuvar mediatör olarak belirtilen NO barsak doku düzeyleri incelendiğinde, en yüksek NO düzeyinin NEK grubunda olduğu görüldü. Gruplar karşılaştırıldığında, NEK grubu barsak doku NO düzeyinin kontrol grubuna göre belirgin artış gösterdiği saptandı ( $p<0.05$ ). Karnozin ve klaritromisinin, NEK grubuna göre barsak doku NO düzeyini anlamlı oranda azalttığı ( $p<0.05$ ), EGb 761'in ise barsak doku NO düzeyini NEK grubuna göre azaltmakla birlikte farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ). Ayrıca karnozin ve klaritromisinin barsak doku NO düzeyini EGb 761'e göre de belirgin olarak azalttığı saptandı ( $p<0.05$ ). İnflamatuvar bir mediatör olan NO'nin barsak doku düzeyi NEK'te belirgin olarak artmakta, karnozin ve klaritromisin NEK'te barsak doku NO düzeyini belirgin olarak azaltmaktadır ( $p<0.05$ ) (Tablo 4).

Anti-oksidatif enzimlerden katalaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyonun barsak doku düzeyleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında; NEK grubunda katalaz aktivitesinin en düşük olduğu, diğer grupların katalaz aktivitesinin NEK grubuna göre artmış olmakla birlikte aradaki farklılığın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ( $p>0.05$ ) (Tablo 4).

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi değerlendirildiğinde, NEK grubunun glutasyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubu, karnozin ve klaritromisin grubuna göre belirgin olarak düşük saptandı ( $p<0.05$ ). EGb 761 grubunun glutasyon peroksidaz aktivitesi NEK grubuna göre düşük, ancak istatistiksel olarak fark anlamsız bulundu ( $p>0.05$ ). Karnozin ve klaritromisin grubunun glutasyon

peroksidaz aktivitesi EGb 761 grubunun glutatyon peroksidaz aktivitesine göre belirgin olarak yüksek saptandı ( $p<0.05$ ) (Tablo 4).

**Tablo-4:** Biyokimyasal olarak çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (yaş gram doku başına) katalaz (CAT), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), nitrik oksit (NO) ve malonildialdehid (MDA) düzeyleri ve bunların (median ve dağılımı) istatistiksel değerlendirilmesi.

Gruplar	MDA $\mu\text{mol/g}$	NO $\mu\text{mol/g}$	CAT U/g	GSH-Px mU/g	GSH mg/g
<b>Kontrol</b>	0.23 (0.11-0.63)	0.34 (0.25-1.17)	150,5 (80.7-218.3)	2165,5 (1347,0-2732,5)	4.1 (2.5-7.6)
<b>NEK</b>	0.33 (0.24-0.72)	0.55* (0.41-0.65)	80,7 (65,4-174,0)	1385,5‡ (749,2-1893,5)	2.8¶ (2.5-3.4)
<b>Karnozin + NEK</b>	0.28 (0.20-0.95)	0.18 (0.05-0.58)	137.6 (72.9-379,6)	2245,0 (903,1-3212,7)	3.9 (3.1-6.4)
<b>EGb761 + NEK</b>	0.33 (0.24-0.43)	0.36† (0.31-0.75)	129,3 (71.2-327.1)	1282,9§ (738,9-1662,6)	3.2** (2.7-5.3)
<b>Klaritromisin + NEK</b>	0.24 (0.23-0.36)	0.20 (0.01-0.60)	160,7 (80.7-261,6)	2719,7 (1642,1-4310,5)	4.1 (2.4-7.2)

\* : NEK grubu ile kontrol, karnozin + NEK ve klaritromisin + NEK grupları arasında  $p<0.05$  (sırasıyla  $p=0.048$ ,  $p=0.009$  ve  $p=0.013$ ).

† : EGb 761 + NEK grubu ile karnozin + NEK ve klaritromisin + NEK grupları arasında  $p<0.05$  (sırasıyla  $p=0.018$  ve  $p=0.048$ ).

‡ : NEK grubu ile kontrol, karnozin + NEK ve klaritromisin + NEK grupları arasında  $p<0.05$  (sırasıyla  $p=0.025$ ,  $p=0.035$  ve  $p=0.004$ ).

§ : EGb 761 + NEK grubu ile karnozin + NEK ve klaritromisin + NEK grupları arasında  $p<0.05$  (sırasıyla  $p=0.013$  ve  $p=0.003$ ).

¶ : NEK grubu ile kontrol ve karnozin + NEK grubu arasında  $p<0.05$  (sırasıyla  $p=0.029$  ve  $p=0.003$ ).

\*\* : EGb 761 grubu ile karnozin + NEK grubu arasında  $p<0.05$  ( $p=0.035$ ).

Barsak doku glutatyon düzeyleri değerlendirildiğinde, en düşük glutatyon düzeyi NEK grubunda saptandı. Kontrol ve karnozin grubu glutatyon düzeyleri NEK grubuna göre belirgin yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Ayrıca karnozin grubunun

glutasyon düzeyi EGb 761 grubuna göre de belirgin olarak yüksek saptandı ( $p<0.05$ ). Glutasyon düzeyi bakımından diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 4). Sonuç olarak glutasyon ve glutasyon peroksidaz aktivitesinin NEK'te belirgin olarak düştüğü, karnozinin her ikisini, klaritromisin ise sadece glutasyon peroksidaz aktivitesini NEK'te belirgin olarak arttırdığı gösterildi.

Kontrol, NEK ve klaritromisin+NEK grupları kan, MLN, karaciğer, dalak ve gaytada bakteri üremesi bakımından karşılaştırıldığında; kontrol grubunda sadece dört rat yavrusunun gayta kültüründe üreme (%57), NEK grubunda kanda dört (%57), MLN'de altı (%86), karaciğer ve dalakta birer (%14) ve gaytada altı (%86) rat yavrusunda üreme saptandı. NEK grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, NEK grubunun kan, MLN ve gayta kültürlerindeki üremelerin anlamlı oranda yüksek olduğu, üreyen mikroorganizmaların hepsinin gram negatif bakteri (*E coli* ve *Klebsiella*) olduğu görüldü ( $p<0.05$ ) (Tablo 5, 6).

**Tablo-5:** Kontrol, NEK ve klaritromisin+NEK gruplarındaki rat yavrularının kan, mezenterik lenf nodu, karaciğer, dalak ve gayta kültür sonuçlarına göre bakteriyel translokasyon insidansı.

Gruplar	Kan	Mezenterik Lenf Nodu	Karaciğer	Dalak	Gayta
<b>Kontrol</b>	0/7 (%0)*	0/7 (%0)*	0/7 (%0)	0/7 (%0)	4/7 (%57)*
<b>NEK</b>	4/7 (%57)	6/7 (%86)†	1/7 (%14)	1/7 (%14)	6/7 (%86)
<b>Klaritromisin + NEK</b>	2/7 (%29)	1/7 (%14)	0/7 (%0)	0/7 (%0)	4/7 (%57)

\* : Kontrol grubu ile NEK grubu arasında  $p<0.05$  (sırasıyla  $p=0.019$ ,  $p=0.001$  ve  $p=0.014$ ),

† : NEK grubu ile klaritromisin + NEK grubu arasında  $p<0.05$  ( $p=0.033$ ) saptandı.

Kanda üreme saptanan NEK grubu rat yavrularının hepsinin MLN ve gayta kültürlerinde de anlamlı üremelerin olduğu saptandı. Bu sonuçlar bakteriyel translokasyonun NEK'te önemli bir etmen olduğunu doğrulamaktadır. Klaritromisin grubunda ise kanda iki (%29), MLN'de bir (%14), gaytada dört (%57) rat yavrusunda üreme saptanırken, karaciğer ve dalakta üreme olmadığı görüldü. NEK grubu ile klaritromisin+NEK grubu karşılaştırıldığında alınan tüm

doku kùltùrlerinde ùremede bir azalma olmakla birlikte sadece MLN kùltùrùndeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). Klaritromisinin, NEK modeli oluşturulan rat yavrularının mezenterik lenf nodunda bakteriyel translokasyonu azalttığı gùsterildi.

**Tablo-6:** Kontrol, NEK ve Klaritromisin + NEK gruplarının kan, mezenterik lenf nodu, karaciğer, dalak ve gayta kültürlerinde saptanan mikroorganizma üremeleri.

Rat No	GRUP I (Kontrol)					GRUP II (NEK)					GRUP V (Klaritromisin + NEK)				
	Kan	MLN	KC	Dalak	Gayta	Kan	MLN	KC	Dalak	Gayta	Kan	MLN	KC	Dalak	Gayta
1	0	0	0	0	4*	0	4*	0	0	5*	5*	0	0	0	4*
2	0	0	0	0	4*	5†	4*	3†	4†	5*	0	0	0	0	5*
3	0	0	0	0	4*	5†	4*	0	0	5*	0	0	0	0	4*
4	0	0	0	0	0	5*	4*	0	0	5*	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	5*	4*	0	0	4*	5†	5*	0	0	4‡
6	0	0	0	0	4*	0	4*	0	0	4*	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Kısaltmalar:** 0 = Kültürde üreme yok,  $10^4 = 10000$  CFU/gr,  $10^5 = 100\ 000$  CFU/gr, ve  $>10^5 = > 100\ 000$  CFU/gr üremeleri belirtmektedir. \*: *Escherichia Coli*, †: *Klebsiella spp.*, ‡: *Klebsiella spp.* + *E. Coli* üremelerini belirtmektedir.

MLN: Mezenterik lenf nodu, KC: Karaciğer



## TARTIŞMA

Nekrotizan enterokolit, yenidoğan döneminde, sıklıkla prematüre yenidoğanları etkileyen önemli bir gastrointestinal acil sorundur. Son yıllarda, YYBÜ bakım koşullarındaki bilimsel ve teknolojik gelişmelere rağmen, NEK'de mortalite oranlarının düzelmediği, bu oranın %10 ile %30 arasında olduğu rapor edilmiştir (1). YYBÜ'ndeki gelişmeler ve prematüre bebeklerin daha uzun süre yaşatılabilmesi nedeniyle NEK sıklığı artış göstermiştir. NEK insidansı %1-5 arasında değişmekte ve olguların %65-95'ini prematürelere oluşturmaktadır (1, 17).

YYBÜ'lerindeki teknolojik gelişmelere rağmen yüksek mortalite oranı, uzun dönemde ciddi komplikasyonları ve hastane masraflarının fazla olması, NEK patofizyolojisinin anlaşılmasına ve hastalığın tedavisine yönelik çalışmalara ne kadar ihtiyaç olduğunu açıklar.

NEK, patogenezi halen tam olarak anlaşılammış kompleks bir sendromdur. Ancak, patogeneze, prematüre doğum ile birlikte hipoksik-iskemik hasar, enteral ve formula ile besleme, beslenme volümünün hızlı artırılması, bakteri kolonizasyonu ve sepsis gibi birçok predispozan faktör sorumlu tutulmaktadır. Bu faktörler eşliğinde serbest oksijen radikalleri, aktive lökositler, lökotrienler, PAF, TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar mediatörler aracılığıyla NEK'te ortak son yol olan barsak nekrozu gelişmektedir (1-3,29,35,42-47).

Nekrotizan enterokolit olgularının %65-95'ini prematüre doğan bebekler oluşturmaktadır (1,17). Deneysel çalışmalarda yedi günlük ve daha büyük rat yavrularının santral sinir sistemi matürasyonunun term insan yavrularının beyin gelişimine denk geldiği, yedi günden küçük rat yavrularının preterm bebeklere denk geldiği, hatta üç günlük ratların 28-32 haftalık fetusa karşılık geldiği belirtilmektedir (103,104). NEK bir prematüre hastalığı olduğu için, çalışmamıza prematüre fetusa karşılık gelen postnatal 1-4 günlük rat yavruları alındı.

Hipoksik stres durumunda kan akımı splanknik yataktan beyin, kalp ve adrenal bezler gibi hayati organlara yönelir. Bunun sonucu çeşitli organlarda iskemik hasar gelişir (1,37). Hayvan çalışmalarında intestinal iskemiye takiben reperfüzyon sonucu barsak nekrozu geliştiği gösterilmiştir (2,38,39). Okur ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yeni bir yöntem ile hipoksi-reoksijenizasyon uygulanarak rat yavrularında NEK modeli oluşturulmuştur (2). Başka pek çok deneysel çalışmada Okur ve arkadaşlarının yöntemi uygulanmış ve histopatolojik ve biyokimyasal olarak insanlardaki NEK'e benzer barsak doku hasarlanmasının meydana geldiği gösterilmiştir (2,55-57). Çalışmamızda da aynı yöntem uygulandı.

Hipoksi ve reperfüzyon sonrası intestinal zedelenmenin ortamdaki hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süreoksit ( $O^-$ ) ve hidroksil anyonu ( $OH^-$ ) gibi serbest oksijen radikalleri aracılığıyla geliştiği, bu radikallere bağlı olarak nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı meydana geldiği ve hücre ölümünün gerçekleştiği belirtilmektedir (2,19,20,33,40).

Bu çalışmada H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan rat yavrularına, H/R öncesi profilaktik olarak karnozin 250 mg/kg/gün, ip, ginkgo alkaloidi 100 mg/kg/gün, po ve klaritromisin 40 mg/kg/gün, sc uygulanarak, bu ilaçların histopatolojik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak NEK'e karşı koruyucu etkinliği araştırıldı. Karnozin, ginkgo alkaloidi ve klaritromisinin NEK'teki etkinliğini araştıran bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Okur ve arkadaşlarının modeli kullanılarak H/R yöntemiyle intestinal hasarlanma (NEK modeli) oluşturulan ratların terminal ileumundan alınan barsaklarında makroskopik olarak belirgin renk değişikliği, hafif ödem ve lokalize küçük hemorajik alanlar, mikroskopik olarak villüs epitel hücre nekrozu (*grade* 3) saptanırken, kontrol grubu tümüyle normal olarak bulundu. Histopatolojik değerlendirmede bulgularımız, uyguladığımız H/R modeli ile yapılan birçok deneysel çalışmadaki NEK grubu barsak histopatolojik bulguları ile benzerdi (2,55-57,105,106). Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi

hipoksi/reoksijenizasyonun NEK patogenezinde önemli bir risk faktörü olduğu gösterildi.

Oksidatif stresin hücre düzeyindeki zararlı etkilerinden birisi lipid peroksidasyonudur. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olup, H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ratlarda yapılan deneysel çalışmalarda MDA düzeylerinin NEK grubunda belirgin olarak yüksek saptandığı pek çok kez rapor edilmiştir (2,55-57,106). Çalışmamızda NEK grubunda barsak doku MDA düzeylerini kontrol grubuna göre yüksek saptamakla birlikte istatistiksel olarak anlamsız bulduk.

Nitrik oksit, argininin nitrik oksid sentaz enzimi aracılığıyla sitriline dönüşüm ürünü olup, süperoksit ile reaksiyona girerek potent bir oksidan olan peroksinitrite dönüşmektedir. İnflamatuvar yanıtta NO'nun sitotoksik ve patolojik etkilerinden, oluşan peroksinitrit sorumludur (97,98). Potoka ve arkadaşları tarafından, invitro enterosit hücre kültürlerinde endotelial *growth* faktör (EGF) ile uyarılmış enterosit proliferasyonunun, ortama peroksinitrit ilavesi ile inhibe olduğu gösterilmiş; böylece peroksinitritin mukoza inflamasyonuna katkıda bulunarak barsak bariyer disfonksiyonuna neden olabileceği belirtilmiştir (107). Sonuç olarak NO, NEK gelişimine katkıda bulunabilen inflamatuvar bir mediatördür (108).

H/R yöntemiyle NEK oluşturulan iki deneysel çalışmada, Zhang ve arkadaşları NEK'te NO düzeyini kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulurken; Kabaroğlu ve arkadaşları NEK'te nitrat düzeyini kontrol grubuna göre düşük düzeyde, ancak istatistiksel olarak anlamsız saptamışlardır (106,109). Potoka ve arkadaşları NO'nun iNOS aracılığıyla salınarak hücre hasarlanması ve barsak bariyer bozukluğuna neden olabileceğini; Upperman ve arkadaşları ise inflamatuvar bir sitokin olan NO'nun aşırı üretiminin NEK patogenezinde anahtar role sahip olduğu ve NEK gelişimine katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (98,108). Çalışmamızda NEK modeli oluşturulan grubun barsak doku örneklerinde NO düzeylerini kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek saptadık. Bu bulgularımız ve yukarıda belirtilen literatür bilgileri eşliğinde

NO'nun NEK gelişiminde inflamatuvar bir mediatör olarak çok önemli bir role sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Prematürelde hipoksi reoksijenizasyon sonrası yoğun olarak ortama salıverilen serbest oksijen radikallerine karşı koruyucu olan antioksidan defans sistemleri yetersizdir (1,18,19,29,30). En önemli antioksidatif defans sistemlerinden birisi glutasyon metabolizması olup, hayvan çalışmalarında antioksidatif enzimlerden katalaz ve glutasyon peroksidazın enzim aktivitelerinin barsaklarda düşük düzeylerde olduğu ve yaşla aktivite düzeylerinin arttığı, üstelik NEK şiddetini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (31-35). Çalışmamızda, antioksidan defans sistemlerinden katalaz ve glutasyon peroksidaz enzim aktiviteleri ile glutasyon düzeyleri değerlendirildiğinde, her üçünün de NEK grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu, ancak glutasyon ve glutasyon peroksidaz aktivitesi düşüklüğünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Böylece en önemli antioksidatif defans sistemlerinden birisi olan glutasyon ve glutasyon peroksidaz enzim aktivitelerinin NEK'te belirgin olarak azalmış olduğu gösterildi.

NEK patofizyolojisinde intestinal bakteri invazyonu ve kolonizasyonu önemli olup, bakteriyel invazyonun intestinal mukoza hasarlanmasına ikincil geliştiği düşünülmektedir (1,29,63). 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, mantarlar ve *corona* virüs, rota virüs ve entero virüs gibi virüsler de etken olarak saptanabilmektedir (1,29,61). Olguların sadece %20-30'unda kan kültüründe üreme gösterilebilmekte, ancak bakteriyemi olasılığının daha sık olduğu belirtilmektedir (1,29). Lipopolisakkarit, lipoteikoik asit ve endotoksin gibi bakteri hücre duvarı komponentleri güçlü PAF sekretuarları olup, bu komponentler ayrıca barsak epitelinde bulunan TLR'yi aktive ederek inflamatuvar kaskadı uyarmakta ve intestinal hasarlanmada önemli rol almaktadırlar (1,29,42). TLR aktivasyonu sitokin cevabını ve belki de PAF'ın etkinliğini arttırarak NEK gelişimine katkıda bulunmaktadır. PAF antagonistleri bu hasarlanmayı önlemektedir (42). Ayrıca, bakteriyel endotoksinlerin intestinal

sistemdeki PAF, TNF ve IL-1 üretimini aktive ederek inflamatuvar kaskadı uyardıkları ve intestinal hasar gelişimini sağladıkları gösterilmiştir (44,63).

Çeşitli mikroorganizmaların veya bunların endotoksinlerinin intestinal bariyeri geçmesi olarak tanımlanan bakteriyel translokasyon bakımından çalışmamızı değerlendirdiğimizde; kontrol grubunda sadece yedi rat yavrusunun dördünde (4/7) ve sadece gaytada *E coli* ürediği saptanırken; NEK grubunda yedi rat yavrusunun altısında (6/7) mezenterik lenf nodunda, altısında gaytada (6/7), dördünde kanda (4/7), birinde karaciğer ve dalakta (1/7) *E coli* ve *Klebsiella spp.* ürediği saptandı. Kontrol ve NEK grupları karşılaştırıldığında NEK grubunda mezenterik lenf nodu, gayta ve kan kültürü üremelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu; özellikle kan kültüründe üreme saptanan NEK grubu ratların tümünde mezenterik lenf nodu ve gayta kültürlerinde de anlamlı üremelerin olduğu görüldü. Üreyen mikroorganizmalar hep gram negatif bakteriler olarak belirlendi. Bu da literatür bilgileri ile benzer olarak değerlendirildi. Böylece NEK grubunda bakteriyel translokasyonun varlığı, yani enfeksiyon ajanlarının NEK patogeneğinde önemli bir risk faktörü olduğu görüldü. NEK grubunun histopatolojik bulguları da göz önüne alındığında bakteriyel translokasyonun hipoksi sonrası intestinal mukoza hasarlanmasına ikincil geliştiği düşünüldü.

Endojen bir dipeptid olan karnozin, serbest oksijen radikallerinin biyolojik yapı üzerine zararlı etkilerini enzimatik olmayan yoldan yok eden, güçlü bir antioksidan ajandır (69). Antioksidan etkinliği histidinin karboksil grubundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, demir veya bakır gibi elementlerle geçici şelasyonlar yapması da antioksidan etkisine katkıda bulunmaktadır. Böylece güçlü oksidan etkinliği olan peroksi radikallerine hidrojen atomu vererek oksidatif zararlanmayı engellemektedir (78). Bunlara ek olarak, karnozinin lipid peroksidasyon ürünü olan MDA gibi çeşitli *unsaturated* aldehydlerle, hidroksil ve süperoksit radikalleri ile de direkt reaksiyona girerek, hücresel yapıları bu tür serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden koruduğu bildirilmektedir (69-78).

Stvolinsky ve arkadaşlarının iskemik beyin hasarı oluşturduğu ratlarda iskemi öncesi tek dozda 250 mg/kg ip olarak uygulanan karnozinin nöroprotektif etkili olduğu, bu etkinin sadece antioksidan özelliğinden değil, aynı zamanda Na/K-ATPase gibi enzim sistemlerini düzenleyici özelliğinden kaynaklandığı belirtilmektedir (110). Karnozinin fosforilaz b, dehidrogenaz gibi bazı enzim ve enzim kompleksleri üzerine de düzenleyici ve koruyucu etkinliğinin olduğu bildirilmektedir. Kardiyak yetmezlik modeli oluşturulan ratlarda, karnozin direkt Ca kanalına (RYR2) etki ederek hücre içi kalsiyum dengesini sağlamakta ve böylece kardiyak kontraktiletiyi düzenlemektedir. Ayrıca karnozinin cGMP düzeyini arttırarak vazodilatatör etkinliği ile bazı iyon pompaları üzerinde de koruyucu etkisinin olduğu rapor edilmiştir (69,73,74). Karnozin, bulunduğu yıldan bu yana poliartrit, mide ve düedenal ülser tedavisinde, yara iyileşmesinde, iskemik kalp hastalıklarında anti-inflamatuvar, immünmodülatör ve nöroprotektif etkileri için kullanılmıştır (69-78). Çalışmamızda 250 mg/kg, ip tek dozda proflaktik uygulanan karnozinin NEK'te koruyucu etkinliği araştırıldı.

Yoshikawa ve arkadaşlarının iskemi-reperfüzyon modeliyle, Arakawa ve arkadaşlarının ise etanol ile ratlarda yaptıkları çalışmalarda, gastrik mukoza hasarlanması oluşturulmadan önce uygulanan oral *zinc-carnosine* ile oral veya intraperitoneal (10 veya 30 mg/kg) *zinc L-carnosine*'nin gastrik mukoza hasarlanmasını belirgin şekilde azalttığı gösterilmiş; karnozinin bu etkisinde lipid peroksidasyonu inhibisyonuna dikkat çekilmiştir (75,76). Çalışmamızda, histopatolojik olarak karnozinin NEK'te belirgin koruyucu etkinliği olduğu gösterildi. Ayrıca, karnozinin inflamatuvar bir mediatör olarak NO düzeyini NEK grubuna göre anlamlı oranda düşürdüğü, antioksidatif defans sistemlerinden GSH ve GSH-Px düzeylerini ise anlamlı oranda arttırdığı saptandı. Karnozinin NEK grubuna göre barsak dokusu MDA düzeyini azalttığı, katalaz düzeyini ise arttırdığı saptanmakla birlikte bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu çalışma ile literatürde ilk kez karnozinin antiinflamatuvar ve antioksidatif özellikleriyle NEK'te koruyucu etkinliğe sahip olduğu gösterildi.

*Flavanoid* (%22-27) ve *terpenoid* (%5-7) içeren Ginkgo bilobanın (EGb 761) esas aktivitesinden bu etken maddeler sorumlu tutulmaktadır (6,11).

Nötrofillerin azurofilik granüllerinde lokalize olan ve dokulara nötrofil toplanmasında etkinliği saptanan MPO enzim aktivitesinin EGb 761 tarafından belirgin şekilde azaltıldığı, yine bu ajanın MDA üretimini inhibe ettiği, SOD aktivitesini arttırdığı ve NO oluşumunu iNOS ekspresyonunu *down* regüle ederek azalttığı gösterilmiştir (11, 79). EGb 761 antioksidatif etkinliğe sahip bir ilaçtır. Bu etkisi hem hidroksil radikali ve süperoksit anyonuna karşı hem de SOD düzeyini arttırmakla ilişkilidir (83-85). Çalışmamızda, 100 mg/kg, oral yolla tek dozda profilaktik uygulanan EGb 761'in NEK'te koruyucu etkinliği araştırıldı.

Liu ve arkadaşlarının intestinal iskemi/reperfüzyon (İİ/R) modeli ile akciğer hasarlanması oluşturdukları yetişkin ratlarda, İİ/R öncesi 100 mg/kg oral yolla yedi gün uygulanan EGb 761'in akciğer hasarlanmasını belirgin olarak azalttığı histopatolojik olarak saptanmıştır (11). Aynı çalışmada EGb 761'in MPO aktivitesini, MDA üretimini ve NO düzeylerini belirgin şekilde azalttığı, buna karşın SOD aktivitesini belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir. NO düzeyinin azalması iNOS ekspresyonunun baskılanması ile açıklanmıştır (11).

Louajri ve arkadaşları tarafından kronik hipoksiye maruz bırakılmış yetişkin ratlarda 25 ve 50 mg/kg ip yolla uygulanan ginkgo bilobanın SOD ve GSH-Px aktivite düzeylerini doza bağlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (111). Çalışmamızda 100 mg/kg tek dozda oral yolla üç gün uygulanan EGb 761'in histopatolojik olarak NEK'te koruyucu bir etkinliğinin olmadığı gösterildi. EGb 761'in barsak dokusu NO düzeyini azaltmakla birlikte katalaz ve glutatyon düzeylerini arttırdığı; ancak NO, katalaz, GSH, GSH-Px ve MDA düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü. Çalışmamızda, rat yavrularına profilaktik olarak oral yolla verilen EGb 761'in NEK'te histopatolojik ve biyokimyasal olarak etkisiz bulunması, ilacın uygulanış biçimi ve doza bağlı olabileceğinden; ilacın aynı veya farklı dozlarda parenteral yolla uygulanmasının denenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Klaritromisin makrolid grubu bir antibiyotik olup, bakterilerin 50S ribozomal RNA'sına bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir (12). Klaritromisinin antibakteriyel etkinliğinin yanı sıra immünomodülatör ve

antiinflamatuvar etkinliğe de sahip olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (16, 86-90). Kronik inflamatuvar akciğer hastalıklarında makrolidlerin antiinflamatuvar olarak kullanıldığı ve faydalı olduğu bilinmektedir (112). Çalışmamızda klaritromisin profilaktik olarak H/R öncesi 40 mg/kg tek dozda sc yolla uygulanarak NEK'te koruyucu etkinliği araştırıldı.

Ianora ve arkadaşlarının çalışmasında plevra inflamasyonu modeli ile akut inflamatuvar yanıt oluşturulan ratlara işlem öncesi sırasıyla 10, 20 ve 40 mg/kg dozda oral yolla klaritromisin verilmiş ve ilacın antiinflamatuvar yanıtı değerlendirilmiştir (16). Klaritromisin 10 mg/kg dozda uygulandığında etkisiz bulunurken, hem 20 hem de 40 mg/kg dozda uygulandığında plevral eksuda sıvısında NO, TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerini belirgin olarak azalttığı, ancak yüksek dozda etkinin daha da belirgin olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada 40 mg/kg dozda uygulanan klaritromisinin plevral eksuda sıvısına lökosit birikimini de belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (16).

Giamarellos-Bourboulis ve arkadaşlarının çoklu ilaç direnci olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *E coli* ile oluşturdukları sepsis modelinde 80 mg/kg dozda intravenöz uygulanan klaritromisinin, serum MDA ve TNF- $\alpha$  düzeylerini belirgin oranda azalttığı saptanmış ve bu etki klaritromisinin nötrofilik oksidatif yıkımı engellemesine ve monositlerden TNF- $\alpha$  salınımını azaltmasına bağlanmıştır (13,90,91).

Borszcz ve arkadaşlarının klaritromisinin antiinflamatuvar etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada, 100 microg/ml dozda uygulanan klaritromisinin mast hücreleri, eosinofil ve nötrofil gibi inflamatuvar hücrelerden mediatör salınımını azalttığı ve bu hücrelerin yaşamlarını belirgin olarak kısalttığı gösterilmiştir (88). Literatürde ilk olan bu çalışmamız ile NEK modeli oluşturulan ratlarda profilaktik olarak uygulanan klaritromisin tedavisinin barsak bulgularını belirgin olarak düzelttiği histopatolojik olarak gösterildi. H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ratlarda subkutan yolla profilaktik olarak uygulanan klaritromisinin rat yavrularının barsak dokularında MDA düzeylerini düşürdüğü, katalaz aktivitesi ile glutasyon düzeylerini yükselttiği saptanmakla birlikte



farklılığın istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulundu. Ancak, klaritromisin alan grupta NO düzeylerinin belirgin olarak azaldığı, buna karşın glutasyon peroksidaz aktivitelerinin belirgin olarak arttığı saptandı. Bu çalışmamız ile klaritromisinin inflamatuvar bir mediatör olan NO düzeyini belirgin olarak azalttığı, antioksidatif defans sistemlerinden glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini belirgin olarak arttırdığı gösterildi. Antibakteriyel, antiinflamatuvar ve immünmodülatör etkinliği olan klaritromisinin, GSH-Px aktivitesini arttırarak antioksidan özelliklere de sahip olduğu bu çalışma ile gösterilmiş oldu.

H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturulan ratlarda işlemden önce profilaktik olarak subkutan uygulanan klaritromisin antibakteriyel etkinliği için BT değerlendirildiğinde, klaritromisin verilen ratlarda NEK grubuna göre kan, mezenterik lenf nodu, karaciğer, dalak ve gayta kültürlerinde üremenin azaldığı, ancak sadece mezenterik lenf nodu kültürlerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Böylece klaritromisin NEK'te bakteriyel translokasyonu engellediği belirlendi. Klaritromisin inflamatuvar bir mediatör olan NO düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (16). Çalışmamızda da klaritromisin alan NEK grubunda NO düzeyi belirgin olarak düşük bulundu. NO'nun peoksinitrit aracılığıyla sitotoksik ve barsak bariyer bozukluğuna neden olduğu, böylece NEK gelişimine katkıda bulunduğu pek çok çalışmada belirtilmektedir (97,98,107-109). Barsak bariyer bozukluğunun bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştıracağı düşünülürse, klaritromisin BT'yi direkt antibakteriyel etki ile mi, inflamatuvar mediatör olan ve barsak bariyer fonksiyonunda önemli bir role sahip NO düzeyini azaltarak mı etkilediği, yoksa her iki etki sonucu BT'yi mi azalttığı net olarak belirlenebilmesi için geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Bir makrolid grubu antibiyotik olan klaritromisin, *Staphylococcus aureus* dahil, gram pozitif kok ve basillere karşı güçlü etkinlik gösterir. Gram negatif bakterilerden *Neisseria* türlerinin pek çoğu, *Branhamella catarrhalis*, Bordetella, *Brucella* ve *Yersinia* türlerinin bazıları, *Legionella pneumophila* ve *Camphylobacter fetus* bu ilaca duyarlıdır. Gram negatif anaerobik basillerden *Bacteroides*'in orofaringeal türleri genellikle duyarlıdır, fakat *Bacteroides fragilis*

türü genellikle rezistandır. *E coli* dahil *Enterobacteriaceae* türleri de genellikle klaritromisine rezistandırlar (12,113). Çalışmamızda kültürlerde üreyen mikroorganizmalar *E coli* ve *Klebsiella spp.* türü gram negatif bakterilerdi. Bu tür mikroorganizmaların genellikle klaritromisine dirençli olduğu göz önüne alınırsa, klaritromisinin NO'yu baskılayarak BT'yi engellediğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak literatürde ilk olan bu çalışmamız ile karnozinin antiinflamatuvar ve antioksidatif etkinliğiyle, klaritromisinin ise antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleriyle NEK'e karşı belirgin koruyucu olduğu, ancak oral yolla uygulanan ginkgo alkaloidinin (EGb 761) NEK'e karşı koruyucu etkinliğinin bulunmadığı histopatolojik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak gösterildi.

## SONUÇLAR

1. H/R yöntemi ile NEK modeli oluşturularak yapılan çalışmada, gruplardaki ratların vücut ağırlıkları arasında çalışma boyunca bir farklılık saptanmadı.
2. Histopatolojik incelemede kontrol grubu *grade* 1 olarak değerlendirilirken, NEK grubu *grade* 3, EGb 761 grubu *grade* 2.7, karnozin grubu *grade* 2.4 ve klaritromisin grubu *grade* 1.8 olarak değerlendirildi. Karnozin ve klaritromisinin NEK'te koruyucu olduğu saptandı.
3. Biyokimyasal incelemede barsak dokusu MDA düzeyinin NEK grubunda en yüksek, kontrol grubunda en düşük olduğu; karnozin ve özellikle klaritromisinin barsak doku MDA düzeyini azalttığı, ancak EGb 761'in değiştirmedeği görüldü.
4. İnflamatuvar bir meditör olan NO'nun barsak doku düzeyinin NEK'te kontrol, karnozin ve klaritromisin grubuna göre belirgin arttığı, karnozin ve klaritromisinin NO barsak doku düzeyini belirgin olarak azalttığı, EGb 761'in ise NO düzeyini azaltmakla birlikte istatistiksel farklılığın olmadığı saptandı.
5. Antioksidatif defans sistemi açısından gruplar değerlendirildiğinde:
  - a- CAT aktivitesinin NEK grubunda en düşük olduğu, diğer gruplardaki CAT aktivitesinin NEK grubuna göre yüksek saptamakla birlikte istatistiksel farklılığın olmadığı görüldü.
  - b- NEK grubunda GSH-Px aktivitesi kontrol, karnozin ve klaritromisin grubuna göre belirgin olarak düşük, EGb 761 grubuna göre yüksek ancak istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Karnozin ve klaritromisinin GSH-Px'i belirgin olarak arttırdığı, EGb 761'in ise etkisiz olduğu saptandı.
  - c- GSH düzeyi NEK grubunda kontrol ve karnozin grubuna göre belirgin olarak düşüktü. Diğer gruplara göre GSH düşüklüğü istatistiksel olarak anlamsızdı. Karnozinin, GSH düzeyini belirgin olarak arttırdığı, diğer grupların da GSH düzeyini arttırdığı, ancak bu artışın anlamsız olduğu bulundu.
7. Bakteriyel translokasyon bakımından kontrol, NEK ve klaritromisin grupları değerlendirildiğinde BT'nin NEK'te önemli bir risk faktörü olduğu, klaritromisinin mezenterik lenf nodunda BT'yi önlediği saptandı.
8. Bu sonuçlarla klaritromisin ve karnozinin NEK'e karşı koruyucu etkinliğinin olduğu, ancak EGb 761'in oral yolla etkisiz olduğu görüldü.

## ÖZET

Nekrotizan Enterokolit Modeli Oluşturulan Ratlarda Proflaktik Olarak Kullanılan Karnozin, Ginkgo Alkaloidi ve Klaritromisinin Gastrointestinal Sisteme, Oksidatif Strese ve Klaritromisinin Bakteriyel Translokasyona Etkileri

Dr. Özmert M.A. Özdemir

Nekrotizan enterokolit (NEK), özellikle prematüre yenidoğanları etkileyen önemli bir gastrointestinal sorun ve prematürelerin önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Bu çalışmada sıçan yavrularında hipoksi–reoksijenizasyon (H/R) modeli uygulanarak oluşturulan intestinal hasarda, H/R'den önce proflaktik uygulanan karnozin, ginkgo alkaloidi (EGb 761) ve klaritromisinin koruyucu etkileri araştırıldı.

Bir günlük 35 adet *Wistar* albino türü sıçanlar randomize olarak kontrol, NEK, karnozin+NEK, EGb 761+NEK ve klaritromisin+NEK olmak üzere beş gruba ayrıldı. Karnozin+NEK, EGb 761+NEK ve klaritromisin+NEK gruplarına günlük olarak sırasıyla karnozin (250 mg/kg, ip), EGb 761 (100 mg/kg, po) ve klaritromisin (40 mg/kg, sc) üç gün süreyle verildi. Dördüncü günde, kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlar hava geçirmez kapalı bir ortamda, önce 5 dk süreyle %100 CO<sub>2</sub>, hemen ardından 5 dk %100 oksijen solutularak, H/R yöntemiyle NEK modeli oluşturuldu. H/R'den en az 4 saat sonra tüm sıçanlar dekapite edildi. Histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için barsak doku örnekleri alındı. Barsak doku örneklerinden biyokimyasal olarak malonildialdehid (MDA), nitrik oksit (NO), *catalase* (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ölçüldü. Bakteriyel translokasyonu değerlendirmek için kontrol, NEK ve klaritromisin+NEK gruplarından steril olarak kan, mezenterik lenf nodu, karaciğer, dalak ve gayta kültürleri alındı.

Çalışma sonunda, histopatolojik olarak en ağır hasarlanmanın NEK grubunda olduğu, karnozin ve klaritromisinin NEK'e karşı histopatolojik olarak belirgin koruyucu olduğu, ancak EGb 761'in etkisiz olduğu saptandı. Barsak dokusunda MDA ve NO düzeylerinin NEK'te belirgin arttığı, buna karşın GSH ve

GSH-Px aktivitesinin belirgin azaldığı görüldü. Karnozin ve klaritromisinin MDA ve NO düzeylerini belirgin azalttığı, GSH-Px aktivitesini belirgin arttırdığı, ayrıca karnozinin GSH düzeyini de arttırdığı saptandı. EGb 761 biyokimyasal olarak etkisizdi.

Bakteriyel translokasyon bakımından gruplar değerlendirildiğinde; NEK grubunda kan, mezenterik lenf nodu ve gayta kültürlerindeki üremelerin anlamlı olduğu, klaritromisinin mezenterik lenf nodunda bakteriyel translokasyonu önlediği saptandı.

H/R ve bakteriyel translokasyonun NEK gelişiminde önemli risk faktörleri olduğu, klaritromisin ve karnozinin NEK'e karşı belirgin koruyucu etkilere sahip oldukları, ancak EGb 761'in oral yolla etkisiz olduğu sonucuna varıldı.

## YABANCI DİL ÖZETİ

Protective Effects of Carnosine, Ginkgo Biloba Extract and Clarithromycin on Gastrointestinal System and Oxidative Stress and Effect of Clarithromycin on Bacterial Translocation in Rats with Hypoxia/Reoxygenation-Induced Intestinal Injury

Dr. Özmert M.A. Özdemir

Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common gastrointestinal disorder and cause of morbidity and mortality in premature newborns. In this study, the protective effects of carnosine, ginkgo biloba extract (EGb 761) and clarithromycin were investigated in rats with hypoxia/reoxygenation (H/R) induced intestinal injury.

One day old, 35 wistar-albino rat pups were randomly divided into five groups as control, H/R (NEC), carnosine+NEC, EGb 761+NEC and clarithromycin+NEC. Carnosine (250 mg/kg/d, intraperitoneally), EGb 761 (100 mg/kg/d, orally) and clarithromycin (40 mg/kg/d, subcutaneously) were administered for three days. On day four, all rats except for control group were placed into a chamber of 100% CO<sub>2</sub> for five min, then they were reoxygenized with 100% O<sub>2</sub> for the next five min. All rats were killed at least four hour after the H/R. Intestine tissue samples (ITSs) were extracted for histopathological connective tissue score (CTS) and biochemical examination. The levels of malonyldialdehyde (MDA), nitric-oxide (NO), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GSH-Px) and glutathione (GSH) were measured on ITSs. Cultures of blood, mesenteric lymph nodes (MLNs), liver, spleen and cecal contents were taken from the groups of the control, NEC and clarithromycin+NEC for evaluation of bacterial translocation (BT).

At the end of the study, the NEC group had the worst CTS. Carnosine and clarithromycin had histopathologically significant protective effect on intestinal injury ( $p<0.05$ ), while EGb 761 had no effect ( $p>0.05$ ). The levels of MDA and NO of ITSs were significantly increased, whereas GSH and GSH-Px activities of

them were significantly decreased in the NEC group. While carnosine and clarithromycin significantly decreased the levels of MDA and NO, they increased the activity of GSH-Px ( $p<0.05$ ). In addition, carnosine also increased the level of GSH ( $p<0.05$ ). EGb 761 was biochemically unaffactive.

Significantly increase in BT of MLNs, cecal contents and blood was determined in the NEC group when compared with control group. It was determined that clarithromycin significantly reduced the BT of MLNs in the NEC ( $p<0.05$ ).

In conclusion, H/R and BT are the most important risk factors for NEC. Clarithromycin and carnosine have protective effect on intestinal injury in NEC however EGb 761 given orally has no protective effect.

## 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. Okur H, Küçükaydın M, Köse K, Kondaş O, Doğan P, Kazez A. Hipoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1416-1419.
3. Travadı 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.
4. Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants; a review. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2293-2315.
5. Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DTM, Worthington VC, Abbot NJ. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neuroscience Letters* 1997; 238: 135-138.
6. Kleijnen J, Knipschild P. Ginkgo biloba. *Lancet* 1992; 340: 1136-1139.
7. Luo Y. Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and ginkgo biloba leaf extract. *Life Sci* 2006; 78:2 066-2072.
8. Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Drieu K, Fiskum G. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia. *Brain Res* 2001; 922: 282-292.
9. Onen A, Deveci E, Inalöz SS, Işık B, Kiliç M. Histopathological assessment of the prophylactic effect of ginkgo biloba extract on intestinal ischemia reperfusion injury. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62: 386-389.
10. Spinnewyn B, Blavet N, Clostre F, Bazen N, Braquet P. Involvement of platelet-activating factor (PAF) in cerebral post-ischemic phase in Mongolian gerbils. *Prostaglandins* 1987; 34: 337-349.
11. 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.



12. Chambers HF. Chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, clindamycin, and streptogramins. In: Katzung BG, editor. *Basic and Clinical Pharmacology*. New York: McGraw-Hill, 2001: 774-783.
13. Giamarellos-Bourboulis EJ, Baziaka F, Antonopoulou A, Raftogiannis M, Koutoukas P, Tsaganos T, et al. Clarithromycin is an effective immunomodulator when administered late in experimental pyelonephritis by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infectious Diseases* 2006; 51: 937-944.
14. 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.
15. Scaglione F, Rossoni G. Comparative anti-inflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. *J Antimicrob Chem* 1998; 41: 47-50.
16. 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.
17. Piazza AJ, Stoll BJ. Digestive system disorders. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007: 753-766.
18. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: Treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986; 33: 179-201.
19. Neu J. Necrotizing enterocolitis. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 409-432.
20. Stoll BJ, Kliegman RM: Necrotizing enterocolitis. *Clinics in Perinatology* 1994; 21: 205-457.
21. Kliegman RM, Fanaroff AA: Necrotizing enterocolitis. *N Eng J Med* 1984; 310: 1093-1112.
22. 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.
23. Dimmitt RA, Meier AH, Skarsgard ED, Halamek LP, Smith BM, Moss RL. Salvage laparotomy for failure of peritoneal drainage in necrotizing enterocolitis in infants with extremely low birth weight. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 856-859.

24. Piazza AJ, Stoll BJ. Digestive system disorders. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007: 753-766.
25. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1990; 336: 1519.
26. Ryder RW, Shelton JD, Guinan ME. Necrotizing enterocolitis: a prospective multicenter investigation. *Am J Epidemiol* 1980; 112: 113-123.
27. Uauy RD, Fanaroff AA, Korones SB, Phillips EA, Phillips JB, Wright LL. Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: biodemographic and clinical correlates. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1991; 119: 630-638.
28. Wiswell TE, Robertson CF, Jones TA, Tuttle DJ. Necrotizing enterocolitis in full-term infants. A case-control study. *Am J Dis Child* 1988; 142: 532-535.
29. Yurdakök M. What next in necrotizing enterocolitis? *Turk J Pediatr* 2008; 50: 1-11.
30. Hsueh W, Caplan MS, Tan X, MacKendrick W, Crussi FG. Necrotizing enterocolitis of the newborn: Pathogenic concepts in perspective. *Pediatric and Developmental Pathology* 1998; 1: 2-16.
31. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jügens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-390.
32. Crissinger KD, Granger DN. Mucosal injury induced by ischemia and reperfusion in the piglet intestine: Influences of age and feeding. *Gastroenterology* 1989; 97: 920-926.
33. Crissinger KD, Grisham MB, Granger DN. Developmental biology of oxidant-producing enzymes and antioxidants in the piglet intestine. *Pediatr Res* 1989; 25: 612-616.
34. Miller MJS, McNeill H, Mullane KM. SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in rabbit model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol* 1988; 255: G556-G565.
35. Cueva JP, Hsueh W. Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 1988; 29: 1207-1212.

36. Eibl MM, Wolf HM, Furnkranz H. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth weight infants by IgA-IgG feeding. *N Eng J Med* 1988; 319: 1-8.
37. Karna P, Senagore A, Chou CC. Comparison of the effect of asphyxia, hypoxia and acidosis on the intestinal blood flow and oxygen uptake in newborn piglets. *Pediatr Res* 1986; 20: 929-932.
38. Crissinger KD. Animal models of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 17-22.
39. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386.
40. Akisü M, Girgin FK, Baka M, Hüseyinov A, Kültürsay N. Role of recombinant erythropoetin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2001; 11: 167-172.
41. Kabaroğlu C, Akisu M, Habif S, Mutaf I, Turgan N, Parıldar Z, et al. Effects of L-arginine and L-carnitine in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Pediatrics International* 2005; 47: 10-14.
42. Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14: 145-151.
43. 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.
44. Caplan MS, MacKendrick W. Inflammatory mediators and intestinal injury. *Clin Perinatol* 1994; 21: 235-246.
45. Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 275-282.
46. 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.
47. Sun XM, Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1988; 81: 1328-1333.

48. Valone FH, Ruis NM. Stimulation of tumor necrosis factor release by cytotoxic analogues of platelet-activating factor. *Immunology* 1992; 76: 24-28.
49. Caplan MS, Kelly A, Hsueh W. Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: the role of platelet activating factor. *Pediatr Res* 1992; 31: 428-432.
50. Souza DG, Pinho V, Soares AC, Shimizu T, Ishii S, Teixeira MM. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 733-740.
51. Caplan MS, Hsueh W, Kelly A, Donovan M. Serum PAF acetylhydrolase during neonatal maturation. *Prostaglandins* 1990; 39: 705-713.
52. Musemeche C, Caplan MS, Hsueh W, Sun X, Kelly A. Experimental necrotizing enterocolitis: the role of polymorphonuclear neutrophils. *J Pediatr Surg* 1991; 26: 1047-1049.
53. Şener G, Şatıroğlu H, Şehirli AÖ, Kaçmaz A. Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in rat model of thermal injury. *Life Sciences* 2003; 73: 81-91.
54. Şener G, Akgün Ü, Şatıroğlu H, Topaloğlu Ü, Uysal MK. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2001; 15: 19-22.
55. Biçakçı Ü, Tander B, Aritürk E, Aydın BK, Aydın O, Rizalar R, et al. Effects of omeprazole and gentamicin on the biochemical and histopathological alterations of the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 800-805.
56. Öztürk H, Dokucu AI, Ögün C, Büyükbayram H. Protective effects of human interleukin-10 on intestines of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rats. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 1330-1333.
57. Kazez A, Küçükaydın N, Küçükaydın M, Konaş O, Okur H, Doğan P. A model of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis: the role of distension. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1466-1469.
58. 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.

- 59.** MacKendrick W, Hill N, Hsueh W, Caplan M. Increase in plasma platelet-activating factor levels in enterally fed preterm infants. *Biol Neonate* 1993; 64: 89-95.
- 60.** Amer MD, Hedlund E, Rochester J, Caplan MS. Platelet-activating factor concentration in the stool of human newborn: effect of enteral feeding and neonatal necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate* 2004; 85: 159-166.
- 61.** Gibbs K, Lin J, Holzman IR. Necrotizing enterocolitis: the state of the science. *Indian J Pediatr* 2007; 74: 67-72.
- 62.** Hartman GE, Boyajian MJ, Choi SS, Eichelberger MR, Newman KD, Powell DM. Surgical care of conditions presenting in the newborn. In: MacDonald MG, Mullet MD, Seshia MMK, editors. *Avery's Neonatology Pathophysiology and Management of the Newborn*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005: 1097-1134.
- 63.** Harris MC, Costarino AT, Sullivan S: Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1994; 124: 105-111.
- 64.** 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.
- 65.** Akısü M, Baka M, Yalaz M, Hüseyinov A, Kültürsay N. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Eur J Pediatr Surg* 2003; 13: 319-323.
- 66.** Lin J. Too much short chain fatty acids cause neonatal necrotizing enterocolitis. *Medical Hypotheses* 2004; 62: 291-293.
- 67.** Lin J, Nafday S, Chauvin S, Mgid MS, Pabbatireddy S, Holzman IR, et al. Variable effects of short chain fatty acids and lactic acid in inducing intestinal mucosal injury in newborn rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35: 545-550.
- 68.** Nafday SM, Chen W, Peng L, Babyatsky MW, Holzman IR, Lin J. Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatr Res* 2005; 57: 201-204.
- 69.** Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12: 2203-2315.
- 70.** Gariballa SE, Sinclair AJ. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age and Ageing* 2000; 29: 207-210.

- 71.** Adlini G, Facioni RM, Beretta G, Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *BioFactors* 2005; 24: 77-87.
- 72.** Gulewitsch W, Amiradzibi S. Ueber das carnosin, eine neue organische base des fleischextractes. *Ber Dtsch Chem Ges* 1900; 33: 1902-1903.
- 73.** Roberts PR, Zaloga GP. Cardiovascular effects of carnosine. *Biochemistry (Moscow)* 2000; 65: 856-861.
- 74.** Ririe DG, Roberts PR, Shouse MY, Zaloga GP. Vazodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition* 2000; 16: 168-172.
- 75.** Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, Yoneta T, Yasuda M, Ueda S, et al. Effect of zinc carnosine chelate compound (Z-103), a novel antioxydant, on acute gastric mucosal injury induced by ischemic-reperfusion in rats. *Free Radic Res Commun* 1991; 14: 289-296.
- 76.** Arakawa T, Satoh H, Nakamura A, Nebiki H, Fukuda T, Sakuma H, et al. Effects of zinc L-carnosine on gastric mucosal and cell damage vaused by ethanol in rats. Correlation with endogenous prostoglandin E2. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 559-566.
- 77.** Horning MS, Blakemore LJ, Trombley PQ. Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. *Brain Research* 2000; 852: 56-61.
- 78.** Babizhayev MA, Seguin MC, Gueyne J, Evstigneeva RP, Ageyeva EA, Zheltukhina GA. L-carnosine ( $\beta$ -alanyl-l-histidine) and carcinine ( $\beta$ -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem J* 1994; 304: 509-516.
- 79.** Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 403-409.
- 80.** Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK, et al. Preventive effect of ginkgo biloba extract (GBB) on the lippopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 985-990.

- 81.** Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, et al. Effects of ginkgo biloba extract feeding on salt-induced hypertensive Dahl rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 266-269.
- 82.** Pehlivan M, Dalbeler Y, Hazinedaroğlu S, Arikan Y, Erkek AB, Günal O, et al. An assessment of the effect of ginkgo biloba EGb 761 on ischemia reperfusion injury of intestine. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 201-204.
- 83.** Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginkgo biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 121-127.
- 84.** Pincemail J, Dupuis M, Nasr C, Hans P, Haag-Berrurier M, Anton R, et al. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of ginkgo biloba extract. *Experientia* 1989; 45: 708-712.
- 85.** Oyama Y, Chikahisa L, Ueha T, Kanemaru K, Noda K. Ginkgo biloba extract protects brain neuron against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Research* 1996; 712: 349-352.
- 86.** 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.
- 87.** Shinka M, Rubin BK. Macrolides and airway inflammation in children. *Paediatr Respir Rev* 2005; 6: 227-235.
- 88.** Borszcz PD, Befus D, Moqbel R, Sin DD, Adamko DJ, Man SF, et al. Effects of clarithromycin on inflammatory cell mediator release and survival. *Chemotherapy* 2005; 51: 206-210.
- 89.** 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.
- 90.** 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.
- 91.** 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.

**92.** Özkan KU, Özokutan BH, İnanç F, Boran Ç, Kiliç M. Does maternal nicotine exposure during gestation increase the injury severity of small intestine in the newborn rats subjected to experimental necrotizing enterocolitis. *J Ped Surg* 2005; 40: 484-488.

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

**94.** Beutler E, Durgun O, Kely BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 51: 882-88.

**95.** 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.

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

**97.** Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424.

**98.** 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.

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

**100.** Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-411.

**101.** Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990; 212: 496-510.

**102.** Herek Ö, Kara İG, Kaleli İ. Effects of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in burn injury. *Surg Today* 2004; 34: 256-260.

**103.** 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.



- 104.** Yossuck P, Kraszpuski M, Salm AK. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volume during brain development in the rat model. *Early Hum Dev* 2006; 82: 267-272.
- 105.** Canpolat FE, Yurdakök M, Özsoy Ş, Hazıroğlu R, Korkmaz A. Protective effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 719-723.
- 106.** Kabaroglu C, Akisu M, Habıf S, Mutaf I, Turgan N, Parıldar Z, et al. Effects of L-arginine and L-carnitine in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Pediatrics International* 2005; 47: 10-14.
- 107.** 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: G861-G869.
- 108.** Upperman JS, Potoka D, Grishin A, Hackam D, Zamora R, Ford HR. Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14: 159-166.
- 109.** 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. *Regulatory Peptides* 2003; 116: 53-60
- 110.** Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Matejovicova M, Tkac I, Boldyrev AA. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell Mol Neurobiol* 1999; 19: 45-56.
- 111.** Louajri A, Harraga S, Godot V, Toubin G, Kantelip JP, Magnin P. The effect of ginkgo biloba extract on free radical production in hypoxic rats. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 710-712.
- 112.** Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides-an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 55: 10-21.
- 113.** Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi farmakoloji. Ankara: Feryal Matbaacılık, 1991: 694-708.

## EKLER

**Tablo-7:** Çalışmaya alınan gruptaki rat yavrularının birinci gün vücut ağırlıkları (gram)

<b>Rat No</b>	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
1	5.4	5.3	5.4	6.3	6.6
2	6.0	5.5	5.3	6.0	5.2
3	6.0	5.1	5.8	6.2	4.9
4	5.5	5.5	6.0	6.2	6.0
5	5.8	6.2	5.6	5.8	5.6
6	6.2	5.8	5.7	5.4	6.5
7	6.1	4.8	5.7	5.3	6.6

**Tablo-8:** Çalışmaya alınan gruptaki rat yavrularının ikinci gün vücut ağırlıkları (gram)

<b>Rat No</b>	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
1	6.1	6.1	6.1	7.1	7.4
2	6.6	6.5	5.0	7.0	6.2
3	7.0	6.3	5.8	7.0	5.6
4	6.2	6.2	6.5	7.2	6.6
5	6.7	6.6	5.6	6.4	6.1
6	6.6	6.3	5.6	6.2	7.4
7	7.2	5.6	6.8	6.2	7.1

**Tablo-9:** Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının üçüncü gün vücut ağırlıkları (gram)

<b>Rat No</b>	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
<b>1</b>	6.9	7.2	6.9	8.2	8.0
<b>2</b>	7.3	7.3	6.2	7.6	6.8
<b>3</b>	8.1	7.2	6.7	8.4	7.3
<b>4</b>	7.1	6.7	7.6	8.1	7.6
<b>5</b>	7.5	7.6	6.8	7.1	6.9
<b>6</b>	7.8	7.3	6.7	6.9	7.8
<b>7</b>	8.1	6.4	7.8	6.8	7.6

**Tablo-10:** Çalışmaya alınan gruplardaki rat yavrularının intestinal sistem histopatolojik değerlendirme (*grade*) skorları.

<b>Rat No</b>	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
<b>1</b>	1	3	3	1	3
<b>2</b>	1	3	3	3	3
<b>3</b>	1	3	2	3	1
<b>4</b>	1	3	2	3	2
<b>5</b>	1	3	2	3	1
<b>6</b>	1	3	3	3	1
<b>7</b>	1	3	2	3	2

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

**Tablo-11:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki ( $\mu\text{mol}/\text{gram}$  yaş doku) malonildialdehid (MDA) düzeyleri

Rat No	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
	MDA ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	MDA ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	MDA ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	MDA ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	MDA ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )
1	0.371	0.329	0.360	0.333	0.365
2	0.248	0.339	0.959	0.430	0.242
3	0.118	0.725	0.282	0.322	0.265
4	0.207	0.634	0.253	0.304	0.235
5	0.215	0.423	0.202	0.242	0.249
6	0.631	0.245	0.247	0.419	0.242
7	0.236	0.319	0.319	0.339	0.282

**Tablo-12:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki ( $\mu\text{mol}/\text{gram}$  yaş doku) nitrik oksid (NO) düzeyleri

Rat No	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
	NO ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	NO ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	NO ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	NO ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	NO ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )
1	0.2507	0.4381	0.0592	0.5673	0.2827
2	0.3395	0.6173	0.1030	0.3683	0.3471
3	1.1792	0.6565	0.1963	0.5761	0.2082
4	0.4817	0.5334	0.1838	0.3328	0.1327
5	0.3498	0.5919	0.2608	0.3100	0.0088
6	0.2568	0.4175	0.5883	0.3340	0.0843
7	0.3434	0.5580	0.1254	0.7507	0.6007

**Tablo-13:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (U/gram yaş doku) katalaz (CAT) aktivite düzeyleri

<b>Rat No</b>	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
	<b>CAT</b>	<b>CAT</b>	<b>CAT</b>	<b>CAT</b>	<b>CAT</b>
	<b>(U/g)</b>	<b>(U/g)</b>	<b>(U/g)</b>	<b>(U/g)</b>	<b>(U/g)</b>
<b>1</b>	80.78	80.78	379.63	78.31	80.78
<b>2</b>	218.39	106.28	137.68	141.83	157.42
<b>3</b>	114.73	79.11	100.92	211.71	120.74
<b>4</b>	156.13	69.15	171.46	71.27	172.11
<b>5</b>	150.51	174.05	80.78	106.18	160.71
<b>6</b>	175.60	123.23	72.90	129.32	261.67
<b>7</b>	143.07	65.42	156.36	327.13	231.94

**Tablo-14:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (mU/gram yaş doku) glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite düzeyleri

<b>Rat No</b>	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
	<b>GSH-Px</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>GSH-Px</b>
	<b>(mU/g)</b>	<b>(mU/g)</b>	<b>(mU/g)</b>	<b>(mU/g)</b>	<b>(mU/g)</b>
<b>1</b>	1867.90	1893.56	903.16	1334.22	2283.56
<b>2</b>	1347.05	1489.45	2963.50	1282.90	3510.01
<b>3</b>	2678.70	749.21	1693.43	1662.64	1642.11
<b>4</b>	2137.31	969.87	2245.08	1477.90	2719.75
<b>5</b>	2165.54	1375.27	1924.35	877.50	4310.54
<b>6</b>	2193.76	1885.86	2401.59	738.95	3107.18
<b>7</b>	2732.58	1385.53	3212.72	1231.58	2709.48

**Tablo-15:** Çalışma gruplarındaki rat yavrularının barsaklarındaki (mg/gram yaş doku) glutatyon (GSH) düzeyleri

<b>Rat No</b>	<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
	<b>GSH (mg/g)</b>	<b>GSH (mg/g)</b>	<b>GSH (mg/g)</b>	<b>GSH (mg/g)</b>	<b>GSH (mg/g)</b>
<b>1</b>	3.219	3.418	3.137	2.856	4.179
<b>2</b>	4.179	3.137	6.439	2.702	7.058
<b>3</b>	7.605	2.786	3.570	3.207	2.435
<b>4</b>	2.575	2.856	3.921	3.277	4.875
<b>5</b>	6.439	2.926	3.746	2.786	2.856
<b>6</b>	4.507	2.575	5.653	5.367	3.658
<b>7</b>	3.758	2.856	4.460	3.347	7.256

**Tablo-16:** Grup I, II ve V'in kan, mezenterik lenf nodu (MLN), karaciğer (KC), dalak ve barsak içeriği (gayta) kültürlerinde saptanan mikroorganizma üremeleri

Rat No	GRUP I (Kontrol)					GRUP II (NEK)					GRUP V (Klaritromisin + NEK)				
	Kan	MLN	KC	Dalak	Gayta	Kan	MLN	KC	Dalak	Gayta	Kan	MLN	KC	Dalak	Gayta
1	0	0	0	0	4*	0	4*	0	0	5*	5*	0	0	0	4*
2	0	0	0	0	4*	5†	4*	3†	4†	5*	0	0	0	0	5*
3	0	0	0	0	4*	5†	4*	0	0	5*	0	0	0	0	4*
4	0	0	0	0	0	5*	4*	0	0	5*	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	5*	4*	0	0	4*	5†	5*	0	0	4‡
6	0	0	0	0	4*	0	4*	0	0	4*	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Kısaltmalar:** 0 = Kültürde üreme yok, 1 = 100 CFU/ml, 2 = 1000 CFU/ml,

3 = 10000 CFU/ml, 4 = 100 000 CFU/ml ve 5 = > 10<sup>4</sup> CFU/ml üremeleri belirtmektedir.

\*: *Escherichia Coli*, †: *Klebsiella spp.*, ‡: *Klebsiella spp.* + *E. Coli* üremelerini belirtmektedir.