

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

**DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT HÜCRE KÜLTÜRÜ
MODELİNDE RESVERATROLÜN İNTESTİNAL MUKOZAL HÜCRE
ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİ VE MEKANİZMALARININ
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sibel TİRYAKİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Orkan ERGÜN

İzmir 2013

Bu tez,

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2012-TIP-053 nolu proje olarak kabul edilerek desteklenmiş, proje Prof. Dr. Orkan Ergün yöneticiliğinde Dr. Sibel Tiryaki ve Doç.Dr. Ayşe Erol tarafından yürütülmüştür.

Teşekkür

Değerleri fikirleriyle çalışmanın ortaya çıkmasını sağlamanın yanı sıra desteğini her zaman hissettiğim, koruyan, kollayan, ilgilenen, pek çok konuda bilgi sahibi olmamda çok büyük emeği olan sayın tez danışmanım Orkan Ergün'e,

Deneylerin tüm aşamalarının planlanmasında ve yapılmasında büyük emeği olan, benimle birlikte aylarca uzun saatler çalışan, çalışmaya en az benim kadar özen gösteren sayın Ayşe Erol'a,

Araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladığım günden itibaren deneyimlerini ve birikimlerini benimle paylaşarak hem çocuk cerrahisi alanında hem de akademik olarak kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan sayın hocalarıma,

Her sıkıştığım da kapısını çaldığım, her konuda desteğini, değerli fikirlerini asla esirgemediği için sayın Ali Avanoğlu'na,

Tez çalışması boyunca meydana gelen akıl almaz sorunların üstesinden gelmemi sağlayan, her tür teknik ve manevi desteği sağlayan başta Melek Oğuz tüm Ege Çocuk Cerrahisi ailesine,

Yaşamımızın bu en zorlu beş yılını paylaştığımız, tez çalışması boyunca koşuşturmalarım da yükümü hafifletmek için ellerinden geleni yapan sevgili asistan arkadaşlarıma,

Hindistan'dan filtre bulup getiren Can Polatdemir'e

Sonsuz sevgileri için muhteşem aileme,

İnanılmaz anlayışı ve sevgisi için İhsan Birol'a,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Nekrotizan enterokolit hakkında genel bilgiler	3
2.1.1. Nekrotizan enterokolit ile indüklenebilir nitrik oksit sentetaz ilişkisi	5
2.1.2. Nekrotizan enterokolit ile siklooksijenaz-2 ilişkisi.....	7
2.1.3. Nekrotizan enterokolit ile antiinflamatuvar ajanlar	8
2.1.4. Nekrotizan enterokolitte bozulmuş restitüsyon	8
2.1.5. Restitüsyon ile fokal adhezyon kinaz ve fosforile fokal adhezyon kinaz ilişkisi	10
2.2. Resveratrol hakkında genel bilgiler	12
3. Gereç-Yöntem	14
3.1. IEC-6 hücre kültürü.....	14
3.2. Lipopolisakkarit ve sitokinler ile deneysel nekrotizan enterokolit modeli oluşturulması ...	16
3.3. Deneysel migrasyon modeli ve bu modelde resveratrolün etkisinin gösterilmesi.....	16
3.4. Nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz, fokal adhezyon kinaz düzeylerinin tayini.....	19
3.4.1. Hücre Kültüründen Protein Homojenizasyonu.....	20
3.4.2. Protein miktarı ölçümü (Lowry analizi).....	22
3.4.3. Western Blot	23
3.5. Verilerin Analizi	28
4. Bulgular	28
4.1. Migrasyon deneylerinin sonuçları.....	28
4.2. Protein Miktarları	35
4.3. Western Blot Analiz Sonuçları.....	41
5. Tartışma	46
6. Sonuç	55
7. Özet	56
8. İngilizce özet	58
9. Kaynaklar	60

1. Giriş ve Amaç

Nekrotizan enterokolit (NEK), özellikle prematür yenidoğanları etkileyen, ciddi morbidite ve mortaliteye sebep olan, bağırsakların kısmi veya tam iskemisi ile karakterize bir gastrointestinal hastalıktır. Neonatal bakım merkezlerinin gelişmesiyle birlikte daha düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlar yaşatılabilmekte, bu da nekrotizan enterokolitle ilgili daha iyi yönetim stratejilerine sahip olmamızı zorunlu kılmaktadır. Yapılan sayısız çalışma hastalığın etyopatogenezi, klinik özellikleri ve tedavisi ile ilgili bilgilerimizi artırmakla birlikte halen yenidoğanın tam anlaşılammış ve yönetimi güç hastalıklarından birisi olarak tanımlanmaya devam etmektedir [1].

Yapılan çalışmalar hastalık patogenezinin temelinde intestinal bariyer immatüritesi yer aldığını, enteral beslenme, mezenter iskemisi ve bakteriyel enfeksiyon gibi faktörlerin de katkıda bulunduğunu göstermiştir [2]. Hastalık ortaya çıktıktan sonra ciddi mortalite ile seyrettiğinden ve sekel olasılığı yüksek olduğundan yapılan çalışmaların önemli bir kısmı hastalıktan koruyucu faktörler üzerine yoğunlaşmıştır. Hastalıktan koruyucu özelliği kesin olarak bilinen tek faktör anne sütü ile beslenmedir [3]. Anne sütünün içerdiği ve/veya antiinflamatuvar özelliği bilinen birçok faktör ile ilgili çok sayıda deneysel çalışma vardır ancak etkisi net gösterilerek kullanıma girmiş bir madde yoktur [1,2,4,5,6].

Bu çalışmada daha önce kliniğimizde yürütölen bir havyan deneyi çalışması ile enteral suplementasyonunun deneysel NEK modelinde olumlu etkileri gösterilmiş olan resveratrolün etki mekanizmalarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda şu alt amaçlar hedeflenmiştir:

1. NEK'te intestinal mukoza hücrelerinde arttığı bilinen ve hastalığın patofizyolojisinde anahtar rol oynayan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX2) ekspresyonlarında artışın resveratrol ile hangi şekilde modüle ve modifiye edildiğini göstermek

2. NEK sonucu meydana gelen hücre hasarını onarmak için gerekli olan hücre migrasyonu üzerine etkisini ortaya koymak
3. Migrasyon üzerine olumlu etkisi gösterilebilir ise fokal adhezyon kinaz (FAK) ve fosforile fokal adhezyon kinaz (pFAK) ekspresyonları üzerine etkisini göstererek olası mekanizmalarından birini açıklamak

2. Genel Bilgiler

2.1. Nekrotizan enterokolit hakkında genel bilgiler

Nekrotizan enterokolit, prematüre yenidoğanların ince ve kalın bağırsaklarını etkileyen ve yüksek mortaliteye sahip bir hastalıktır. Genellikle 1500 gramın altında ve 32 haftadan erken doğan yenidoğanları etkiler. Hastalık patogenezinin bir miktar anlaşılabilmesi ve izlemiyle ilgili bilgilerimizin artmasıyla birlikte mortalite 1990'ların başında düşmüş, ancak sürfaktan tedavisi, mekanik ventilasyon gibi ileri neonatal yoğun bakım teknolojileri ve olanakları sonucunda çok düşük doğum ağırlıklı yenidoğanların yaşam oranlarında sağlanan artışa paralel olarak hem prevalansında, hem mortalite oranlarında yeniden yükselme yaşanmıştır. Mortalite iyi merkezlerde dahi %30'lara kadar çıkmaktadır [1]. Ayrıca hayatta kalsalar dahi NEK'li yenidoğanların önemli bir kısmı ciddi sekelle iyileşmekte, intestinal obstruksiyon, kısa barsak sendromu, uzun süreli parenteral nutrisyona bağlı kolestaz, intestinal yetmezliğe bağlı büyüme-gelişme geriliği, kronik nutrisyonel bozukluklar gibi uzun süreli hastanede yatış da gerektirebilen sorunlar yaşamaktadır [6]. Tüm bu nedenlerle NEK'te rol oynayan patofizyolojik olayların tam olarak anlaşılması ve hastalığı önleyici stratejilerin geliştirilmesi yaşam oranlarının ve yaşam kalitelerinin artırılabilmesi açısından çok büyük önem taşımaktadır.

NEK gelişimine etki eden çok sayıda risk faktörü belirlenmiştir. Bunların arasında etkisi en net ortaya konulmuş olanları prematürite ve enteral beslenmedir. Bununla birlikte enteral beslemeye başlama zamanı ve içeriği, intestinal iskemiye neden olan koşullar (umbilikal arter kanülasyonu, asfiktik doğum, hipoksi, siyanotik konjenital kalp hastalığı gibi) ve bakteriyel kolonizasyon gibi birçok faktörün ilişkileri gösterilmiştir [5].

NEK için risk faktörlerini tanımlayan birçok çalışma vardır fakat bu çalışmaların eksik yönü çoğunun küçük hasta gruplarında yapılması ve çeşitli faktörlerin aditif özellikleri göz önüne alınmadan birbirlerinden ayrı olarak risk belirleme yapılmış olmasıdır. Guthrie ve ark.

tarafından 98 yenidoğan yoğun bakım ünitesinin 15072 hastaya ait kayıtları incelenerek yapılan bir çalışmada tek değişkenli analiz yapıldığında, doğum ağırlığı, doğum haftası, antenatal glikokortikoid maruziyeti, postnatal glikokortikoid kullanmış olması, yaşamın ilk gününde mekanik ventilasyon, umbilikal arter veya ven kanülü uygulanmış olması, eritropoietin veya sürfaktan kullanmış olması, ilk 10 gün kafein kullanmış olması ve ilk 3 gün indometazin kullanmış olması NEK gelişimi ile ilişkili bulunurken ilk 3 günden sonra indometazin kullanmış olması, cinsiyet, doğum tipi, APGAR skorları ile ilişki saptanmamıştır. Bununla birlikte çok değişkenli analiz yapıldığında ise en önemli değişkenin doğum ağırlığı olduğu, bunun dışındaki değişkenlerden yalnız yaşamın ilk gününde mekanik ventilatör uygulanmış olması, antenatal glikokortikoid maruziyeti ve yaşamın ilk haftasında glikokortikoid ve indometazin kullanmış olmak ile anlamlı ilişki saptanmıştır [7]. NEK risk faktörlerini değerlendirmek açısından çok geniş bir grupta oldukça kapsamlı bir çalışma olmasının yanında bu çalışmanın sonuçlarının diğer bir ilginç tarafı daha önce NEK açısından koruyucu olabileceği bildirilmiş [8, 9] olan glikokortikoid kullanımının NEK gelişimi için bir risk faktörü olarak saptanmış olmasıdır; ancak, bu sonuç olasılıkla glikokortikoid kullanımının daha ağır prematüritenin sonucu olmasıyla ilişkilidir.

Bildirilen çok sayıda risk faktörü ve yapılmış çok sayıda çalışmaya rağmen, bu etiyolojik faktörlerin karmaşık etkileşim mekanizmaları henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Tanımlanan risk faktörlerinin de ışığında hastalık patogenezinin temelinde intestinal bariyer immatüritesinin yer aldığı, enteral beslenme, mezenter iskemisi ve bakteriyel enfeksiyon gibi faktörlerin buna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. İntestinal bariyer immatüritesine ek olarak yenidoğan bağırsağı olasılıkla mukus sekresyonunda yetersizlik ve immatür müsin bileşimine sebep olan mukozal immatürite, epitel tamir kapasitesinde yetersizlik, düşük doku antioksidan aktivitesi, doku oksijenizasyonunu koruma kabiliyetinde yetersizlik, inflamatuvar mediatörlere duyarlılıkta artma, disfonksiyonel immün cevap, sekretuar immünglobulin A eksikliği, anormal motilite, gastrik hipoasidite gibi özelliklere sahiptir ve bu özellikler prematürelde daha belirgindir. Ayrıca respiratuvar distres sendromu ya da konjenital kalp

hastalığı gibi intestinal iskemiye sebep olabilecek durumlar da mukozal hasara sebep olarak NEK patogenezinde yer tutmaktadır [10]. Bu özelliklerden bir veya birkaçı bağırsak bariyer immatüritesine katkıda bulunarak mukozal hasarı ve bu hasarın ilerleyerek nekrotizan enterokolit tablosunu oluşturan olaylar zincirini başlatmaktadır [2]. Mukozal hasar sonrası kolonize olan intraluminal bakteriler bağırsak bariyerini aşabilirler. İnflamatuar kaskat tetiklenmesi ve inflamatuvar mediatörlerin salınması ile NEK'in lokal ve sistemik bulguları ortaya çıkar. Bunun yanında, beslenme ve mikrobiyal antijenler tarafından aktive olan mukozal immün sistem de sistemik inflamatuvar yanıtı neden olarak NEK patogenezinde katkıda bulunmaktadır [6].

İnflamatuar kaskatın tetiklenmesi ile salınan sitokinler, kemokinler, prostanooidler, platelet aktive edici faktör, endotelin, nitrik oksit gibi mediatörler sistemik immün cevabı uyarmanın yanında mukozal inflamasyon, ödem ve nötrofil infiltrasyonuna sebep olarak hücrede otokrin hasarı artırmakta, bariyer hasarını kötüleştirmekte; ayrıca otokrin, parakrin ve sistemik uyarılarla giderek artan abartılı bir immün cevaba sebep olmaktadır. Sonuç olarak enterosit apoptoz ve nekrozu, endotelial restitüsyon inhibisyonu ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu meydana gelmektedir [6].

NEK patogenezinde nitrik oksit (NO), interleükinler (IL), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), platelet aktive edici faktör (PAF) gibi pek çok inflamatuvar mediatörün rolü araştırılmış, nitrik oksit, indüklenbilir nitrik oksit sentaz, indüklenbilir siklooksijenaz ve ürünlerinin nekrotizan enterokolit ile ilişkisi birçok deneysel araştırma ile gösterilmiştir [2,11,12,13,14].

2.1.1. Nekrotizan enterokolit ile indüklenbilir nitrik oksit sentetaz ilişkisi

Nitrik oksit (NO) l-arjininin terminal nitrojen atomundan nitrik oksit sentetaz enzimi ile sentezlenen bir serbest radikaldir ve birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynar. İntestinal fizyolojide kan akımını, motiliteyi, endotel hücre fonksiyonlarını düzenlemek gibi işlevler

üstlenmekle birlikte paradoksal bir rol oynamaktadır. NO sentaz (NOS) izoformları tarafından düzenli olarak üretilen ve salınan NO etkin bir vazodilatör olması, kas gevşetici olması, nötrofil adhezyonunu ve trombosit agregasyonunu inhibe etmesi, inflamatuvar ve immün cevabı düzenlemesi sebebiyle yararlı ve koruyucudur ancak sürekli yüksek düzeyleri tam tersine intestinal epitele zararlıdır ve intestinal bariyer bozukluğuna katkıda bulunabilir [2]. Nitrik oksit sentetazın (NOS) üç izoformu vardır. NOS-1 (nöronal NOS) ve NOS-3 (endotelial NOS) kalsiyum bağımlıdır ve sürekli olarak düşük dozda salınır ve pikomolar düzeyinde NO sentezler. NOS-2 (indüklenebilir NOS, iNOS) ise normalde bulunmaz ancak inflamatuvar sitokinlerin uyarısıyla meydana çıkar ve molar düzeyinde NO sentezler. Her üç NOS izoformu da tüm gastrointestinal kanal boyunca mevcuttur. İzoformların bu farklı etkileri sayesinde, nitrik oksitin intestinal sistem üzerine hem düşük dozda koruyucu, hem yüksek dozda hasarlayıcı etkisi gerçekleşebilmektedir [11].

iNOS tarafından üretilen yüksek NO konsantrasyonlarının reaktif azot ara ürünleri yoluyla hücre hasar oluşturduğu düşünülmektedir. NO'nin süperoksit (O_2^-) ile çok güçlü bir oksidan olan peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturduğu reaksiyon çok hızlı gerçekleşen, biyolojik olarak en önemli reaksiyonlardan birisidir. $ONOO^-$ 'in inflamatuvar barsak hastalığı da dahil pek çok inflamatuvar lezyonda NO'nin sitotoksik veya sitopatik etkilerinin çoğundan sorumlu anahtar bir reaktif azot türevi olduğu gösterir veriler mevcuttur. $ONOO^-$ değişik tirozin bileşenlerini veya hedef proteinleri nitratlayarak hücre fonksiyonunu bozabilir. Nitrotirozin oluşumuna yol açan bir diğer reaksiyon aktive nötrofillerin bir ürünü olan hipoklorik asit (HOCl) ile NO metaboliti olan nitrit'in peroksidaz yolu ile reaksiyona girmesidir. Nitrit ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyon yolu ile de azotlanma reaksiyonu gerçekleşebilir. NO ayrıca ferröz demir gibi metallere etkileşerek nitrozonyum iyonunu oluşturabilir. Nitrozonyum proteinlerdeki sistein rezidülerini S-nitrozilasyona tabi tutarak protein fonksiyonlarını bozar [11].

Çeşitli çalışmalarda nitrik oksitin direkt olarak intestinal bariyer fonksiyonunu bozabileceği [15], NOS inhibitörü olan L-NAME uygulanmasının inflamatuvar bağırsak hastalığı modelinde

hastalık ağırlığını azaltabileceği [16] ve nekrotizan enterokolit patogeneğinde olasılıkla önemli yer aldığı gösterilmiştir [4,6,11,17]. Dahası, nekrotizan enterokolitli bebeklerin barsaklarında hem iNOS geninde, hem apikal villuslardaki protein ekspresyonunda, hem de nitrotirozin türevlerinde artış akut NEK ile bağırsaktaki inflamasyon yatıştıktan sonraki dönemde hem iNOS mRNA, hem de proteininin kaybolduğu [11] saptanmıştır.

iNOS'un aşırı üretimine neden olan faktörlerin ne olduğu ise tam açıklanamamakla birlikte lokal invazyon, intraepitelyal veya lamina propria lenfositleri tarafından proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve iNOS üretimini tetiklemektedir. Bu sitokinler ve NO birlikte incinme ve inflamasyonu arttırarak bir kısır döngüye neden olmakta, barsak duvarında mikrobiyal invazyonu kolaylaştırarak barsak nekrozuna ve sistemik sepsise neden olmaktadır [11,13,17].

2.1.2. Nekrotizan enterokolit ile siklooksijenaz-2 ilişkisi

Siklooksijenaz (COX) enzimi araşidonik asit metabolizmasında prostoglandin, lökotrien ve tromboksanların sentezinde rol oynayan ve hız belirleyici basamaklardan birisini oluşturan katalizör bir enzimdir. COX'ın iki izoformu tanımlanmıştır. Bunlardan COX-1 gastrointestinal mukoza dahil tüm dokularda düzenli olarak bulunan formudur. İndüklenebilir form olan COX-2 ise normalde pek çok dokuda belirlenemez; ancak gastrointestinal sistemin inflamatuvar durumlarında (örneğin inflamatuvar barsak hastalığı) IL-1, IL-6, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin uyarısıyla salınımı artar. Proinflamatuvar transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- κ B (nuclear factor- κ B: NF- κ B)'nin de COX-2 indüksiyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. NEK'li infantların intestinal epitel hücrelerinde COX-2 protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [11]. COX-1 ve COX-2'nin nonspesifik inhibitörü olan indometazin vazokonstriksiyona neden olur ve bu etkisinden ötürü patent ductus arteriosusu (PDA) olan bebeklerde kapatmak için kullanılır. Bununla birlikte, mezenterik dolaşımında da

vazokonstriksiyon ve iskemiye neden olarak NEK olasılığında artışa neden olduğu bilinmektedir.

2.1.3. Nekrotizan enterokolit ile antiinflamatuvar ajanlar

Bu tanımlananlar ışığında nekrotizan enterokolitten korunma ve tedavide antiinflamatuvar ajanların ve antioksidanların etkin olabileceği öne sürülmüş ve bu konuda değişik çalışmalar yapılmıştır. Birçok deneysel hastalık modelinde benzer inflamasyon kaskatı oluşturularak antiinflamatuvar ajanların olumlu etkileri gösterilmiştir ancak etkisi net gösterilerek hastalık tedavisinde kullanılmış bir ilaç bulunmamaktadır [1,2,4,5,6,16,18].

Klasik bilgi olarak, nekrotizan enterokolit açısından koruyucu etkisinin olduğu düşünülen [8,9] glikokortikoidler ise günümüzde tartışmalı bir konudur. Birçok merkezin kayıtları incelenerek yapılan geniş bir çalışmada glikokortikoid kullanımının NEK gelişimi için bir risk faktörü olarak saptanmıştır [7].

2.1.4. Nekrotizan enterokolitte bozulmuş restitüsyon

Nekrotizan enterokolit, bağırsak bariyer yetmezliği sonrası gelişen intestinal mukozal hasar ve buna eşlik eden sitokinlerin uyarılmasına yanıt olarak ortaya çıkan nitrozatif stresin bir etkisi olarak hücre apoptozunda artış ve sistemik inflamatuvar yanıtın gelişmesiyle seyreden bir klinik tablodur. İyileşmede kendi kendini de tetikleyerek giderek artan cevaba sebep olan inflamasyon sürecinin durdurulması, hücre apoptozunun engellenmesi, mukozal hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile bağırsak bariyerinin yeniden oluşturulması gereklidir.

İntestinal epitel çok hızlı bir yenilenme kapasitesine sahiptir. Nekrotizan enterokolitte olduğu gibi, intestinal bariyer hasarlarında, hastalığın sınırlandırılabilmesi için LPS ve inflamatuvar sitokinler etkisiyle hasar gören intestinal epitelyal bariyerin hızla onarılması gerekir. İntestinal

bariyerin yeniden oluşturulması için kript-villus aksı boyunca kriptlerdeki proliferatif ve migratuar kapasitesi yüksek intestinal epitel hücrelerinin çoğalarak yeni hücreler oluşturması, bu hücrelerin de proliferere ve diferansiye olması, bununla birlikte akut hasar durumunda bu süreçten daha hızlı bir yanıt gerektiğinden göç ederek hasarlı bölgeyi yeniden kapatarak onarması söz konusu olmalıdır. Bu iki aşamalı olarak tanımlanabilecek süreçte, daha yavaş olan epitelyal hücre proliferasyon ve diferansiyasyon sürecinin gerçekleşebilmesi için çok daha hızlı bir süreç olan hücre migrasyonu ile oluşan hasarın kapatılması ve bütünlüğün korunması fazı zorunludur ve “*restitüsyon*” adı verilir [19,20,21]. NEK’te mukozal bariyer fonksiyonunun korunması için restitüsyon fonksiyonunun yerine konulması inflamatuar yanıtın baskılanması kadar önemlidir.

Migrasyon sırasında hücre, ekstraselüler matriks üzerinde hareket edebilmek için bazal membran ile olan bağlantılarını çözüp hücre iskeletindeki aktin moleküllerini yeniden düzenler ve yeni bağlantılar kurar. Migrasyon için uyarı hücreye geldiğinde öncelikle hücre polarize olur. Polarizasyonda birçok protein görevli olmakla birlikte başlıcaları Cdc42, Par proteinleri ve aktive protein kinaz-C (aPKC)’dir. Polarizasyon sayesinde mikrotübüller, mikrotübül organize edici merkez (MTOC) ve golgi cisimciği hücrenin ön kısmında yoğunlaşır. Migrasyon döngüsü aktin polimerizasyonu ile lamellipod ya da filopod şeklinde bir protrüzyonun oluşmasıyla başlar. Protrüzyonun ana regülatörleri Rho ailesi proteinleridir. Aktin polimerizasyonu, lamellipod ve filopod formasyonunun regülasyonu ve adhezyon formasyonunda birçok basamakta anahtar role sahiptir. Rho ailesi proteinleri GTP ile bağlandıklarında aktive olarak protein kinazlar, lipid modifiye edici enzimler ve Arp 2/3 kompleksinin aktivasyonu gibi hücre için önemli birçok yolağın işlevini sağlar. Rac, Cdc42 ve Rho G (RhoGTPazlar) lamellipod ve filopod protrüzyonunda mutlaka gereklidir. Guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF) ile aktive, GTPaz aktive edici proteinler (GAP) ile inaktive olurlar. Rho-ilişkili protein kinaz (ROCK) serin-tirozin kinaz ailesinden bir enzimdir. Hücre iskeletinin korunmasında, hücrenin şeklinde ve hareketinde merkezi rollere sahiptir. RhoA GTPazın ana inhibitörüdür. Myozin hafif zincir (MLC) kinaz ve fosfotazı fosforilleyerek aktin

filaman organizasyonu ve kontraktilitesini düzenler. MLC kinazı fosforilleyerek myozin 2 ATPaz aktivitesini artırır, böylece myozin dallanmalarının senkronizasyonunu ve aktin filamanlarının yaklaşarak kılmasını sağlar. MLC fosfotazı ise fosforilleyerek inhibe eder, böylece hafif zincir myozinlerin fosforile, yani aktif, kalmasını sağlayarak kontraktilitenin artmasına katkıda bulunur. Ayrıca aktin depolimerizasyonunu indirekt olarak inhibe ederek oluşmuş aktin filamanlarının stabilizasyonunu sağlar. Protrüzyonların meydana gelmesi, elongasyonu ve stabilizasyonu için Rho A, Rac, Cdc42, Rho G, WASP/WAVE kompleksi, Arp 2/3 kompleksi gibi birçok proteinin aktivitesi, veziküler transport ve çoklu pozitif feedback yolları gereklidir. Protrüzyonlar adhezyon formasyonu ile stabil hale getirilir ve bir yandan şapkama ve durdurma proteinleriyle sınırlandırılarak düzenlenir. Adhezyon formasyonu için integrin aktivasyonu ve kümelenmesi gereklidir. Aktivasyonda PKC, Rap1, fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) yolları rol oynar. Bunun yanında migrasyonun gelişebilmesi için önde adhezyonlar kurulur ve hücre retrakte olurken, kuyruktaki adhezyonların çözülmesi gerekir. Bu döngü Src/FAK/ERK, Rho, myozin 2, kalsiyum, kalsinörin, kalpain ve bu moleküllerin mikrotübüllerce taşınmasını gerektiren karmaşık bir süreçtir [21,22,23,24].

2.1.5. Restitüsyon ile fokal adhezyon kinaz ve fosforile fokal adhezyon kinaz ilişkisi

Fokal adhezyon kinaz (FAK) ya da protein tirozin kinaz 2, hücre adhezyon ve yayılımında çok önemli bir proteindir. Hücrenin migre olabilmesi için polimerizasyon ve aktin filaman aktivasyonunun yanı sıra çevre ekstraselüler matriksi ile fokal adhezyonların kurulup yıkıldığı aktif bir döngü gereklidir. Özellikle belli bir yöne migrasyon gerçekleştirebilmek için migrasyon yönünde adhezyonlar olur ve hücre retrakte olurken kuyruktaki adhezyonların yıkılması gereklidir. Protoonkogen tirozin-protein kinaz (Src) ve FAK bu adhezyon döngüsünde yer alırken aynı zamanda Rac ve ERK yolları üzerinden yeni adhezyonların oluşmasını indükler. FAK'a sahip olmayan hücreler daha geniş adhezyonlar yaparlar ve migrasyon yetenekleri zayıftır [21,24].

Hücre adhezyon, yayılım ve migrasyon sürecinde ekstraselüler matriks ile integrinlerin etkileşimini takiben sinyal proteinleri sitoskeletal proteinlerle birleşir. FAK'ın aktivasyonu için gerekli olan tirozin rezidülerinin fosforilasyonu, fokal kontaktların oluşumuyla birlikte hızla gerçekleşen bir süreçtir. FAK'ın migrasyon sürecindeki rolü halen tartışmalı olmakla birlikte, yapılan çalışmalar FAK-null fibroblastların beklenenin aksine azalmış değil abartılı fokal kontaktlar oluşturduğunu göstermektedir. Bu sebeple FAK'ın migrasyon sürecindeki temel rolünün integrin uyarısıyla oluşan adhezyon alanlarının çözülmesi olarak yorumlanmıştır [25,26,27]. Bununla birlikte FAK inhibisyonunun mikrotübül polarizasyonunu bozduğu, hücre motilite uyarılarına cevabı azalttığı da gösterilmiştir [25,27]. Sonuç olarak FAK'ın fokal temaslarının hem oluşumu ve matürasyonu, hem de çözülerek döngüsünün sağlanması için hücre içindeki birçok yolağın modülasyonunda görevli bir temel yapı proteini olduğu söylenebilir [25]. FAK hücrenin çevresel migrasyon uyarısına uygun yanıt vermesini sağlayan migrasyon sürecinde çok önemli bir proteindir.

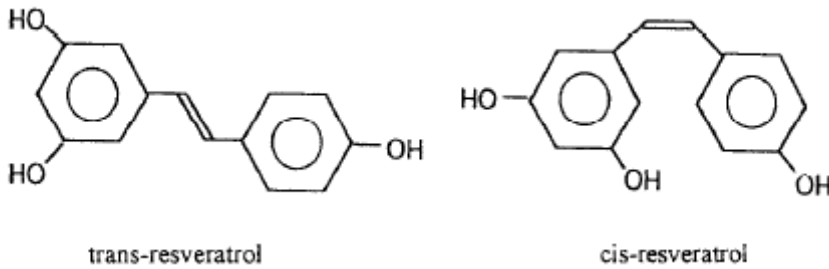
Çetin ve ark.nın enterosit migrasyonu ile yaptıkları bir çalışmada endotoksinin Rho-A bağımlı olarak FAK fosforilasyonuna, böylece fokal temasların ve hücre yapışkanlığının artmasına sebep olarak enterosit migrasyonunu engellediği gösterilmiştir [28]. Yine intestinal motilite üzerine Basson ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise yine FAK protein artışının intestinal motilitede azalmayla ilişkili olduğu gösterilmiş ancak fosforilasyonla benzer ilişki gösterilememiştir. Migrasyon sürecindeki FAK modülasyonu mRNA düzeyinde FAK protein sentezinin ayarlanmasıyla ilişkilendirilmiştir [29].

2.2. Resveratrol hakkında genel bilgiler

Resveratrol yüksek sınıf bitkilerde incinme veya fungal enfeksiyonlara karşı üretilen bir fitoaleksindir. Yunancadan köken alan sözcükler olan “fito” (bitki kaynaklı) ve “aleksin”in (koruma) birleşmesinden oluşan bu kelime bitkiler tarafından mantar gibi patojenik mikroorganizmalara karşı üretilen kimyasal savunma ajanları için kullanılmaktadır [30].

Resveratrol üzüm asmalarında bulunan bir maddedir. Asma kökünde, üzüm çekirdeğinde ve sapında bulunmakla beraber en yüksek konsantrasyonlarına üzümün kabuğunda rastlanmaktadır. Siyah üzümün kabuğunda daha yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Şarapta da bolca bulunan polifenol özellikte bir madde olup kırmızı şarapta beyaz şaraba göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Üzüm ve şarabın yanı sıra dut ve yer fıstığında da bulunur [30].

Resveratrol kimyasal formülü 3,4',5 trihidrokstilbene ve 3,4',5 stilbenetriol şeklindedir ve *cis*- ve *trans*- stereoisomerik formlarda mevcuttur. Moleküler formülü $C_{14}H_{12}O_3$ ve moleküler ağırlığı 228.25 daltondur. Üzüm ve yer fıstığında bulunan stereoisomeri *trans*- formudur. Cis formu daha aktiftir.



Hayvan ve insanlardaki sınırlı sayıda çalışmalar resveratrolün intestinal sistemden emildiğini ortaya koymuştur. Epidemiyolojik ve in-vitro çalışmalar resveratrolün antioksidan, antiinflamatuvar, antimutajenik, vazorelaksan, antiagregan ve kemopreventif etkilerinin olduğu gösterilmiştir [30,31,32,33].

Resveratrolün serbest radikal giderici ve hücre yaşam siklusunda anahtar enzimler üzerinde modölatör etki gösterdiği belirtilmektedir. Bu enzimler arasında COX-1 ve COX-2, lipoksijenaz, protein kinaz C, protein tirozin kinaz, ribonükleotid redüktaz ve sitokrom p450 sayılabilir [30,31,34]. Hücre diferansiyasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, resveratrolün nöroprotektif, hepatoprotektif ve kardiyoprotektif bir ajan olduğu belirtilmektedir. Tümör oluşumu, büyümesi ve yayılması ile ilgili hücresele olaylarda çarpıcı bir inhibitör etkiye sahiptir [30,32,33,34]. Lipid peroksidasyonunu önlediği ve lipoprotein metabolizmasını düzenlediği bildirilmiştir. İmmun sistemde makrofajlarda NO ve TNF- α üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, fare lenfositlerinde proliferasyonu, IL-2, IL-12 ve interferon- γ (IFN- γ) üretimini artırarak immün modülasyon yapıcı etkilerinin olduğu da belirlenmiştir [30,33]. İnflamatuar bağırsak hastalığında da resveratrolün olumlu etkileri gözlenmiştir. Ratlarda deneysel ülseratif kolit modelinde resveratrol ile suplemante edilen deney hayvanlarında kilo kaybının, kolonik hasarın yayılım ve ağırlığının azaldığı; makroskopik olarak incinmenin boyutunun azaltılmasının yanı sıra histopatolojik olarak da hücre hasarında ve lamina propriadaki inflamatuvar hücrelerinin sayısında azalmaya yol açtığı belirlenmiştir [35].

Ayrıca düşük doz resveratrolün (0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hücre proliferasyonunu olumlu yönde etkilerken, yüksek dozların (10.0-100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apoptoza neden olarak mitotik aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir [36].

3. Gereç-Yöntem

Yukarıdaki bilgilerin ışığında, resveratrolün intestinal mukozal bariyer fonksiyonları üzerinde koruyucu rol oynayabileceği ve nekrotizan enterokolit hastalığının seyrinde iyileştirici etki gösterebileceği düşünülmüştür. Ayrıca daha önce diyetetik suplementasyonunun rat nekrotizan enterokolit modelinde oldukça çarpıcı bir koruyucu etkisi gösterilmiş olduğundan, bu etkinin hücre hasarına yol açan birçok enzim yolağı üzerine modülatör etki ve yanı sıra hücre restitüsyonu (migrasyon) üzerine etki ile olduğu hipotezi kurulmuştur.

Bunu ortaya koymak için sıçan enterosit (IEC-6) kültür hücreleri ile oluşturulan deneysel NEK modelinde resveratrol ile suplementasyonun hasara yol açan yollardaki enzim düzeyleri ve hasar sonrası restitüsyonu sağlayan migrasyon üzerindeki etkileri ve bu etkilerin mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Resveratrolün farklı dozlarla farklı etkileri de gösterilmiş olduğundan, farklı dozların etkilerinin ortaya konulması planlanmıştır.

Tüm deneyler Ege Üniversitesi Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı bünyesindeki hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır.

3.1 IEC-6 hücre kültürü

Deneyler için sıçan normal ince bağırsak hücrelerinden oluşan IEC-6 hücre hattı (DSMZ[®], no: ACC 111) kullanılmıştır. Dondurulmuş olarak (-80°C) saklanan IEC-6 hücreleri çözündürme işleminin ardından 37°C ve %5 CO₂ ortamında üreticinin önerdiği vasatta (%45 Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DMEM], %45 Roswell Park Memorial Institute medium [RPMI], %10 fetal bovine serum [FBS], 0.1 U/mL insülin, 4 mM l-glutamin, 100 U/100 mg/mL penisilin-streptomisin) inkübe edilmiştir. İlerleyen dönemde deney flaskında mantar üremesi olması üzerine vasata 400 µL/100 ml olacak şekilde amfoterisin B eklenmiş ve sonraki deneyler bu vasat ile yapılmıştır.

Çözdürme işlemi:

1. *Kriyotüp sıcak su banyosunda hızla çözdürülür*
2. *İçerik tüpe alınır, üzerine medium eklenir*
3. *800 rpm'de 5 dakika santifüjlenir*
4. *Oluşan pellet vasat ile süspansiyon haline getirilerek flaska ekilerek invert mikroskop altında kontrol edilip enkübatöre alınır.*

Tüm deneyler 15-20. pasajlardaki hücreler ile yapılmıştır. Pasajlama için flask tabanındaki hücreler >%90 yoğunluğa ulaştığında tripsinizasyon ile kaldırılarak hücre sayımı yapılmış, ardından uygun şekilde bölünerek alt kültürler oluşturulmuştur.

Tripsinizasyon İşlemi

1. *Flask 2 kez steril serum fizyolojik ile yıkanır*
2. *25 cm² lik flask için 2,5-3,5 ml; 75 cm² lik flask için 3,5-4,5 ml tripsin-EDTA eklenerek enkübatöre yerleştirilir, 3 dakika aralarla invert mikroskop altında hücrelerin yapıştığı yüzeyden kalkışı izlenir*
3. *Hücrelerin büyük oranda tabandan kalktığı gözlemlendiğinde (ortalama 10 dakika) enkübatörden alınarak en az eklenmiş olan tripsin-EDTA miktarı kadar olmak üzere vasat eklenerek tripsinizasyon işlemi durdurulur.*
4. *İçerik tüpe alınır, 2000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenir.*
5. *Oluşan pellet vasat ile homojen bir süspansiyon haline getirilerek trypan mavisi ve Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı sayımı yapılır. Süspansiyon hücre sayısı ve ekilmek istenen hücre miktarına göre uygun şekilde bölünerek flasklara ekilir, invert mikroskop altında kontrol edilip enkübatöre yerleştirilir.*

Sonraki deneylerde kullanılmak üzere her pasajdaki hücre gruplarından bir kısmı yatay olarak da pasajlanarak 2,000,000 hücre/kriyotüp olacak şekilde, hücre sayısına göre bir veyahut birkaç adet kriyotüp olarak dondurularak saklanmış, yeri geldikçe yeniden çözdürülerek kullanılmıştır.

Ön çalışma olarak IEC-6 hücrelerinin ikiye katlanma süresini ve böylece deneylerin zamanlamasını öngörmek amacıyla farklı pasajlarda ekilmiş olan hücreler kaldırıldığında hücre sayımı yapılarak <http://www.doubling-time.com/compute.php> sitesi kullanılarak hücrelerin ikiye katlanma zamanı hesaplanmıştır. DSMZ veri sayfasında ortalama 50 saat

olarak bildirilmiş olan ikiye katlanma zamanı 15-20. pasaj arasındaki hücreler için tekrarlayan sayımlarla ortalama 35 saat olarak hesaplanmıştır.

3.2 Lipopolisakkarit ve sitokinler ile deneysel nekrotizan enterokolit modeli oluşturulması

Deneysel nekrotizan enterokolit modeli oluşturmak amacıyla tama yakın yoğunlukta üretilen IEC-6 kültür hücreleri LPS (50µg/ml) veya sitokin karışım “*sitomiks*” ile (TNF α : 10 ng/mL; IFN γ : 1000 IU/mL; ve IL-1 β : 1ng/mL) ile muamele edilmiştir [15,37].

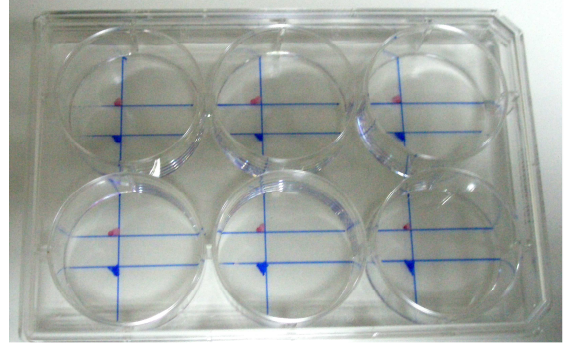
3.3 Deneysel migrasyon modeli ve bu modelde resveratrolün etkisinin gösterilmesi

Resveratrolün intestinal epitel hücrelerinin migrasyonunu nasıl etkilediğini değerlendirmek amacıyla “*scratch migration assay*” (sıyrık migrasyon analizi) yöntemi kullanılmıştır [38]. IEC-6 hücreleri flasklarda tama yakın çoğaltıldıktan sonra tripsinizasyon işlemiyle kaldırılarak 6 kuyulu plaklara eşit sayıda ekilmiştir.

Ön çalışma olarak her bir kuyuya ne kadar hücre ekileceğini ve deney zamanlamasını öngörebilmek amacıyla, 6 kuyulu plaklara farklı sayılarda hücre ekilmiş ve tama yakın çoğaldıkları zaman dilimi izlenmiştir. Bunun için 6 kuyulu plaklara 200000, 300000, 400000 ve 500000 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılmış ve izlenmiştir. 24 saat sonunda 500000 hücre ekilen kuyuların deney için uygun yoğunluğa ulaştığı gözlenmiş; bu sebeple deneylerde her kuyuya 500000 hücre ekilerek tama yakın yoğunluğa ulaşma için 24 saat beklenilmesi kararlaştırılmıştır. Bunun yanında, her kuyuda, merkezde hücre yoğunluğunun daha iyi olduğunun gözlenmesi üzerine fotoğraflama için kuyu merkezlerinin kullanılması kararlaştırılmıştır.

Migrasyon deneylerinde pasaj 15-18'deki hücreler kullanılmıştır.

Aynı noktayı fotoğraflamayı sağlayabilmek için ekim öncesi bu kuyuların tabanında ızgara şeklinde renkli işaretlemeler yapılmıştır (fotoğraf 1). 6 kuyulu plaklara 500000 hücre/kuyu ekilmesini takiben 24. saatte (hücreler plaklarda tama yakın



Fotoğraf 1: Altı kuyulu plakların işaretlenmesi

yoğunlukta çoğaltıldıktan sonra) 12 saat FBS içermeyen vasatta 37°C ve %5 CO₂ ortamında bekletilmiştir. Ardından kuyunun merkezinde sarı pipet ucuyla sıyrılarak deneysel yara oluşturulmuştur ve sıyırma işlemiyle kalkan hücrelerin aynı yere geri yapışmasını engellemek için iki kez steril serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Ardından her bir kuyuya 2 cc serum içermeyen vasat konularak yaralar mikroskopta kontrol edilmiştir. Diğerlerinden belirgin farklı genişlikte yaralar oluşan veyahut düzgün yaralar oluşturulamayan kuyular çalışma dışı bırakılmıştır. Renkli işaretlemeler kullanılarak her kuyu için iki ayrı alandan fotoğraf çekilmiş, yaranın en düzgün olduğu alan seçilerek ölçümler tekrarlayan fotoğraflarda bu seçilen alan kullanılarak yapılmıştır.

“Kontrol”, “çözücü”, “yalnızca resveratrol”, “yalnızca LPS”, “yalnızca sitomiks”, “resveratrol +LPS” ve “resveratrol+sitomiks” şeklinde gruplar oluşturulmuştur. Her grup için deney en az üç kez tekrarlanmıştır. Her altı kuyulu plakta mutlaka bir adet kontrol grubu oluşturulmuştur.

Kontrol gruplarına yara oluşturma, yıkama ve serum içermeyen vasatın yenilenmesi dışında işlem yapılmamıştır.

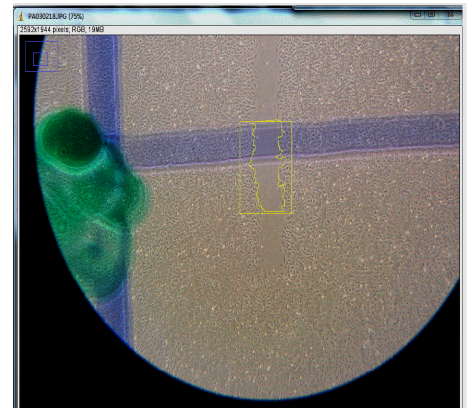
Sudaki çözünürlüğü oldukça düşük olan resveratrolü çözebilmek amacıyla dimetil sülfoksit (DMSO) veya etanol kullanılmıştır. Çeşitli çalışmalarda <0.2% konsantrasyonuna kadar DMSO'nun enflamasyon kaskadı üzerinde etkisi olmadığı gösterilmesine rağmen [p], antienflamatuar ve antioksidan etkilerinin olduğu bilindiğinden ön çalışma olarak yalnız DMSO veya etanol ile muamele edilmiş üçer grup oluşturularak en yüksek doz resveratrol

çözmek için kullanılmış DMSO veya etanol ile enkübe edilerek kontrol grubuyla karşılaştırmalı migrasyon izlenmiştir. Etanol ile kontrol grubuna daha yakın sonuçlar elde edilmesi üzerine (sayfa 34, sonuçlar) ilerleyen deneylerde çözücü olarak etanol kullanılmıştır.

Resveratrol ile benzer hücrelerde yapılmış benzer çalışma bulunmadığı ve farklı çalışmalarda farklı etkilerine ilişkin çok geniş bir doz aralığı (0.01 $\mu\text{M/L}$ -100 $\mu\text{M/L}$) bulunduğundan resveratrol öncelikle 0,1/0,5/1/5/10 $\mu\text{M/L}$ dozlarında uygulanmış, doz cevabına göre (sayfa 36, sonuçlar) etkin doz aralığı 0,5-5 $\mu\text{M/L}$ olarak belirlenerek “western blot” deneyleri 0,5/1/5 $\mu\text{M/L}$ dozlarında uygulanılmıştır.

“Yalnızca resveratrol” gruplarına yara oluşturma-yıkama-serum içermeyen vasatın yenilenmesini takiben farklı dozlarda resveratrol uygulanılmıştır. “Yalnızca LPS” gruplarına yara oluşturulmasından 1 saat sonra LPS (50 $\mu\text{g/ml}$); “yalnızca sitomiks” gruplarına yara oluşturulmasından 1 saat sonra sitomiks (TNF α : 10 ng/mL; IFN γ : 1000 IU/mL; ve IL-1 β : 1ng/mL) uygulanılmıştır. “Resveratrol+LPS” gruplarına yara oluşturma-yıkama-serum içermeyen vasatın yenilenmesini takiben farklı dozlarda resveratrol, 1 saat sonra sonra LPS (50 $\mu\text{g/ml}$); “resveratrol+sitomiks” gruplarına ise yara oluşturulmasını takiben farklı dozlarda resveratrol, 1 saat sonra sitomiks (TNF α : 10 ng/mL; IFN γ : 1000 IU/mL; ve IL-1 β : 1ng/mL) uygulanılmıştır.

Daha sonra muamelelerin tamamlandığı saat (yara oluşturulmasının 1. saati veya LPS/sitomiks eklene saat) “0. saat” kabul edilerek hücrelerin oluşturulmuş yarayı tamir edebilme hızları invert mikroskop altında işaretlenmiş alanları 0,2,4,6,8,10,12,24. saatinde 40 büyütmede fotoğraflamak kaydıyla izlenmiştir. Fotoğraflar Natioanal Institute of Health Image J programına aktarılmış, her bir zaman diliminde defektif alan ölçümü yapılarak migrasyon hızları belirlenmiştir (fotoğraf 2).



Fotoğraf 2: Image J programı ile alan ölçümü

3.4. Nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz, fokal adhezyon kinaz düzeylerinin tayini

Migrasyon deneylerine eş biçimde yine “Kontrol”, “çözücü”, “yalnızca resveratrol”, “yalnızca LPS”, “yalnızca sitomiks”, “resveratrol+LPS” ve “resveratrol+sitomiks” şeklinde gruplar oluşturulmuştur. Her grup için deney en az üç kez tekrarlanmıştır. Her grup için deneyi 3 kez tekrarlamak için deney dört takım halinde tamamlanmış, her deney takımında mutlaka bir adet kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu deneyler için 15 ve 16. pasajdaki hücreler kullanılmıştır.

Tama yakın yoğunlukta üretilen IEC-6 hücreleri flasklarda tama yakın yoğunlukta çoğaltıldıktan sonra 12 saat FBS içermeyen vasatta 37°C ve %5 CO₂ ortamında bekletilmiştir. Ardından her flaska aynı şekilde olacak şekilde cam pipet ucuyla yaralar oluşturulmuştur ve sıyırma işlemiyle kalkan hücrelerin aynı yere geri yapışmasını engellemek için iki kez steril serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Ardından her bir flaska 5 cc serum içermeyen vasat konularak yaralar mikroskopta kontrol edilmiştir. Kontrol gruplarına yara oluşturma, yıkama ve serum içermeyen vasatın yenilenmesi dışında muamele yapılmamıştır. Protein analizleri resveratrol migrasyon deneylerinde etkinliği gösterilmiş olan 0.5, 1, 5 µM/L dozlarında resveratrol uygulanarak yapılmıştır. Yalnızca resveratrol, resveratrol ardından LPS ve resveratrol ardından sitomiks gruplarına yara oluşturulmasını takiben farklı dozlarda (0.5, 1, 5 µM/L) resveratrol eklenmiştir. 1 saat inkübasyonun ardından yalnızca LPS ve resveratrol ardından LPS gruplarına 50µg/ml LPS, yalnızca sitomiks ve resveratrol ardından sitomiks gruplarına TNF α: 10 ng/mL; IFN γ: 1000 IU/mL; ve IL-1β: 1ng/mL eklenmiştir.

LPS ve sitokin uygulamasının etkilerinin araştırılması amacıyla protein analizi için örnekler, migrasyon deneylerinde gruplar arası belirgin fark LPS gruplarında 12. saatte ortaya çıktığından, LPS veya sitomiks ile 12 saat muamele edildikten sonra toplanmıştır (sayfa 39-40, sonuçlar).

12 saatin ardından lizis tamponunda parçalanmış hücre lizatları 4 °C'de 14000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek hücre debrisleri uzaklaştırılmış ve süpernatantları ayrılmıştır. Lowry analizi ile süpernatantlar içindeki protein konsantrasyonu belirlenmiş, süpernatantların içerdiği proteinler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE; Western Blot) ile ayrıştırıldıktan sonra nitroselülöz membrana (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) transfer edilmiştir. Membranlar 1 saat süre ile oda ısısında %0.1 PBS-Tween içinde %5'lik süt ile bloke edildikten sonra 1:1000 dilüsyonda iNOS antikorları, 1:2000 dilüsyondaki COX2 antikorları, 1:1000 dilüsyonunda total FAK ve 1:1000 dilüsyonunda p397 fosfoFAK ile oda ısısında 1 saat muamele edilmiştir. Bunu takiben sekonder antikor (IgG) ile muamele edilerek membranlardaki protein bantları elektrokemilüminesans yöntemi ile görüntülenmiştir.

Bu deney aşamalarının detayları aşağıda anlatılmıştır.

3.4.1. Hücre Kültüründen Protein Homojenizasyonu

İşleme başlamadan önce hücreleri yıkamak için kullanılacak fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS) , protein lizis tamponu (PLB) ve kinaz grubu proteinler çalışıldığı için reaksiyonları engellemek için proteaz inhibitörlerinin hazırlanması gerekmektedir.

Flaskaları yıkamak için kullanılan izotonik fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS); 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCL, 10 mmol/L Na₂HPO₄ • 2 H₂O, 2 mmol/L KH₂PO₄ içeren pH'sı 7.4 olan tabletler ile, bir tablet 100 mL distile suda manyetik karıştırıcı ile çözdürülerek hazırlanmıştır.

Protein lizis tamponu aşağıdaki reğete ile hazırlandıktan sonra pH'ı 7.4'e getirilmiştir.

Protein lizis tamponu	MW	Miktar/100 ml
50 mM Tris (606 mg)	121.4	0.6059 g
150 mM NaCl (876,6 mg)	58.44	0.8766 g
1 mM EDTA (37,22 mg)	372.24	0.037224 g
1 mM EGTA (38 mg)	380.40	0.0380.4 g
1% Triton X100 (1 mL)		1 g
1%Deoxycholic acid (1 g)	414.6	1 g
10% Glycerol (10 mL)		10 g
10 mM NaPyroPO ₄ (446,1 mg)	446.1	0.4461 g
50 mM NaF (210 mg)	41.99	0.2099 g
0.1% SDS (100 mg)		100 mg

Proteaz inhibitörleri proteinlerin yıkılmasına neden olabilecek proteazların aktivitesini inhibe eder. Deneilerde proteaz ve fosforile proteinler ile çalışılacağı için fosfataz inhibitörleri protein lizis tamponuna eklenmiştir. Proteaz inhibitörleri protein lizis tamponuna kullanımdan hemen önce eklenmektedir. Farklı kombinasyonlar kullanılabilmele birlikte deneylerimizde her 10 mL protein lizis tamponu için 5 µl aprotinin, 5 µl leupeptin, 50 µl metanol içinde çözölmüş 200 mM PMSF, 50 µl Na₃VO₄ kullanılmıştır.

Sodyum ortovanadat (Na₃VO₄) eldesi için Na₃VO₃ 200 mM solüsyon halinde hazırlanıp kaynatılarak aktiflenmiş ve 1 N NaOH veya 1 N HCl kullanarak pH'ı 10.0'a ayarlanmıştır.

Gerekli solüsyonların hazırlanmasının ardından flasklar buz üstüne alınmıştır ve proteinlerin korunması amacıyla tüm deneyler soğuk ortamda ve buz üstünde yapılmaktadır. Buz üstüne alınan flasklar, her flask 6 mL ile iki kez olacak şekilde soğuk PBS ile yıkanır ardından her flaska 500 µL soğuk PLB eklenmiştir. Buz üstünde saklanan flasklar steril hücre kazıma çubuklarıyla kazandıktan sonra soğuk eppendorfa aktararak buza gömölümüş, 30 dakika

beklenmiştir. Ardından hücre lizisini artırmak amacıyla 5 kez insülin enjektöründen köpürtmeden geçirilmiş, +4°C'deki santrifüjde 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatantlar ayrılarak protein analizi için eppendorflara alınarak -20°C'de saklanmıştır.

3.4.2 Protein miktarı ölçümü (Lowry analizi)

Örneklerden protein miktarı ölçülmesi amacıyla Lowry analizi kullanılmıştır. Lowry analizi Folin-Ciocalteu ayracı ile oluşan peptid bağlarının oksidasyonu esasına dayanan bir tekniktir. İndirgenmiş ayracın konsantrasyonu 750 nm'de absorbans spektrofotometreyle ölçülür.

Ölçümler için standart örnek olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. BSA %0.1, %0.08, %0.06, %0.04, %0.02, %0.01 konsantrasyonlarında olmak üzere altı standart olarak hazırlanmıştır.

Örnekler bire bir sulandırıldıktan sonra 6 standart ve 10 örnekten 20'şer µL alınıp 180 µL distile su eklenerek eklenerek eppendorflar hazırlanıp girdap karıştırıcı ile karıştırılmış, eppendorf santrifüjde 14000 rpm'de kısa santrifüjleme uygulanmıştır. Eppendorflara 1 mL alkali bakır çözeltisi (100:1:1 oranında Na₂CO₃ : Na-K-Tartarat : CuSO₄) konularak 10 dakika, ardından 100µl folin-HCl (1:1 oranında folin-HCl) çözeltisi konularak 30 dakika karanlık odadan inkübe edilmiştir. Mikroplaklara 300 µL örnek konularak spektrofotometrede 750 dalga boyunda absorbans değerlendirilmiştir.

Ardından hazırlanmış standart protein solüsyonlarının ölçümleriyle her ölçüm için ayrı bir standart grafiği (protein konsantrasyonu-absorbans grafiği) oluşturulmuştur. Eş zamanlı örnekler ile yapılan ölçümlerle değerlendirilerek örneklerdeki protein miktarları hesaplanmıştır. Absorbans değerleri ile protein yoğunluğunun hesaplaması için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Protein (mg/ml)} = (\text{Absorbans}/0.9929\text{-standart grafiğinin eğimi}) \times \text{dilüsyon oranı}$$

Örnekler içindeki protein miktarları hesaplandıktan sonra Western Blot analizi için kuyulara 40 µg protein yüklenebilmesi için gereken örnek miktarları hesaplanmıştır.

3.4.3. Western Blot

Western Blot, dokudaki spesifik proteinleri analiz etmemizi sağlayan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik sayesinde dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu, farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması sağlanabilir. Molekül ağırlıklarıyla birbirinden ayrılabilen spesifik proteinlerin jel elektroforezi ile birbirinden ayrılması, bu proteinlerin elektrik akımı ile membrana aktarılması, ve bu membranın belirlenmek istenen proteine spesifik antikora tabi tutularak tespit edilmesi esasına dayanır. Bulguların filme aktarılmasıyla çıkan bantların molekül ağırlıklarına göre değerlendirilmesi ile proteinin olup olmadığı, çıkan bantların kalınlığının kontrol bantlarıyla karşılaştırılmasıyla miktarları anlaşılır.

Western blot analizi için öncelikle ayırma jeli, yığma jeli, elektroforez tamponu, transfer tamponu, yıkama tamponu ve %5'lik bloklama tamponunun hazırlanması gerekmektedir.

Her deney öncesi ön hazırlık şu şekilde yapılmıştır.

Öncelikle çok iyi şekilde temizlenmiş ve alkol ile iyice ovulmuş iki cam, aralarına iki çubuk (*spacer*) yerleştirildikten sonra arka arkaya konarak düzeneğe yerleştirilmiştir.

Ayırma jeli hazırlanarak hazırlanmasının hemen ardından düzeneğe (iki cam arasına) doldurularak yüzeyinin düzgün olması için az miktar distile su konularak donması beklenmiştir.

Ayırma jeli

	%7'lik (FAK, fosfoFAK için)	%8'lik (iNOS, COX için)
<i>Distile su</i>	<i>3.3 ml</i>	<i>7.44 ml</i>
<i>1.5 M pH 8.8 Tris Çözeltisi</i>	<i>2.5 ml</i>	<i>4 ml</i>
<i>%10'luk SDS</i>	<i>100 µl</i>	<i>160 µl</i>
<i>Akrilamid/ Bisakrilamid</i>	<i>4 ml</i>	<i>4.27 ml</i>
<i>% 10'luk APS</i>	<i>100 µl</i>	<i>120 µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>4 µl</i>	<i>8 µl</i>

Jel iyice polimerleştikten sonra yığma jeli hazırlanmış, ayırma jelinin üzerindeki distile su boşaltılarak ayırma jelinin üzerine dökülmüş, 25 dakika donması beklenmiştir. Jel dökülür dökülmez üzerine tarak yerleştirilerek bu şekilde donması sağlanmış, böylece örneklerin yükleneceği kuyular oluşturulmuştur.

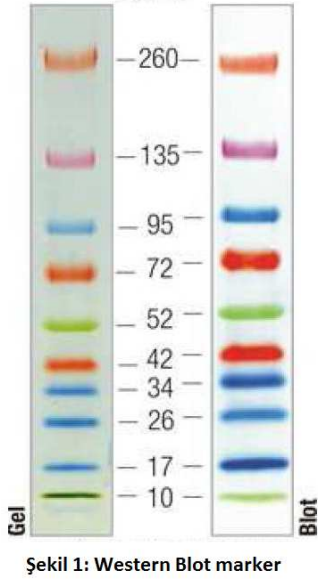
Yığma Jeli (%4'lük)

<i>DS</i>	<i>3 ml</i>
<i>0.5 M pH 6.8 Tris Çözeltisi</i>	<i>1.25 ml</i>
<i>%10'luk SDS</i>	<i>50 µl</i>
<i>Akrilamid/ Bisakrilamid</i>	<i>670 µl</i>
<i>% 10'luk APS</i>	<i>25 µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>5 µl</i>

Bundan sonra elektroforez işleminin yapılabilmesi için elektroforez, transfer, yıkama ve bloklama tamponları hazırlanmıştır.

Elektroforez Tamponu (1 L distile su içinde)		Transfer Tamponu (2 L distile su içinde)	
Trisma Base	3.028 g	Trisma Base	6.055 g
Glisin	14.265 g	Glisin	28.53 g
SDS	1 g	Metanol	400 ml
Yıkama Tamponu (1 L distile su içinde pH=7.6)			
Trisma Base	4.84 g		
NaCl	16 g		
Tween20	2 ml		
%5'lik Bloklama Tamponu			
<i>Süt tozu ve TBS-Tween ile % 5'lik çözelti</i>			

Ardından kuyular elektroforez tamponu ile yıkanmış, tankın üst iki cebi ve alt havuzuna elektroforez tamponu doldurulduktan sonra sistem soğuk odaya yerleştirilmiştir. Yükleme tamponu ile karıştırılan proteinler 95°C'de 5 dakika kaynatılarak mikropipetle kuyulara yüklenmiştir. Yükleme yapıldıktan sonra dikey elektroforez sistemi kapak ile kapatılarak güç kaynağı çalıştırılmıştır. Önce düşük (120 V) akımla başlanmış; örneklerin yürümesi yığma jelinden ayırma jeline geçildiğinde akım arttırılmıştır (200 V). Yaklaşık 1,5 saat boyunca örneklerin jelde yürümesi beklenmiştir.



Elektroforez işlemiyle proteinler moleküler ağırlığına bağlı olarak poliakrilamid jel üzerinde moleküler büyüklüklerine göre yukarıdan aşağıya, yani eksiden artıya doğru hareket ederek ayrılırlar. Proteinleri western blot işlemi ile ayırt edebilmek için ilk kuyuya molekül ağırlığına göre farklı renkte bantlar oluşmasını sağlayan *marker* (şekil 1) konulmaktadır.

Ortalama 2 saat olan yürütme süresi bittikten sonra sonlandırılmış iki cam jele zarar vermeden gevşetilmiş ve jel parçalanmamasına özen gösterilerek çıkartılmıştır.

Yığma jeli kesilerek atıldıktan sonra transfer işlemi için yürütme jeli kaset içerisinde filtre kağıtları arasına membran ve jel tam olarak karşı karşıya gelecek şekilde yerleştirilerek hazırlanmıştır. Tank manyetik karıştırıcı üzerinde içinde soğuk odaya kurularak devamlı karıştırma başlatılıp; akım 300 miliamper olarak ayarlanarak 2 saat süren transfer işlemi yapılmıştır.

Transfer tamamlandıktan sonra yıkama tamponu içinde jel ve membran birbirinden ayrıldıktan sonra membran TBS-Tween ile çalkalayıcıda 5'er dakika süreyle 3 kez yıkanmıştır. Bir saat süreyle bloklama tamponunda bekletilmiş, tekrar TBS-Tween ile çalkalayıcıda 5'er dakika süreyle 3 kez yıkanmıştır.

Sonrasında membrana primer antikolar eklenerek çalkalayıcıda soğuk odada gece boyunca enkübe edilmiştir. Primer antikordan temizleme işlemi membranı TBS-Tween ile çalkalayıcıda 5'er dakika süreyle 3 kez yıkamak suretiyle yapılmıştır.

Bu çalışmada her bir örnekten her bir deney için iki kez elektroforez yapılmış; ilk elektroforez işlemiyle moleküler ağırlığı 130 kDa olan iNOS ve 69 kDa olan COX-2 proteinleri ile bunları

örnekler arasında karşılıklı değerlendirebilmek için β -aktin (Molekül ağırlığı: 42 kDa) proteinlerinin analizi yapılmıştır.

Poliklonal tavşan iNOS antikorunu 1:1000 oranında, poliklonal COX antikorunu önce 1:1000, oldukça kalın ve yoğun bantların meydana gelmesi üzerine daha sonra seyreltilerek 1:2000 ve 1:3000 oranında yüklenmiştir. Optimal sonuçların 1:2000 yoğunluğuyla elde edilmesi üzerine sonraki deneylere 1:2000 yoğunluğunda devam edilmiştir. Monoklonal fare β -aktin antikorunu 1:20000 oranında kullanılmıştır.

İkinci elektroforez işleminde ise fosforile FAK (Molekül ağırlığı: 125 kDa) ardından kazıma yapıldıktan sonra total FAK ve yine karşılıklı değerlendirmeyi sağlayabilmek amacıyla β -aktin analizleri yapılmıştır.

Fosforile FAK antikorunu olarak hem FAK için majör otofosforilasyon noktası olması, hem de migrasyon gibi birçok yolak için bilinen temel fosforilasyon noktası olması sebebiyle tirozin 397 fosforile FAK proteinine karşı antikorlar kullanılmıştır.

Tavşan poliklonal FAK ve fosfo FAK antikorları 1:1000 oranında kullanılmıştır.

Sekonder antikorları eklemek için bloklama tamponu içinde çözüldükten sonra membran ile 1 saat oda sıcaklığında enkübe edilmiştir.

HRP ("*horseradish*" yabanturbu peroksidazı) ile konjuge, primer antikoruna göre fare ya da tavşan sekonder antikorları 1:1000 oranında kullanılmıştır.

Sonrasında tekrar TBS-Tween ile çalkalayıcıda 5'er dakika süreyle 3 kez yıkılarak membran sekonder antikorlardan temizlenmiştir.

Görüntüleme için membrana uygun boyutta fotoğraf filmi karanlık odada kesilmiş, yıkama tamponu içinde bulunan membran cam üzerine bütün olacak şekilde yerleştirilerek üzerine 1.5 mL ECL dökülmüştür. 5 dakika karanlıkta bekletilerek ışımalar takip edilmiştir. Kaset içindeki naylon poşet içine aynı düzende yerleştirilmiş, poşetin diğer yaprağı membran üzerine kapatılmıştır. Kasetin kapağı kilitleyerek membran filme basılmıştır. Ardından önce

geliştirici çözümlerde, çeşme suyundan geçirilmesinin ardından sabitleyici çözümlerde bekletilerek film elde edilmiştir. Böylelikle filmler üzerindeki bantlar görüntülenerek değerlendirilmiştir.

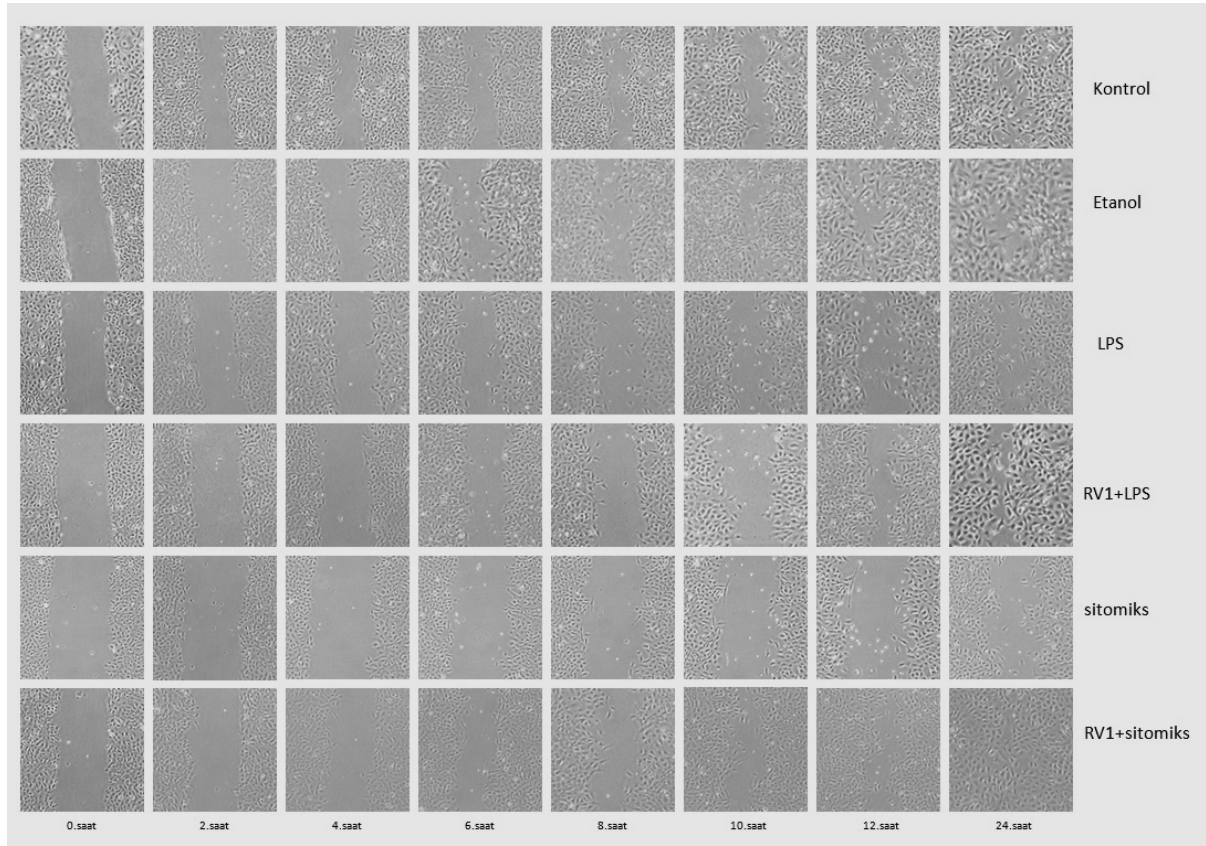
3.5. Verilerin Analizi

Migrasyon fotoğrafları National Institute of Health Image J programında değerlendirilerek kantitatif ölçümleri yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizi ise Statistical Package For Social Sciences (SPSS) 11.0 paket programında gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirme tekrarlayan ölçümler ANOVA analizi ile yapılmıştır. Gruplar arası farklılıklar ve farklılıkların kaynağı Scheffe, LSD ve Bonferroni posthoc testleriyle de doğrulanmıştır.

4. Bulgular

4.1. Migrasyon deneylerinin sonuçları

Hücre kültürü ortamında deneysel nekrotizan enterokolit modeli oluşturmak amacıyla hücreler lipopolisakkarit veya sitokin karışımlarıyla muamele edilmiş, daha önce başka çalışmalarla da gösterilmiş olan hücre restitüsyonu üzerine ters etkilerini [28,36] göstermek amacıyla sıyrık migrasyon analizi yöntemi kullanılmış, konfluente yakın çoğaltılmış IEC-6 hücrelerinin oluşturulmuş yarayı tamir edebilme kapasiteleri 0,2,4,6,8,12 ve 24. saatte fotoğraflanıp defektif alan ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Ardından resveratrolün nekrotizan enterokolitten korunmada olası etkilerinden birinin bozulmuş olan restitüsyon fonksiyonunu düzeltmek olduğu hipotezi kurularak resveratrolün deney modelindeki etkileri gözlemlenmiştir. Ön çalışma olarak çözücü olarak DMSO ya da etanol kullanılarak etkileri kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.



Şekil 1 Yara kapanma izleminde gruplar arası farklılığı gösteren örnek fotoğraflar

Deney sonuçları aşağıdaki gibidir.

Saat	Kontrol	DMSO	Etanol	dRV 1+LPS	eRV 1+LPS
0	0	0	0	0	0
2	7,752	9,63	8,87	11,76	12,72
4	18,16	15,62	20,94	20,55	21,99
6	26,99	29,91	32	32,56	34,70
8	32,83	31,34	37,44	37,44	41,71
10	43,97	44,21	47,34	52,72	48,07
12	53,81	53,62	56,59	59,04	58,84
24	87,48	78,56	85,01	81,76	86,96
p*		0,307	0,607	0,685	1,000

Tablo 1 “Kontrol”, “yalnız DMSO”, “yalnız etanol”, “DMSO içinde çözülmüş 1 µM/L resveratrol+LPS”, “etanol içinde çözülmüş 1 µM/L resveratrol+LPS” grupları için yara kapanma yüzdeleri ortalamaları (RV=resveratrol, dRV DMSO ile çözülmüş, eRV etanolla çözülmüş) (tabloda kontrol grubuyla karşılaştırmalı LSD posthoc analizi p değerleri verilmiştir)

Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark gösterilememekle birlikte etanol içeren grupların kontrole daha yakın değerler göstermesi sebebiyle ilerleyen deneylerde resveratrolün etanol içinde çözülmesi kararlaştırılmıştır. Bu noktadan sonraki tüm deneylerde resveratrol için çözücü olarak etanol kullanıldığı için ayrı olarak belirtilmemiştir.

Saat	Kontrol	Etanol	RV 0.1	RV 0.5	RV 1	RV 5	RV 10
0	0	0	0	0	0	0	0
2	7,75	8,87	12,23	9,023	13,81	8,7867	5,08
4	18,16	20,93	21,48	15,24	27,34	17,4	17,00
6	26,99	32	31,88	24,56	36,17	27,39	27,35
8	32,83	37,44	51,14	28,52	48,82	32,70	31,44
10	43,97	47,34	46,55	36,21	54,80	38,98	41,09
12	53,80	56,59	50,64	41,47	62,61	54,61	54,74
24	87,48	85	72,68	75,68	86,90	81,49	80,55
p*		0,607	0,659	0,302	0,135	0,802	0,659

Tablo 2 "Kontrol", "çözücü" ve "yalnızca resveratrol" (0.1, 0.5, 1, 5, 10 µM/L dozlarında) grupları için yara kapanma yüzdeleri ortalamaları (RV=resveratrol) (tabloda kontrol grubuyla karşılaştırmalı LSD posthoc analizi p değerleri verilmiştir)

Kontrol grubuyla, etanollü çözücü grubu ve değişik dozlarda resveratrol dozları grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamış, böylece resveratrolün, deneylerde kullanılan her bir dozda, tek başına IEC-6 hücrelerinin migrasyon fonksiyonu üzerine pozitif veyahut negatif yönde herhangi etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Saat	Kontrol	LPS	RV 0.1+LPS	RV 0.5+LPS	RV 1+LPS	RV 5+LPS	RV 10+LPS
0	0	0	0	0	0	0	0
2	7,75	5,46	9,318	7,68	12,72	9,45	3,16
4	18,16	14,9	13,15	19,40	22	17,48	10,64
6	26,99	20,11	18,02	28,23	34,70	26,55	19,55
8	32,83	23,50	21,93	36,88	41,71	32,90	28,55
10	43,97	28,81	24,65	49,96	48,07	43,13	36,46
12	53,81	31,64	28,92	57,26	58,84	52,64	41,30
24	87,48	53,64	41,06	84,21	86,96	75,90	58,29
p*		0,005	0,001	0,693	0,265	0,685	0,030
p2*	0,05		0,513	0,003	0,000	0,018	0,534

Tablo 3 "kontrol", "yalnızca LPS" ve "resveratrol+LPS" (0.1, 0.5, 1, 5, 10 µM/L dozlarında) grupları için yara kapanma yüzdeleri ortalamaları; (RV=resveratrol) (tabloda kontrol grubuyla karşılaştırmalı LSD posthoc analizi için p değerleri ve LPS grubuyla karşılaştırmalı için p2 değerleri verilmiştir)

Kontrol grubuyla LPS grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmıştır. LPS, IEC-6 hücrelerinin migrasyon fonksiyonunu belirgin bozmuştur. Bununla birlikte LPS öncesinde resveratrol 0,5/1/5 µM/L dozlarında uygulanıldığında LPS'nin migrasyonu bozucu etkisini engellemiş, bu gruplarla LPS grubu arasında fark saptanırken kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır. Resveratrol 0,1/10 µM/L dozlarında uygulandığında ise benzer cevap gözlenmemiş; bu gruplarla kontrol grubu arasında fark saptanırken; LPS grubuyla fark saptanmamıştır.

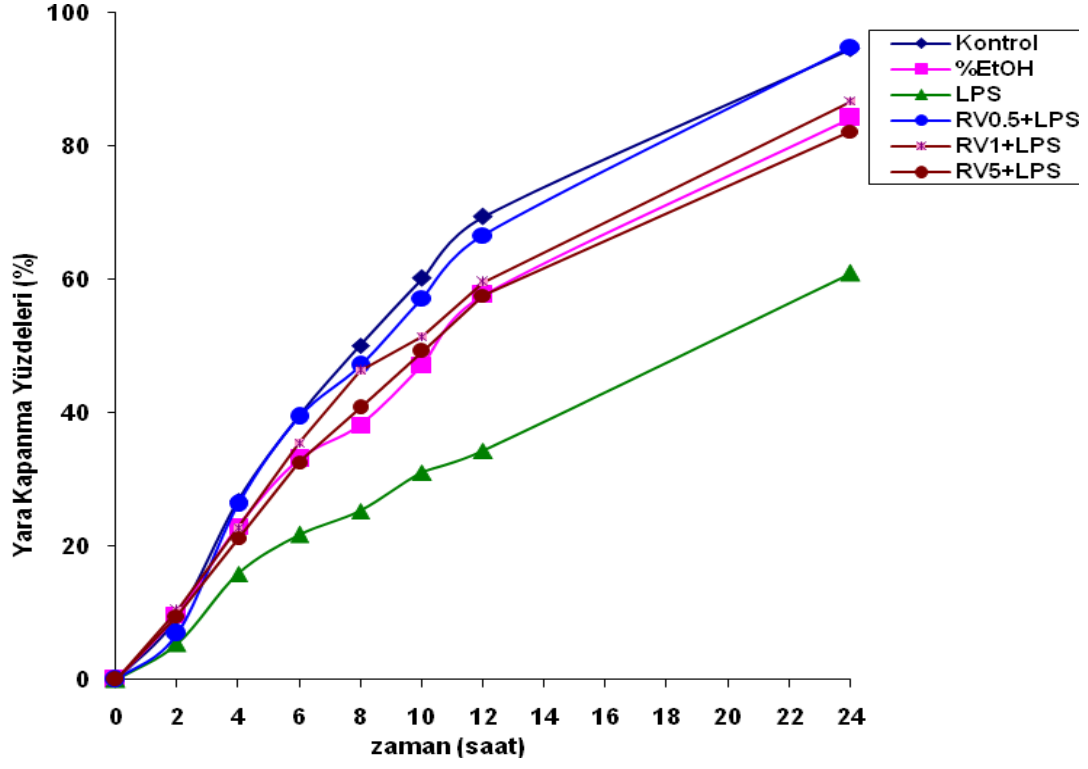
LPS gruplarıyla yapılan deneylerde resveratrol 0,1/0,5/1/5/10 µM/L dozlarında uygulanmış, doz cevabına göre etkin doz aralığı 0,5-5 µM/L olarak belirlenerek sitomiks gruplarında 0,5/1/5 µM/L dozlarında uygulanılmıştır.

Saat	Kontrol	Cyto	RV 0.5+sitomiks	RV 1+sitomiks	RV 5+sitomiks
0	0	0	0	0	0
2	7,75	5,41	8,52	11,14	8,72
4	18,16	10,57	17,46	19,37	22,28
6	26,99	13,47	27,29	29,68	29,52
8	32,83	18,57	35,48	37,76	37,31
10	43,97	21,18	40,36	48,00	47,59
12	53,81	25,69	55,32	54,94	55,95
24	87,48	35,18	85,49	81,76	77,61
p*		0,000	0,972	0,709	0,798
p2*	0,000		0,000	0,000	0,000

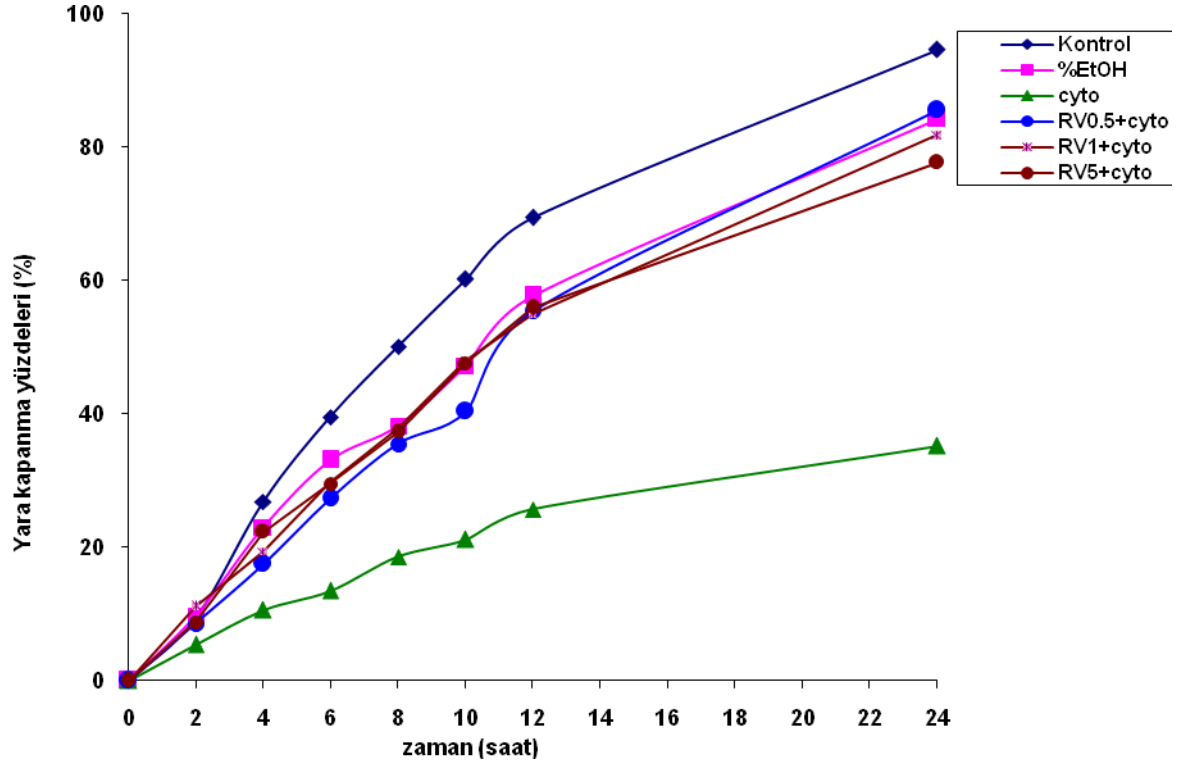
Tablo 4 "Kontrol", "yalnızca sitomiks", ve "resveratrol+sitomiks" (0.5, 1, 5 µM/L dozlarında) grupları için yara kapanma yüzdeleri ortalamaları (RV=resveratrol) (tabloda kontrol grubuyla karşılaştırmalı LSD posthoc analizi p değerleri ve sitomiks grubuyla karşılaştırmalı p2 değerleri verilmiştir)

Kontrol grubuyla sitomiks grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmıştır. Sitomiks, LPS'den daha belirgin bir şekilde IEC-6 hücrelerinin migrasyon fonksiyonunu belirgin bozmuştur. Bununla birlikte resveratrol 0,5/1/5 µM/L dozlarında uygulandığında sitomiks migrasyonu bozucu etkisini engellemiş, bu gruplarla sitomiks grubu arasında fark saptanırken kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır.

Etkinin kaçınıcı saatte ortaya çıktığının belirlenmesi amacıyla gruplar arası değişiklikler toplu değerlendirilmenin yanı sıra saatlere göre de değerlendirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farkın kaçınıcı saatte belirginleştiği ortaya konulmuştur.



Şekil 2 LPS grupları için yara kapanma yüzdelerinin zamana göre değişimi



Şekil 3 Sitomiks grupları için yara kapanma yüzdelерinin zamana göre değışimi

LPS ve sitomiks grupları için, 6. saate kadar, 12. saate kadar ve 24. saate kadar meydana gelen değışimlerin karşılaştırmalı istatistiksel analizi aşağıdadır:

Saat	Kontrol	LPS	RV 0.1+LPS	RV 0.5+LPS	RV 1+LPS	RV 5+LPS	RV 10+LPS
6	p*	0,241	0,271	0,829	0,125	0,929	0,088
	p2*	0,241	0,996	0,189	0,010	0,248	0,526
12	p*	0,031	0,021	0,567	0,194	0,960	0,122
	p2*	0,031	0,761	0,011	0,001	0,045	0,582
24	p*	0,005	0,001	0,693	0,265	0,685	0,030
	p2*	0,05	0,513	0,003	0,000	0,018	0,534

Tablo 5 LPS grupları için, 6. saate kadar, 12. saate kadar ve 24. saate kadar meydana gelen değışimlerin karşılaştırmalı istatistiksel analizi (tabloda kontrol grubuyla karşılaştırmalı LSD posthoc analizi p değeri ve sitomiks grubuyla karşılaştırmalı p2 değeri verilmiştir)

Saat		Kontrol	cyto	RV 0.5+cyto	RV 1+cyto	RV 5+cyto
6	p*		0,030	0,971	0,476	0,457
	p2*	0,030		0,028	0,006	0,006
12	p*		0,003	0,973	0,523	0,512
	p2*	0,003		0,003	0,003	0,001
24	p*		0,000	0,972	0,709	0,798
	p2*	0,000		0,000	0,000	0,000

Tablo 6 Sitomiks grupları için, 6. saate kadar, 12. saate kadar ve 24. saate kadar meydana gelen değişimlerin karşılaştırmalı istatistiksel analizi (tabloda kontrol grubuyla karşılaştırmalı LSD posthoc analizi p değerleri ve sitomiks grubuyla karşılaştırmalı p2 değerleri verilmiştir)

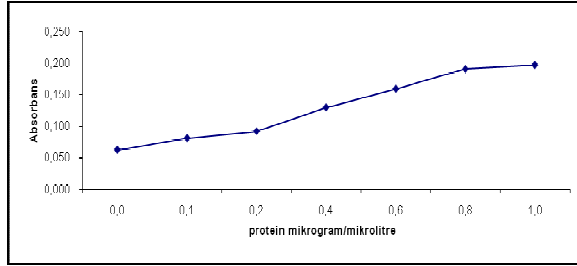
Bu sonuçlar değerlendirildiğinde LPS deneylerinde belirgin farkın ancak 12. saatte ortaya çıkması sebebiyle analiz için protein toplanma saati olarak 12. saat belirlenmiştir.

4.2. Protein Miktarları

Migrasyon deneylerinde oluşturulan gruplar aynı koşullar altında oluşturularak protein homojenizasyonu yapılmış, Western Blot analizi ile enzim düzeylerini araştırmak amacıyla öncelikle örneklerdeki protein miktarı protein homojenizasyonu sonrası Lowry analizi ile ortaya konulmuştur.

Örnekler öncelikle 1:1 sulandırılmış, elde edilen değerlerin standart örnek aralığının dışında kalması üzerine sulandırma artırılarak sırasıyla 1:2, 1:3, 1:4 oranında sulandırılarak ölçümler tekrarlanmıştır. Standart aralığı dahilinde ölçüm değerlerine 1:4 oranında sulandırılarak ulaşıldığı görülerek ölçümlere 1:4 oranında sulandırılarak devam edilmiştir. Elde edilen veriler aşağıdaki gibidir.

Analiz 1:

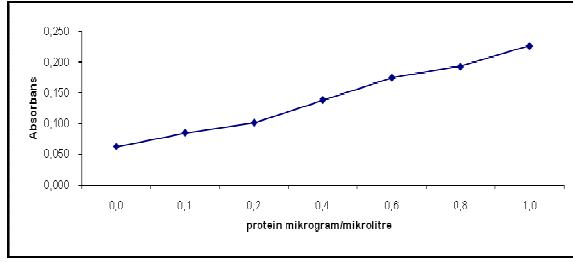


BSA (mg/ml= μ g/ μ l)	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans
0,0	0,062	0,062	0,062
0,1	0,08	0,081	0,081
0,2	0,093	0,09	0,092
0,4	0,129	0,13	0,130
0,6	0,159	0,159	0,159
0,8	0,194	0,187	0,191
1,0	0,192	0,202	0,197

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans	Protein (mg/ml= μ g/ μ l)	Sulandırma (x5)	40 μ g örn yükleme için μ l
K1	0,173	0,179	0,176	0,757	3,787	10,56
K2	0,163	0,171	0,167	0,696	3,479	11,50
E1	0,168	0,171	0,170	0,713	3,564	11,22
R05-1	0,164	0,162	0,163	0,668	3,342	11,97
R1-1	0,183	0,177	0,180	0,785	3,923	10,20
R5-1	0,183	0,186	0,185	0,815	4,077	9,81
L1	0,201	0,189	0,195	0,887	4,436	9,02
R05L-1	0,152	0,143	0,148	0,562	2,812	14,22
R1L-1	0,156	0,162	0,159	0,641	3,205	12,48
R5L-1	0,189	0,192	0,191	0,856	4,282	9,34

Tablo 7: "Kontrol", "Etanol", "Yalnız resveratrol", "Yalnız LPS", "Resveratrol+LPS" gruplarından örnekler için Lowry analiz sonuçları

Analiz 2:

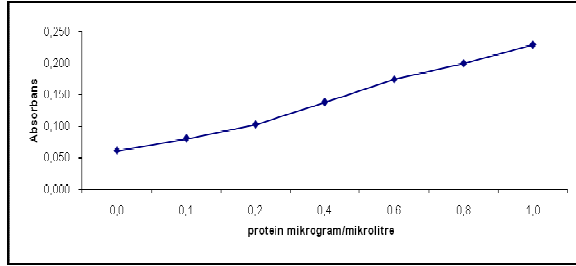


BSA (mg/ml= μ g/ μ l)	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans
0,0	0,062	0,062	0,062
0,1	0,084	0,085	0,085
0,2	0,100	0,102	0,101
0,4	0,139	0,137	0,138
0,6	0,174	0,175	0,175
0,8	0,190	0,195	0,193
1,0	0,229	0,223	0,226

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans	Protein (mg/ml= μ g/ μ l)	Sulandırma (x5)	40 μ g örn yükleme için μ l
K3	0,211	0,198	0,205	0,840	4,200	9,52
E2	0,210	0,209	0,210	0,871	4,354	9,19
L2	0,207	0,196	0,202	0,822	4,108	9,74
L3	0,243	0,241	0,242	1,070	5,351	7,48
R05-2	0,189	0,196	0,193	0,766	3,832	10,44
R1-2	0,205	0,197	0,201	0,819	4,093	9,77
R5-2	0,223	0,225	0,224	0,960	4,799	8,34
R05L-2	0,223	0,211	0,217	0,917	4,584	8,73
R1L-2	0,222	0,213	0,218	0,920	4,599	8,70
R5L-2	0,197	0,195	0,196	0,788	3,939	10,15

Tablo 8: "Kontrol", "Etanol", "Yalnız resveratrol", "Yalnız LPS", "Resveratrol+LPS" gruplarından örnekler için Lowry analiz sonuçları

Analiz 3:

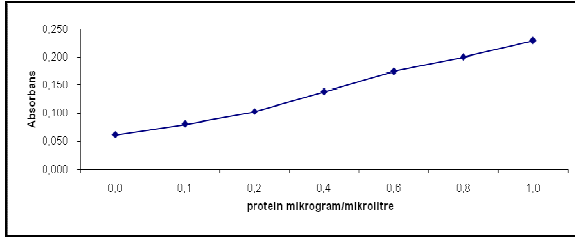


BSA (mg/ml= μ g/ μ l)	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans
0,0	0,061	0,061	0,061
0,1	0,083	0,078	0,081
0,2	0,103	0,102	0,103
0,4	0,137	0,139	0,138
0,6	0,175	0,173	0,174
0,8	0,203	0,196	0,200
1,0	0,229	0,229	0,229

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans	Protein (mg/ml= μ g/ μ l)	Sulandırma (x5)	40 μ g örn yükleme için μ l
K4	0,185	0,186	0,186	0,708	3,540	11,30
L4	0,267	0,132	0,200	0,791	3,954	10,12
R05L-3	0,182	0,194	0,200	0,791	3,954	10,12
R1L-3	0,207	0,195	0,188	0,723	3,614	11,07
R5L-3	0,185	0,126	0,201	0,800	3,999	10,00

Tablo 9: "Kontrol", "Yalnız LPS", "Resveratrol+LPS" gruplarından örnekler için Lowry analiz sonuçları

Analiz 4:

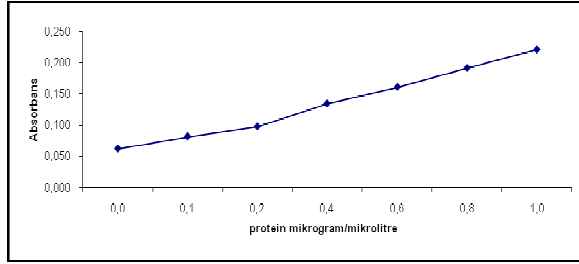


BSA (mg/ml= μ g/ μ l)	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans
0,0	0,083	0,078	0,083
0,1	0,103	0,102	0,103
0,2	0,137	0,139	0,137
0,4	0,175	0,173	0,175
0,6	0,203	0,196	0,203
0,8	0,229	0,229	0,229
1,0	0,083	0,078	0,083

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans	Protein (mg/ml= μ g/ μ l)	Sulandırma (x5)	40 μ g örn yükleme için μ l
K5	0,163	0,164	0,164	0,578	2,890	13,84
S1	0,206	0,193	0,200	0,791	3,954	10,12
R05S-1	0,180	0,176	0,178	0,664	3,319	12,05
R1S-1	0,183	0,178	0,181	0,679	3,393	11,79
R5S-1	0,183	0,170	0,177	0,655	3,274	12,22

Tablo 10: "Kontrol", "Yalnız sitomiks", "Resveratrol+sitomiks" gruplarından örnekler için Lowry analiz sonuçları

Analiz 5:



BSA (mg/ml= μ g/ μ l)	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans
0,0	0,062	0,062	0,062
0,1	0,081	0,082	0,082
0,2	0,096	0,099	0,098
0,4	0,132	0,137	0,135
0,6	0,165	0,157	0,161
0,8	0,191	0,192	0,192
1,0	0,226	0,216	0,221

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ortalama Absorbans	Protein (mg/ml= μ g/ μ l)	Sulandırma (x5)	40 μ g örn yükleme için μ l
K5	0,156	0,160	0,158	0,585	2,924	13,68
L4	0,181	0,170	0,176	0,695	3,477	11,50
R05L-3	0,177	0,175	0,176	0,699	3,493	11,45
R1L-3	0,195	0,184	0,190	0,784	3,920	10,20
R5L-3	0,204	0,192	0,198	0,838	4,189	9,55
S2	0,165	0,185	0,175	0,692	3,462	11,56
S3	0,175	0,177	0,176	0,699	3,493	11,45
R05S-2	0,166	0,157	0,162	0,607	3,035	13,18
R05S-3	0,178	0,188	0,183	0,743	3,715	10,77
R1S-2	0,172	0,160	0,166	0,635	3,177	12,59
R1S-3	0,202	0,179	0,191	0,790	3,952	10,12
R5S-2	0,172	0,166	0,169	0,654	3,272	12,23
R5S-3	0,171	0,166	0,169	0,651	3,256	12,29

Tablo 11: "Kontrol", "Yalnız sitomiks", "Yalnız LPS", "Resveratrol+LPS", "Resveratrol+sitomiks" gruplarından örnekler için Lowry analiz sonuçları

4.3. Western Blot Analiz Sonuçları

Migrasyon deneylerinde oluşturulan grupların aynı koşullar altında oluşturularak protein homojenizasyonu yapılmasının ve Lowry analizi ile örneklerdeki protein miktarlarının ölçülmesinin ardından, örneklerdeki protein miktarlarına uygun yüklemeler yapılarak jel elektroforezi ile western blot analizi yapılmış, oluşan bantlar karşılaştırmalı değerlendirilerek kontrol grupları, LPS ile uyarılmış gruplar ve sitomiksle uyarılmış gruplar için enzim miktarlarındaki değişimler incelenmiştir.

Enzim düzeylerini ortaya koyabilmek için her bir deneyde her bir gruba iki kez elektroforez yapılmış, ilk elektroforez işlemiyle moleküler ağırlığı 130 kDa olan iNOS ve 69 kDa olan COX-2 proteinleri ile bunları örnekler arasında karşılıklı değerlendirebilmek için β -aktin (Molekül ağırlığı: 42 kDa) proteinlerinin analizi yapılmıştır. İkinci elektroforez işleminde ise fosforile FAK (Molekül ağırlığı: 125 kDa) ardından kazıma yapıldıktan sonra total FAK ve yine gruplar arasında karşılıklı değerlendirmeyi sağlayabilmek amacıyla β -aktin analizleri yapılmıştır.

Öncelikle, resveratrolün herhangi uyarı olmaksızın hücrede meydana getirebileceği değişiklikleri ortaya koyabilmek amacıyla yalnızca resveratrol ile muamele edilmiş örneklerle western blot analizi yapılmıştır.

iNOS bantları



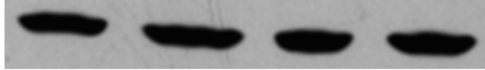
Kontrol RV0.5 RV1 RV5

COX bantları



Kontrol RV0.5 RV1 RV5

β -aktin bantları



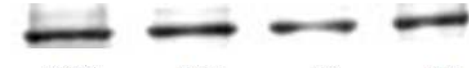
Kontrol RV0.5 RV1 RV5

pFAK bantları



Kontrol RV0.5 RV1 RV5

FAK bantları

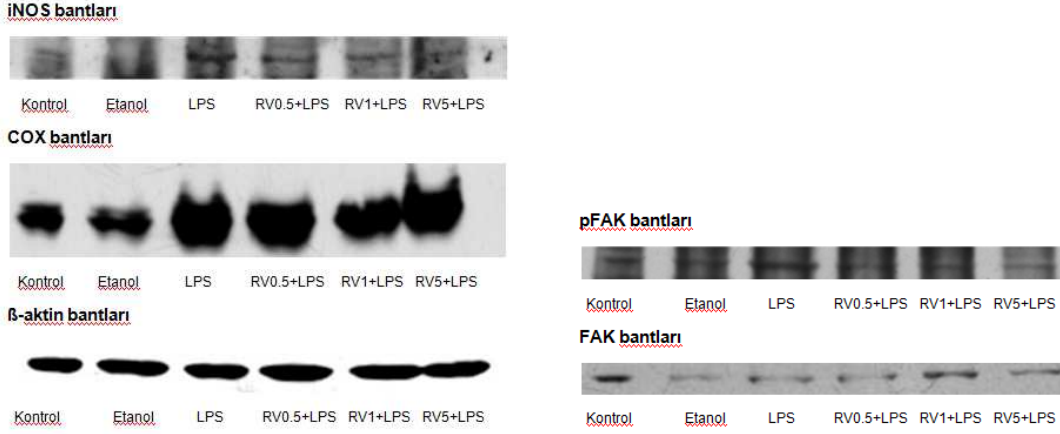


Kontrol RV0.5 RV1 RV5

Şekil 3: “Kontrol”, “0.5 μ M/L resveratrol”, “1 μ M/L resveratrol”, “5 μ M/L resveratrol” grupları için örnek western blot görüntüleri

Şekil 3’de “kontrol”, “0,5 μ M/L resveratrol”, “1 μ M/L resveratrol”, “5 μ M/L resveratrol” gruplarında yapılan analizde, 130 kDa hizasında belirginleşen iNOS bantları, 69 kDa hizasında belirginleşen COX bantları, 42 kDa hizasında belirginleşen β -aktin bantları, 125 kDa hizasında belirginleşen pFAK ve FAK bantları görülmektedir. Migrasyon deneylerinde fonksiyonel etkisi gösterilmiş olan 0,5/1/5 μ M/L dozlarında resveratrol ile işlem görmüş hücrelerde β -aktin ile karşılaştırmalı incelenen iNOS ve COX-2 düzeylerinde kontrol gruplarına kıyasla belirgin farklılık gözlenmemiştir. Ardından deney pFAK ve FAK düzeyleri için de tekrarlanmış ve gruplar arasında belirgin fark gözlenmemiş, bant profilleri her dört grup için de benzer özellikler göstermiştir.

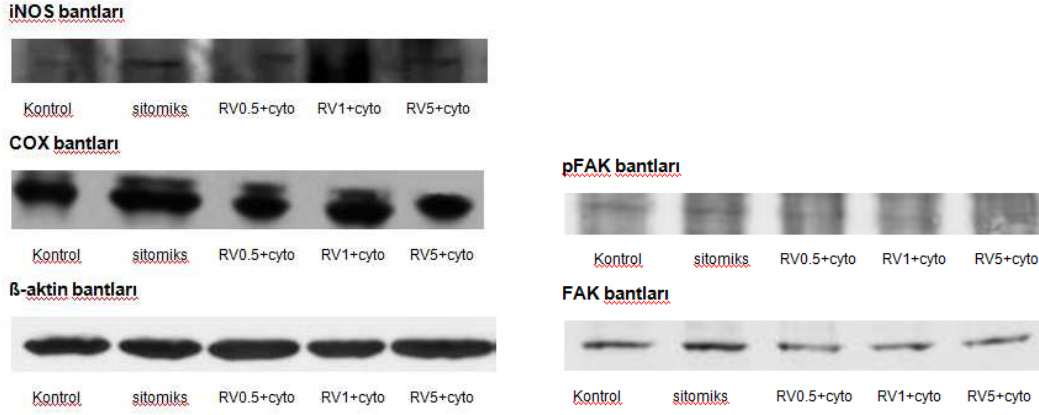
Ardından aynı resveratrol dozları ile muamelenin ardından hücreler LPS ile uyarılmış ve enzim düzeyleri karşılaştırmalı incelenmiştir.



Şekil 4: “Kontrol”, “çözücü”, “yalnızca LPS”, “0,5 µM/L resveratrol+LPS”, “1 µM/L resveratrol+LPS”, “5 µM/L resveratrol+LPS” grupları için örnek western blot görüntüleri

Şekil 4’de “kontrol”, “etanol”, “0,5 µM/L resveratrol+LPS”, “1 µM/L resveratrol+LPS”, “5 µM/L resveratrol+LPS” gruplarında yapılan analizde, 130 kDa hizasında belirginleşen iNOS bantları, 69 kDa hizasında belirginleşen COX bantları, 42 kDa hizasında belirginleşen β-aktin bantları, 125 kDa hizasında belirginleşen pFAK ve FAK bantları görülmektedir. iNOS bantları kontrol ve etanol gruplarında benzer şekilde silik oluşmuş, LPS ile uyarılan hücrelerde ise iNOS bandında belirginleşme gözlemlenmiştir. Resveratrolü takiben LPS uygulanan gruplarda ise iNOS bandındaki kalınlaşma LPS gruplarına göre daha az belirgin olarak izlenmiştir. Tekrarlayan analizler ile benzer cevap elde edilmiş, farklı resveratrol dozları için doz/cevap ilişkisi lehine yorumlanabilecek belirgin fark gözlenmemiştir. COX bantları da iNOS bantlarına benzer şekilde kontrol ve etanol gruplarında daha ince oluşmuştur. COX bantlarında LPS ile uyarı sonrası çok belirgin kalınlaşma gözlemlenmiştir. Öncesinde resveratrol uygulanmış gruplarda kontrol gruplarındaki düzeye inmemekle birlikte COX bantlarının daha ince oluştuğu gözlemlenmiştir. Benzer cevap her üç resveratrol dozuyla da elde edilmiştir. FAK bantları gruplar arasında belirgin değişiklik göstermemekle birlikte pFAK bantları LPS uyarısıyla kalınlaşmış, öncesinde resveratrol uygulanmış gruplarda ise kontrol gruplarına benzer daha ince bantlar oluşmuştur.

Ardından, aynı resveratrol dozları ile muamelenin ardından hücreler sitokin karışımı ile uyarılmış ve enzim düzeyleri karşılaştırmalı incelenmiştir.



Şekil 5: “Kontrol”, “çözücü”, “yalnızca sitomiks”, “0.5 μ M/L resveratrol+sitomiks”, “1 μ M/L resveratrol+sitomiks”, “5 μ M/L resveratrol+sitomiks” grupları için örnek western blot görüntüleri

Şekil 5’de “kontrol”, “etanol”, “0,5 μ M/L resveratrol+sitomiks”, “1 μ M/L resveratrol+sitomiks”, “5 μ M/L resveratrol+sitomiks” gruplarında yapılan analizde, 130 kDa hizasında belirginleşen iNOS bantları, 69 kDa hizasında belirginleşen COX-2 bantları, 42 kDa hizasında belirginleşen β -aktin bantları, 125 kDa hizasında belirginleşen pFAK ve FAK bantları görülmektedir. iNOS bantları kontrol gruplarında benzer şekilde silik oluşmuş, sitokin karışımı ile yapılan uyarıyla hafif belirginleşme gözlenmiş ancak LPS uyarısıyla meydana gelen kadar belirgin farklılaşma gözlenmemiştir. Resveratrolü takiben sitokin karışımı uygulanan gruplarda da daha ince iNOS bantları gözlenmiştir. Tekrarlayan analizler ile benzer cevap elde edilmiş, farklı resveratrol dozları için doz/cevap ilişkisi lehine yorumlanabilecek belirgin fark gözlenmemiştir. COX-2 bantları da iNOS bantlarına benzer şekilde kontrol gruplarında daha ince oluşmuş, sitokin karışımı ile uyarı sonrası çok belirgin kalın bantlar elde edilmiştir. Öncesinde resveratrol uygulanmış gruplarda kontrol gruplarındaki düzeye inmemekle birlikte COX-2 bantlarının daha ince olduğu gözlemlenmiştir. Benzer cevap her üç resveratrol dozuyla da elde edilmiştir. FAK bantları gruplar arasında belirgin değişiklik göstermemekle birlikte pFAK bantları sitomiks uyarısıyla kalınlaşmış, öncesinde resveratrol uygulanmış gruplarda ise kontrol gruplarına benzer daha ince bantlar oluşmuştur.

Western blot analizleri değerlendirildiğinde hem LPS hem sitokin karışımı ile uyarıyı takiben enterositlerde indüklenebilir nitrik oksit sentetaz hem de siklooksijenaz-2 enzim düzeylerinde artma meydana geldiği, bu hücrelere öncesinde resveratrol uygulanmasının bu artışı engelleyebildiği söylenebilir.

Bunun yanında LPS ya da sitokin karışımı ile uyarıyı takiben hücrelerde total fokal adhezyon enzim düzeyleri değişmediği ancak tirozin 397 fosforile FAK düzeylerinin uyarıyla arttığı, öncesinde resveratrol uygulanmasının bu artışı engellediği gözlemlenmiştir.

5. Tartışma

Nekrotizan enterokolit konusunda bilgi birikimi giderek artmasına ve daha etkin tedavi stratejileri geliştirilmesine rağmen bunun yanında yenidoğan yoğun bakım merkezi standartlarının da yükselmesiyle daha düşük ağırlıklı bebekler yaşatılabilmekte, böylelikle hastalığın insidansı yüksek kalmaya devam etmektedir. Morbidite ve mortalitesi en iyi merkezlerde bile oldukça yüksek olduğundan ve patogenezi halen tam anlaşılamadığından birçok merkezde hastalığın fizyopatolojisi, tanı ve tedavisine ilişkin klinik ve deneysel çalışmalar yoğun olarak sürdürülmektedir. Bütün gelişmelere rağmen konuyla ilgili net bilgiler halen oldukça sınırlı olduğundan mevcut bilgi birikimine yapılacak her katkı prematüre bebeklerin bu fatal hastalığının anlaşılmasında önemli bir yapıtaşı olacaktır.

Kliniğimizde yürütülen bir hayvan deneyi çalışmasıyla potent bir antioksidan ve anti-inflamatuar olarak bilinen resveratrolün nekrotizan enterokolitten koruyucu etkileri olabileceği düşünülerek diyetetik suplementasyonunun rat nekrotizan enterokolit modelinde koruyucu etkisi gösterilmiştir [4].

Bu çalışmada ise, yolakların daha detaylı incelenmesi ve resveratrolün nekrotizan enterokolitten koruyucu etkisi ile bu etkilerin olası mekanizmalarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Olası etki mekanizmalarını ortaya koymak amacıyla hastalık patogenezinde çok sayıda çalışma ile ortaya konulmuş iki ana mekanizma olan “artmış inflamasyon cevabı” ve “bozulmuş restitüsyon” üzerine odaklanılmış ve deneyler resveratrolün birtakım enzim yolakları üzerine etki ederek olasılıkla hem aşırı inflamatuvar cevabı baskıladığı hem de bozulmuş olan restitüsyonu düzelttiği varsayımı üzerine şekillendirilmiştir. Bu amaçla enterosit hücre kültürü ile deneysel nekrotizan enterokolit modeli oluşturularak öncelikle fonksiyonel çalışma yapılmış, resveratrolün meydana gelen migrasyonda yavaşlama etkisini engellediği gösterilmiştir. Ardından migrasyon deneylerinde oluşturulan gruplar aynı şartlar

altında oluşturularak iNOS, COX-2, FAK ve fosfoFAK enzim düzeyleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Tüm dünyada, nekrotizan enterokoliti anlamaya yönelik hem klinik hem deneysel çalışmalar sürmektedir. Çoğunlukla prospektif veya retrospektif hasta gözlemine dayalı olan klinik çalışmalar hastalık risk faktörleri ve izlemi konusunda önemli ipuçlarını sağlasa da klinik araştırmaların etik sorunları deneysel araştırmaları etyopatogenezi anlamada temel araç haline getirmektedir.

Hücre kültürü çalışmaları, hem etik yönden sıkıntıları ortadan kaldırmakta, hem de araştırmacının koşulları daha kontrollü değiştirebilmesini ve çeşitli değişkenlerin sonuçlarını diğer faktörlerin etkisinden daha bağımsız görmesini sağlamaktadır. Temel dezavantajı ise, in vitro yapılmaları sebebiyle benzer sonuçların in vivo ortamda da aynı şekilde gerçekleştiğinin varsayımdan öteye gidememesidir. Bu çalışmada ise daha önce kliniğimizde yürütülen bir hayvan deneyi çalışmasıyla rat nekrotizan enterokolit modelinde etkisi gösterilmiş olan resveratrolün olası etki mekanizmalarının ortaya konulması amaçlanmıştır. Dolayısıyla in vivo etkisi bilinen bir değişkenin olası etki mekanizmalarını ortaya koymak amacıyla yapılmış olan bu çalışma için hücre kültürü çalışmalarının hem etik sorunlara yol açmadan çok sayıda tekrarlayan deneyler yapmayı, hem de çeşitli faktörleri kontrollü değiştirerek olası enzim yollarını ayırtırmayı sağlaması sebebiyle ideal yöntem olacağı düşünülmüştür.

In vitro ortamda meydana getirilmiş olmasının yanında, tek katman hücre kültürü çalışmalarının bir diğer dezavantajı yalnızca enterositlerden oluşması ve dolayısıyla hastalık sürecinde önemli yerleri olduğu bilinen inflamatuvar hücreleri barındırmaması sebebiyle nekrotizan enterokolitteki mekanizmaları yeterince taklit edememesidir. Bununla birlikte literatürdeki kimi yazıların [39] aksine, çalışmamızda da IEC-6 hücrelerinin endotoksine duyarlı olduğu ve dolayısıyla başka diğer çalışmalarda öne sürüldüğü gibi [40] nekrotizan

enterokolit gibi bağırsak inflamasyonu ile giden hastalıklarda yalnız inflamatuvar hücrelerin etkisiyle değil otokrin uyarıyla da abartılı immün cevabın meydana geldiği doğrulanmıştır.

Çalışmada IEC-6 hücre serisi kullanılmıştır. IEC-6 hücre serisi *Rattus norvegicus* türüne ait normal intestinal bir hücre serisidir. Çalışmada bu hücreler hem insan intestinal epitel hücrelerine fonksiyonel benzerlikleri sebebiyle çoğu çalışmada tercih edilmeleri, hem de proliferasyon hızlarının çalışma yöntemine uygunluğu dolayısıyla tercih edilmiştir. Bu hücreler için ortalama ikiye katlanma zamanı üretici firma tarafından ortalama 50 saat olarak bildirilmiş, buna ek olarak ön çalışma yapılarak hücrelerin ikiye katlanma zamanı ortalama 35 saat olarak gözlemlenmiştir. Bu nedenle planlanmış olan 24 saat sürecek sıyrık migrasyon analizi çalışmasında hücrelerin çoğalarak değil, migrasyon yoluyla yarayı onardığı varsayımında bulunulabilmiştir.

Resveratrol ile enterosit hücre kültürüyle yapılmış benzer çalışma yoktur. Dolayısıyla çalışmanın yapılandırılmasında resveratrolün dozu ve ön tedavi olarak uygulanma süresine karar verilmesi şeklinde iki temel sorunla karşılaşılmıştır.

Farklı çalışmalarda farklı etkilerine dair çok geniş bir doz aralığı (0.01 $\mu\text{M/L}$ -100 $\mu\text{M/L}$) bulunmaktadır. 0.01 $\mu\text{M/L}$ gibi çok düşük dozlar ile bile platelet agregasyonu üzerine inhibisyona sebep olduğu, 100 $\mu\text{M/L}$ ve üzeri dozlarda ise proliferasyonu durdurduğu ve hatta apoptozu indüklediği yönünde çalışmalar bulunmaktadır [33,34,35,36,41,42]. Nekrotizan enterokolite karşı sitoprotektif, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinden yararlanılması planlanan resveratrol bu sebeple çalışmada düşük dozlarda kullanılmış, öncelikle 0,1/0,5/1/5/10 $\mu\text{M/L}$ dozlarında uygulanmış, doz cevabına göre (sayfa..., sonuçlar) etkin doz aralığı 0,5-5 $\mu\text{M/L}$ olarak belirlenerek western blot deneyleri 0,5/1/5 $\mu\text{M/L}$ dozlarında uygulanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında resveratrole maruz kalma süreleri de çalışmadan çalışmaya farklılık göstermektedir. Literatürde, 2 dakika ila 2 gün gibi geniş bir zaman aralığında

inkübasyon süreleri bulunmaktadır [34,35]. Enterositlerle benzer çalışma bulunmadığından, davranış açısından benzerlik göstermesi nedeni ile bir epidermal hücre hattıyla (JB6C141) yapılmış ve benzer bir mekanizma ile yapılandırılmış (sitokin ile indüklenme) bir çalışmada da 20 dakika ile etkinliğin gösterilmesi [43], birçok monosit-makrofaj gibi enterositlere benzer hızlı hücresel döngüye sahip hücreyle yapılan çalışmalarda da 15-60 dakikalık ön tedavi sürelerinin bulunması nedeni ile ön tedavi süresi olarak 1 saat olarak seçilmiş, yanıt elde edilemezse sürenin uzatılması planlanmıştır. Çalışmada, resveratrol ile 1 saatlik ön tedavinin hem LPS hem sitokin karışımıyla yapılan deneylerde etkin olduğu gösterilmiştir.

Etki mekanizmalarını ortaya koymak amacıyla, rat enterosit hücreleriyle tek katman hücre kültürü modelinde öncelikle sıyrık yara analizi ile hücrelerin migrasyon kapasitelerindeki değişim incelenmiş, ardından deney aynı koşullarda tekrarlanarak bu hücrelerden protein homojenizasyonu ile enzim analizi yapılmıştır.

Hücre kültürü deneylerinde nekrotizan enterokolite benzer ortamı oluşturmak ve tetiklenmesi olası yolları indüklemek amacıyla hipoksi, LPS veya sitokin karışımı ile uyarmak gibi teknikler kullanılmaktadır. Deney basamaklarından birinin iNOS düzeyini kontrol etmek olması ve in vitro ortamda hipoksi durumunda NO üretimi için oksijen miktarının sınırlayıcı bir faktör olması sebebiyle hipoksi ile indüksiyon tercih edilmemiştir [37].

Nekrotizan enterokolitin etyopatogenezi ile ilgili olarak birçok çalışma ile ortaya net konulmuş mekanizma olasılıkla hipoksik süreç sonrası meydana gelen intestinal mukoza hasarını takiben bakteriyel translokasyondur. Nekrotizan enterokolit ile bakteriyel invazyon, dolayısıyla endotoksin arasındaki nedensel ilişki hem klinik hem deneysel çalışmalarla birçok kez gösterilmiştir [2,5,13,28]. Ayrıca, birçok çalışma ile enterositlerin IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinleri üretebildikleri ve bu cevabın endotoksin veya IL-1 gibi inflamatuvar uyarıyla tetiklenebildiği gösterilmiştir. NEK patogenezi ile ilgili olarak abartılı inflamasyon yanıtının ilerleyici hücre hasarında önemli mekanizmalardan biri olduğu günümüzde genel kabul gören bir bilgidir [5,6,11,12,13]. Bu sebeple, deneylerin ilk kısmında

LPS uygulanarak bunun direkt etkisi gözlenmiş, ardından sürecin bir sonraki basamağı olan sitokin uyarılımına yanıtı ve resveratrolün bu basamağa etkisini gözlemlemek amacıyla hücreler bir sitokin karışımı ile muamele edilmiştir.

Hem nekrotizan enterokolit hem de enflamasyon kaskadı ile ilgili diğer çalışmalarda tanımlanmış birçok sitokin karışımı formülü bulunmaktadır. Bu çalışmada benzer yolları anlamak amacıyla yapılmış çalışmalarda etkinliği gösterilmiş olan TNF- α , IFN γ ve IL-1 β 'dan oluşan bir karışım kullanılmıştır [18,37,45]

Hücre kültürü çalışmalarında migrasyon analizi yapmak için birçok teknik bulunmaktadır. Bu tekniklerden bazıları sıyrık migrasyon analizi, tek hücre takibi, faz kontrast mikroskopunda hücre morfolojisi takibi ve immünfloresan mikroskopi ile migrasyon belirteçlerinin ortaya konulmasıdır [38]. Sıyrık migrasyon analizi hem yapılan çok sayıda çalışmada güvenle kullanılabileceğinin gösterilmiş olması, sadece hücrelerin migrasyon kapasitesini değil daha genel bir bakış sağlayarak yara iyileşmesini ortaya koyması, hem de daha ileri teknoloji gereksinimsiz inverte mikroskop ile de rahatlıkla uygulanabilmesinden ötürü tercih edilmiştir.

Bunun yanında, iki saatte bir gözlem yapılarak hem yaranın anlık görüntüsü değil zaman içerisinde değişimi gözlenmiş, hem de LPS ve sitokin karışımının etki başlangıç ve belirginleşme zamanları ortaya konarak western blot analizleri için doğru zamanlama ortaya konulmuştur.

Restitüsyonun nekrotizan enterokolit gibi bağırsak inflamasyonu ile giden hastalıklarda mukoza hasarı sonrası iyileşme sürecinde ilk basamak olarak önemi bilinmektedir. Bununla birlikte lipopolisakkaritin direkt olarak migrasyonu bozarak restitüsyon sürecini bozduğu gösterilmiş, nekrotizan enterokolitte ilerleyici sürece restitüsyondaki duraksamanın da katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür [28]. Bununla birlikte çeşitli sitokinlerin barsak restitüsyonunda süreci hızlandırmak yönünde pozitif [21,45], sınırlı sayıda çalışma ile de bazı

sitokinlerin ve NO gibi kimi mediatörlerin süreci bozarak negatif yönde [17,46] etkileri olduğu gösterilmiştir. Nekrotizan enterokolit gibi artmış enflamasyon cevabıyla giden hastalıklarda abartılı sitokin uyarısının restitüsyon üzerine net etkisi bilinmemekle birlikte olasılıkla hem sitopatik süreci hızlandırmakta hem de restitüsyonu bozarak oluşmuş endotel hasarının iyileşmesini geciktirmektedir.

Migrasyon deneylerinde, daha önceki çalışmalara benzer şekilde lipopolisakkaritin migrasyonu bozduğu görülmüştür. Sitokin karışımı ile de migrasyon üzerine lipopolisakkaritten bağımsız ve hatta daha belirgin olumsuz etki gözlemlenmiştir. Öncesinde resveratrol uygulanmasının ise hem LPS hem de sitokin karışımı ile meydana gelen aksamayı büyük oranda engellediği gözlemlenmiştir. Böylelikle endotoksin ve indüklenen abartılı sitokin cevabının hücre migrasyonunu bozarak mukozal hasarın iyileştirilmesi sürecini bozduğu, resveratrolün hastalıktan koruyucu etkilerinden birinin endotoksin ve sitokinlerin etkisiyle bozulmuş olan restitüsyonu düzeltmek olduğu gösterilmiştir.

Fonksiyonel sonuçları görmek amaçlı migrasyon deneylerinin ardından, bu etkinin temelindeki enzim yollarını görmek amacıyla bazı enzim analizlerinin yapılması planlanmış, bu amaçla iNOS, COX, FAK ve fosfoFAK enzim düzeyleri çalışılmıştır.

Öncelikle iNOS ve COX enzim düzeylerinin çalışılmasının sebebi kuvvetli bir antiinflamatuvar olduğu bilinen resveratrolün olası etkilerinden birinin abartılı inflamasyon yanıtını baskılamak olduğunun düşünülmesidir. Daha önce kliniğimizde yürütülmüş hayvan deneyi çalışmasında da hem Western Blot hem de immünohistokimyasal analizle iNOS'un nekrotizan enterokolitle indüklendiği, resveratrol veya anne sütü ile nekrotizan enterokolit gelişiminin engellediği deney hayvanlarında ise iNOS düzeylerinin düşük kaldığı gözlenmiştir. Bu çalışma ve literatürdeki çeşitli çalışmalarla iNOS enziminin NEK patogenezinde önemli bir yer tuttuğu gösterildiğinden [j,s,aa] ve farklı hücreler ile de olsa resveratrolün antiinflamatuvar ve iNOS üzerine baskılayıcı [oo, pp] etkileri bilindiğinden resveratrolün nekrotizan enterokolit gelişiminden koruyucu etkileri için olası mekanizmalardan önemli bir tanesinin iNOS enzim

inhibisyonu olduğu düşünölmüştür. Yapılan western blot analizleri ile önceki çalışmalara benzer şekilde enterositlerde hem LPS hem sitokin uyarısıyla iNOS enzim düzeylerinin arttığı, öncesinde resveratrol uygulanmış olmasının bu artışı engelleyebildiği gözlenmiştir.

Proinflamatuvar sitokinlerin uyarımıyla aşırı NO üretimine sebep olan iNOS enziminin nekrotizan enterokolitteki yeri yapılmış birçok çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmamızda resveratrolün, iNOS enzim düzeyini hem LPS hem sitokin karışımı uygulanmış gruplarda kontrol gruplarına yakın değerler çekmesi, hastalıktan koruyucu mekanizmalarından birini açıklamanın yanında; hastalıkla ilişkisi bu kadar net ortaya konulmuş bir enzim düzeyinde yaptığı değişiklik ile hastalıktan koruyucu olabileceğine dair varsayımımızı güçlendirmektedir.

Nekrotizan enterokolitte indüklendiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş bir diğer inflamasyon kaskadı üyesi COX-2'dir [11,13,14]. Siklooksijenaz, prostoglandin sentezini katalizleyen ana enzimdir. COX-2 normal fizyolojik koşullarda saptanamayacak düzeylerde olmakla birlikte proinflamatuvar mediatörler, sitokinler, büyüme faktörleri ve mitojenler ile indüklenerek prostoglandin sentezinde abartılı artışı sebep olur. İnflamasyon sürecindeki temel rolünün yanı sıra, NEK'li infantların intestinal epitel hücrelerinde COX-2 protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [11]. Enterositler ile yapılmış çalışma bulunmamakla birlikte başka hücrelerle yapılmış çalışmalar ile resveratrolün COX-2 üzerine baskılayıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir [33,42,47]. Bu bilgiler ışığında resveratrolün nekrotizan enterokolitten korumada bir diğer etki mekanizmasının COX-2 inhibisyonu olabileceği düşünölmüştür. Yapılan western blot analizleri ile enterositlerde hem LPS hem sitokin uyarısıyla COX-2 düzeylerinin arttığı, öncesinde resveratrol uygulanmış olmasının bu artışı engelleyebildiği gözlenmiştir.

Dolayısıyla, çalışmamızda da gözlemlendiği gibi hem endotoksin hem sitokinlerin uyarısıyla artması nekrotizan enterokolit etyopatogenezindeki temel rolünü, resveratrol ile bu artışın baskılanması ise resveratrolün bu enzim üzerindeki baskılayıcı etkisini göstermektedir.

İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz ve siklooksijenaz deney sonuçlarıyla resveratrolün nekrotizan enterokolitten koruyucu etkilerinden birinin endotoksin ve sitokinlerin etkisiyle indüklenen aşırı inflamasyon cevabını baskılamak yoluyla olduğu ve bu etkinin meydana gelmesinde etkin mekanizmalardan birinin artmış iNOS ve COX enzim düzeylerini baskılamak olduğu gösterilmiştir.

iNOS ve COX2 enzim düzeylerinin analizi ile resveratrolün inflamatuvar yolak üzerine etkilerinin ortaya konulmasının ardından resveratrolün migrasyon üzerine olası etki mekanizmalarından birinin ortaya konulması amacıyla, aynı deney düzeneğiyle fokal adhezyon kinaz düzeyleri analiz edilmiştir.

Fokal adhezyon kinaz, hücrelerin yönelimli hareketi için çok önemli bir enzimdir. İntegrinlerin birleşmesiyle indüklenir ve migrasyon sürecini düzenler. Fokal temaslar kurmak için gerekli olmasının yanında, yokluğunda geniş ve fazla sayıda fokal temaslar oluşması sebebiyle motilite durmaktadır [21,24]. FAK'ın bu iki yönlü etkisi, migrasyonun dinamik bir süreç olması ve FAK'ın bu süreçte olasılıkla başlatıcı bir protein değil de hücre uyarılımını sağlayan farklı sinyallere göre fokal temas kurulmasını ya da gerektiğinde kurulan temasların yıkılmasını sağlayan düzenleyici bir protein olduğu şeklinde yorumlanabilir. Çalışmamızda FAK, hem hücre migrasyonundaki bu temel etkisi hem de daha önce yapılmış çalışmalarda endotoksin ile etkinliğinin değişebildiğinin gösterilmesi sebebiyle kullanılmıştır [28,29].

Bunun yanında, fokal adhezyon kinaz düzeyleri hem total protein hem de fosforile protein olarak değerlendirilerek değişikliğin fosforilasyon düzeyinde yani enzim aktivasyonu ile mi yoksa protein senteziyle mi ortaya çıktığının ortaya konulması planlanmıştır. Yapılan western blot analizleri ile total FAK düzeylerinin uyarıya rağmen sabit kaldığı ancak pFAK düzeylerinin enterositlerde hem LPS hem sitokin uyarısıyla arttığı, öncesinde resveratrol uygulanmış olmasının bu artışı engelleyebildiği gözlenmiştir.

Mekanizmaya olasılıkla birçok farklı mediatörün katkıda bulunması olasıdır. Bununla birlikte resveratrolün restitüsyonu düzeltmedeki rollerinden birisinin FAK moleküllerinin fosforilasyonunu ve dolayısı ile aktivasyonunu azaltarak modüle etmesi yolu ile fazla sayıda fokal temas oluşmasını engellemek olduğu gösterilmiştir. Böylece resveratrol, endotoksin ve sitokinlerin etkisiyle oluşan artmış fosforilasyonu engelleyerek hücrelerin migrasyon fonksiyonun korunmasına/yerine konmasına katkıda bulunmaktadır.

6. Sonuç

Nekrotizan enterokolitin karmaşık ve birçok hücre içi yolağı ilgilendiren mekanizmaları dolayısıyla hem etyopatogenezi halen anlaşılamamış, hem de yenidoğanları bu hastalıktan koruma adına etkin tedaviler geliştirilememiştir. Bu alışma, resveratrolün indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve siklooksijenazı baskılamak yoluyla abartılı inflamasyon yanıtını baskılayarak, hem de fokal adhezyon kinazdaki artışı baskılayarak restitüsyondaki bozulmayı engelleyerek nekrotizan enterokolitten korumada etkin olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, çalışmada gösterilmiş mekanizmalar dışında birçok enzim yolağında etkin olması olasıdır ve in vivo çalışmalar ile sonuçlarının desteklenmesi elzemdir.

Mevcut bilgi birikiminin ışığında ve onlara bir katkı olarak yrtlen bu çalışmanın sonuçları destekleyici in vivo çalışmalar ve mekanizmayı açıklamak için apoptoz ve proliferasyon süreci ile ilişkili de ek çalışmalar ile geliştirilmesi planlanmaktadır.

7. Özet

Bu çalışmada nekrotizan enterokolitte (NEK) resveratrol ile suplementasyonun intestinal mukoza hasarı ve restitüsyonu üzerine sonuçlarının ve etki mekanizmalarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

NEK, prematüre infantta enteral beslenme ve mikrobiyal antijenler tarafından aktive olan barsak kökenli mukozal immun sistemin neden olduğu sistemik inflamatuvar yanıt ile karakterize, ince barsak ve kolonun sınırlı mukozal harabiyetinden total nekroza kadar değişebilen bir spektrum içinde iskemisidir. Aktive olan mukozal immun sistem sonucu proinflamatuvar sitokinlerin (Tümör nekroz faktörü-alfa [TNF- α], interlökin 1-beta [IL-1 β], nitrik oksit [NO], platelet aktive edici faktör [PAF] vb) ve siklooksijenaz 2 (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi enzimlerin salınımı artar. Inflamatuvar sitokinler hücre hasarı oluşturarak enterosit apoptozuna, bunun neticesinde mukozal bariyer bütünlüğünün bozulmasına, bakteriyel translokasyona ve sonuçta sepsis gelişmesine neden olur. Ayrıca intestinal mukoza hücrelerinin yüksek migrasyon yeteneği, dolayısıyla tetiklenen apoptoz sonucu oluşan çıplak sahaların onarımı bozulmaktadır. Sonuç olarak, bu hastalıkta intestinal mukozal bariyer bütünlüğünün korunması ve oluşan hasarın hızla onarılması hastalık sürecinin kısaltılması ve komplikasyonlarının önlenmesinde kritik önem taşımaktadır [a].

İntestinal epitel hücreleri üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılmış olan resveratrol serbest radikal giderici ve hücre siklusunda anahtar enzimler üzerinde modülatör etki gösteren bir ajandır. Çeşitli çalışmalarda antioksidan, antiinflamatuvar, antimutajenik, vazorelaksan, antiagregan, kemopreventif ve hepatoprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir [b,c,d].

Kliniğimizde yürütülen hayvan deneyi çalışmasında ise resveratrolün deneysel nekrotizan enterokolit modelinde epitel bütünlüğü ve mukozal bariyerin korunmasına yardımcı olduğu, NEK bulgularını morfolojik olarak engellediği gösterilmiş ve villus epitelinde iNOS enzim düzeyleri çalışılarak intraepitelyal iNOS ekspresyonunu düzenlediği ortaya konmuştur [e].

Önceki çalışmamızdaki deneysel NEK modeli üzerindeki çarpıcı etkisi göz önüne alınarak resveratrolün nekrotizan enterokolitte, hem hücre hasarını tetikleyen birden fazla enzim

yolağı, hem de hücre restitüsyonunu sağlayan migrasyon üzerine etkilerinin olduğu hipotezi kurulmuş ve bu çalışmayla bu etkilerin bir kısmının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Resveratrolün hücre migrasyonu üzerine etkilerini ortaya koymak amacıyla IEC-6 hücreleri kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra deneysel yara oluşturulmuş ve sonrasında hücreler LPS ve sitokinler ile muamele edilmiş, bu muamele daha sonra önceden resveratrol ile muamele edilmiş hücrelerle tekrarlanmıştır. Hücrelerin migrasyon kapasitesi invert mikroskop altında işaretlenerek alınan fotoğraflarla değerlendirilmiştir. LPS ve sitokin karışımının hücrelerin restitüsyon kapasitesinde azalmaya sebep olduğu, öncesinde resveratrol uygulanmasının bu artışı engelleyebildiği gösterilmiştir.

Resveratrolün etkilerinin belirlenmesi için hücreler değişik dozlarda resveratrol ile muamele edildikten sonra aynı şekilde LPS ve sitokin karışımı ile muamele edilmiş ve enzim ekspresyonundaki değerşiklikler değerlendirilmiştir. Yapılan deneylerle LPS ve sitokin uyarısının enterositlerde indüklenebilir nitrik oksit sentetaz, siklooksijenaz-2, fosforile fokal adhezyon kinaz ekspresyonunu arttırdığı, öncesinde resveratrol uygulanmasının bu artışı engelleyebildiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, resveratrolün indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve siklooksijenazı baskılamak yoluyla abartılı inflamasyon yanıtını baskılayarak, hem de fokal adhezyon kinazdaki artışı baskılayarak restitüsyondaki bozulmayı engelleyerek nekrotizan enterokolitten korumada etkin olabileceği söylenebilir.

8. İngilizce Özet

The aim of this study was to reveal effects of resveratrol supplementation to mucosal injury and restitution in necrotising enterocolitis (NEC).

NEC is a spectrum of ischemia in bowel wall from focal mucosal injury to total ischemia of the whole bowel which is characterized with a systemic inflammatory response initiated with mucosal immune system and activated by microbial antigens and enteral feeding.

After stimulation of mucosal immune system, an increase in production of proinflammatory cytokines (Tumour necrosis factor- α [TNF- α], interleukin1-beta [IL-1 β], nitric oxide [NO], platelet activating factor [PAF]) and some inflammatory enzymes like cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) happens.

Inflammatory cytokines induce cell injury, enterocyte apoptosis, defect in mucosal integrity and therefore bacterial translocation and sepsis. They also impair restitution and therefore healing of mucosal defects. Therefore, suppression of inflammatory cytokines and preserving ability of migration has a critical role for prevention and treatment of this fatal disease.

Resveratrol, is a radical scavenger and a modulator for some fundamental enzymes in cell cycle. Many studies revealed its antioxidant, antiinflammatory, antimutagenic, vasorelaxant, antiaggregant, chemopreventive and hepatopreventive features.

In a former animal study held in our clinic, it was shown to be effective in preservation of mucosal integrity, being able to prevent morphologic changes in NEC and increase in iNOS expression.

In the light of this study's findings, it was hypothesized that resveratrol can be effective in some important pathways which induce cell injury and replacement of restitution.

To reveal effects of resveratrol, IEC-6 culture cells were grown to confluenc, scratch wounds were constructed, application of lipopolysaccharide was used to constitute an experimental necrotizing enterocolitis model. To evaluate migration serial images were taken after application and analysed. LPS and cytokine mixture were found to significantly impair

migration and resveratrol was found to prevent this impairment. Nitric oxide synthase-2(iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2) levels were assessed to reveal inflammation. iNOS and COX-2 levels were found to be increased with both LPS and cytokine mixture and levels near control groups were found with resveratrol pretreatment.

In conclusion, resveratrol, being known for the antioxidant and vaso-relaxant features, was found to suppress excessive inflammatory response and help preservation of mucosal integrity in necrotizing enterocolitis by conservation of epithelial restitution.

9. Kaynaklar

1. Coombs RC. The prevention and management of Necrotising Enterocolitis. *Current Pediatrics*. 2003;13:184-9
2. Crissinger KD. Understanding Necrotizing Enterocolitis- promising directions. *Pathophysiology*. 1999;5:247-256.
3. Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O'Shea TM. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Journal of Perinatology*. 2007; 27: 428–433.
4. Ergün O, Ergün G, Öktem G, Selvi N, Doğan H, Tuncyurek M, Saydam G, Erdener A. Enteral resveratrol supplementation attenuates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase activity and mucosal damage in experimental necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery* . 2007;42:1687–1694.
5. Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr Opinion in Infection Diseases*. 2003;16:349-351.
6. Guner YS, Chokshi N, Petrosyan M, Upperman JS, Ford H, Grikscheit TC. Necrotizing enterocolitis — bench to bedside: novel and emerging strategies. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2008;17(4):255–265.
7. Guthrie SO, Gordon PV, Thomas V, Thorp JA, Peabody, Clark RH. Necrotizing Enterocolitis Among Neonates in the United States. *Journal of Perinatology* 2003; 23:278–285.
8. Israel EJ, Schiffrin EJ, Carter EA, Freiberg E, Walker WA. Prevention of necrotizing enterocolitis in the rat with prenatal cortisone. *Gastroenterology*. 1990;99(5):1333-8.
9. Halac J, Begue EF, Casanas JM, Indiveri DR, PEtit JF, Figueroa MJ, Olmas JM, Rodriguez LA, Obregon RJ. Prenatal and postnatal corticosteroid therapy to prevent

- neonatal necrotizing enterocolitis: a controlled trial. *The Journal of Pediatrics*. 1990; 117(1):132-138.
10. Mallick IH, Yang W, Winslet Mc, Seifalian AM. Ischemia–Reperfusion Injury of the Intestine and Protective Strategies Against Injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 2009;49(9):1359–1377.
 11. Ford HR, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*. 1997;32:275-282.
 12. Ford HR, Sorrells DL, Knisely AS. Inflammatory cytokines, nitric oxide and necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*. 1995;5(3):155-159.
 13. Chung DH, Ethridge RT, Kim S, Owens-Stovall S, Hernandez A, Kelly DR, Evers BM. Molecular mechanisms contributing to necrotizing enterocolitis. *Annals of Surgery*. 2001;233(6):835-42.
 14. Lugo B, Ford HR, Grishin A. Molecular signaling in necrotizing enterocolitis: regulation of intestinal COX-2 expression. *Journal of Pediatric Surgery*. 2007;42:1165– 1171.
 15. Xu D, Lu Q, Deitch EA. Nitric Oxide Directly Impairs Intestinal Barrier Function. *Shock*. 2002;17(2):139–145.
 16. Zabel DD, Find all citations by this author (default). Or filter your current search Hopf HW Find all citations by this author (default) Or filter your current search , Hunt TK. The role of nitric oxide in subcutaneous and transmural gut tissue oxygenation. *Shock* .1996;5(5):341-343.
 17. Upperman JS, Potoka D, Grishin A, Hackam D, Zamora R, Ford HR. Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2005;14, 159-166.

18. Ruben Zamora, Anatoli Grishin, Catarina Wong, Patricia Boyle, Jin Wang, David Hackam, Jeffrey S. Upperman, Kevin J. Tracey and Henri R. Ford. High-mobility group box 1 protein is an inflammatory mediator in necrotizing enterocolitis: protective effect of the macrophage deactivator semapimod mediator in necrotizing enterocolitis: protective effect. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289:643–652.
19. Feil W, Lacy E, Wong Y et al: Rapid epithelial restitution of human and rabbit colonic mucosa. *Gastroenterology*. 1989;97:685-701.
20. Dieckgraefe B, Stenson W, Alpers D. Gastrointestinal epithelial response to injury. *Curr Opin Gastroenterol* 1996;12:109-114.
21. Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(3):348-353.
22. Horwitz AR, Parsons JT. Cell Migration--Movin' On. *Science*. 1999;5442:1102-1103.
23. Bretscher M. Moving membrane up to the front of migrating cells. *Cell Biol Int*. 1996;85:465-467.
24. Anne J. Ridley. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*. 2003;302, 1704-1709.
25. Satyajit K.Mitra, Daniel A.Hanson and David D. Schlaepfer. Focal Adhesion Kinase: In Command And Control Of Cell Motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6;2005:56-68.
26. Ilic, D. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*. 1995;377:539–544.
27. Webb, D. J. FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature Cell Biol*. 2004;6:154–161.

28. Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, Baty C, Apodaca G, Hackam DJ. Endotoxin Inhibits Intestinal epithelial Restitution through Activation of Rho-GTPase and Increased Focal Adhesions. 2010;279(23):24592–24600
29. Basson MD, Sanders MA, Gomez R, Hatfield J, VanderHeide R, Thamilselvan V, Zhang J, Walsh MF. Focal adhesion kinase protein levels in gut epithelial motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291:491-499.
30. Fremont L. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sciences*. 2000;8:663-673.
31. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*. 2003;9:64–76.
32. Trincheri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis*. 2007;5:922–931.
33. Gescher AJ, Steward WP. Relationship between Mechanisms, Bioavailability, and Preclinical Chemopreventive Efficacy of Resveratrol: A Conundrum. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2003;12:953–957.
34. Jed L. Bruder, Tze-chen Hsieh, Kenneth M. Lerea. Induced cytoskeletal changes in bovine pulmonary artery endothelial cells by resveratrol and the accompanying modified responses to arterial shear stress. *BMC Cell Biology*. 2001; 2:1.
35. Martín AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochemical Pharmacology*. 2004;67:1399–1410.

36. Szende B, Tyihák E, Király-Véghely Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp Mol Med.* 2000;32(2):88-92.
37. Brian S. Zuckerbraun, Leo E. Otterbein, Patricia Boyle, Ronald Jaffe, Jeffrey Upperman, Ruben Zamora and Henri R. Ford. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G607-G613, 2005.
38. Debeir O, Adanja I, Kiss R, Decaestecker C. Models of cancer cell migration and cellular imaging and analysis. *The Motile Actin System in Health and Disease,* 2008;16:123-156
39. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates with Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology.* 2001;167(3):1609-1616.
40. Forsythe RM, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Lipopolysaccharide Induced Enterocyte Derived Nitric Oxide Induces Intestinal Monolayer Permeability In An Autocrine Fashion. *Shock.* 2002;17(3)180–184.
41. Relationship between Mechanisms, Bioavailability, and Preclinical Chemopreventive Efficacy of Resveratrol: A Conundrum. Andreas J. Gescher¹ and William P. Steward. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* Vol. 12, 953–957, October 2003.
42. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFκB in macrophages by resveratrol.. *British Journal of Pharmacology.* 1999;126:673-680.

43. She QB, Ma WY, Wang M, Kaji A, Ho CT, Dong Z. Inhibition of cell transformation by resveratrol and its derivatives: differential effects and mechanisms involved. *Oncogene*. 2003;22:2143–2150.
44. Han X, Fink MP, Uchiyama T, Yang R, Russell L. Deletion of iNOS activity is essential for pulmonary epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:259-267.
45. Zhu N, Lalla R, Eves P, Brown TLH, King A, Kemp EH, Haycock JW, MacNeil S. Melanoma cell migration is upregulated by tumour necrosis factor- α and suppressed by α -melanocyte-stimulating hormone. *British Journal of Cancer*. 2004;90:1457–1463.
46. Leaphart CL, Qureshi F, Cetin S, Li J, Dubowski T, Batey C, Beer–Stolz D, Guo F, Murray SA, Hackam DJ. Interferon- γ Inhibits Intestinal Restitution by Preventing Gap Junction Communication Between Enterocytes. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2395–2411.
47. Wendeburg L, Oliveira ACP, Bhatia HS, Jalil AC, Fiebich BL. Resveratrol inhibits prostaglandin formation in IL-1 β -stimulated SK-N-SH neuronal cells. *Journal of Neuroinflammation* 2009;6:26-29.