

T. C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

İNTESTİNAL
İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARINDA RESVERATROLÜN
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Teoman ÖZCAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Erol MİR

Manisa, 2008

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	ii
Tablolar Dizini	iv
Şekiller Dizini	v
Önsöz	vi
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. İntestinal Sistem Kanlanması	3
2.2. İskemi ve Reperfüzyon	5
2.2.1. İskemi	5
2.2.2. Reperfüzyon ve Reperfüzyon Hasarı	5
2.2.3. Ksantin Oksidaz Yolu	6
2.2.4. Nötrofiller	7
2.2.5. Endotelyal Faktörler	8
2.2.6. Komplemanlar	8
2.2.7. Sitokinler	8
2.2.8. Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)	9
2.2.9. Serbest Radikaller ve Reperfüzyon	
Hasarındaki Roller	9
2.2.10. Antioksidan Savunma Sistemleri	12
2.3. Apoptozis	13
2.4. Resveratrol	17
2.4.1. Nitrik Oksit	17
2.4.1.1. NOS inhibisyonu	19
2.4.1.2. Nitrik Oksit Etki Mekanizması	19
2.4.1.3. Nitrik Oksitin Lökosit-Endotel İlişkisi ve	
Trombosit Fonksiyonlarındaki Rolü	21
2.4.2. Resveratrol	22
2.5. İskemi ve Reperfüzyon Hasarının Klinik Yansımaları	27

3. Gereç ve Yöntem	29
3.1. Deney Hayvanları	29
3.2. Deney Grupları	29
3.3. Deneysel İşlemler	30
3.4. Histolojik Değerlendirme	34
3.4.1. Parafin Doku Takibi	34
3.4.2. Hematoksilen-Eozin boyaması	35
3.4.3. TUNEL Boyaması	37
3.4.4. İndirek İmmunohistokimya Boyaması	39
3.4.5. İstatistiksel Değerlendirme	41
4. Bulgular	42
4.1. Histokimyasal İnceleme	42
4.2. Tunel Tekniği İle İnceleme	44
4.3. İmmunohistokimya Sonuçlarının Değerlendirilmesi	47
5. Tartışma	56
6. Sonuçlar	71
7. Özet	73
8. İngilizce Özet	74
9. Kaynaklar	75

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Apoptozis ve Genler	16
Tablo 2: eNOS ve iNOS'un Özelliklerinin Karşılaştırılması	18
Tablo 3: Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri	23
Tablo 4: Deney Grupları	29
Tablo 5: Parafin doku takibi	35
Tablo 6: Hematoksilen-Eozin Boyaması	36
Tablo 7: TUNEL boyaması	38
Tablo 8: İndirek immunohistokimyasal boyama	40
Tablo 9: Grupların Karşılaştırmalı İstatistiksel Sonuçları	45
Tablo 10: İleum örneklerinde TUNEL boyaması sonucunda pozitif hücre oranları	45
Tablo 11: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde TNF- α , IL-1 β , IL-8 ve IL-6 dağılımlarının immunohistokimyasal olarak karşılaştırılması sonuçları	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Süperior Mezenterik Arter	3
Şekil 2: İnférieur Mezenterik Arter	3
Şekil 3: Süperior Mezenterik Arter Dalları	4
Şekil 4: NO'in Koruyucu ve Zararlı Etkileri	20
Şekil 5: Trans- ve Cis- Resveratrol	22
Şekil 6: Supin pozisyonda zemine bant ile tespit edilen sıçanlar	30
Şekil 7: Median laparotomi insizyonu yapılan sıçanlar	30
Şekil 8: İleoçekal valv ve superior mezenterik arter eksplorasyonu	31
Şekil 9: Superior mezenterik arter oklüzyonu	31
Şekil 10: Bağırsakların batın içine redüksüyonu ve batının kapatılması	32
Şekil 11: Superior Mezenterik Arter'in Reperfüzyonu	32
Şekil 12: Yaklaşık 3 cm.lik terminal ileal segmentin eksizyonu	33
Şekil 13: Tüm gruplara ait ileum örneklerinin histokimyasal olarak değerlendirilmesi. Hematoksilen-Eozin.	43
Şekil 14: Tüm gruplara ait ileum örneklerinin TUNEL tekniği ile değerlendirilmesi.	46
Şekil 15: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde TNF- α dağılımı.	48
Şekil 16: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde IL-1 β dağılımı.	50
Şekil 17: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde IL-8 dağılımı.	52
Şekil 18: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde IL-6 dağılımı.	54

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesi sürecinde desteğini esirgemeyen tez danışmanım, anabilim dalı başkanımız, değerli hocam Prof. Dr. Erol MİR'e, uzmanlık eğitimim boyunca her alandaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Can TANELİ'ye, Doç. Dr. Abdülkadir GENÇ'e, Doç. Dr. Aydın ŞENCAN'a,

Tezimin yazım aşamasında desteğini ve fikirlerini esirgemeyen Doç. Dr. Cüneyt GÜNŞAR'a, tezimin deneysel işlemlerinde ve uzmanlık eğitimim sürecinde bana hep destek olan ve sabrını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ömer YILMAZ'a, histopatolojik kesitleri değerlendiren Doç. Dr. Seda VATANSEVER'e;

Birlikte eğitim gördüğümüz tüm asistan arkadaşlara ve klinik çalışanlarına;

Tüm eğitim sürecinde hep yanımda olan, her zaman sabır ve desteklerini gördüğüm aileme;

Bu süreçte sabır ve özveri ile hep yanımda olan sevgili eşim ve aynı zamanda çalışma arkadaşım Dr. Cansu ÜNDEN ÖZCAN'a;

TEŞEKKÜR EDERİM.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, canlının en küçük birimi olan hücrelerin yaşam şartlarının değişkenliği sonucu incinmelerini incelemek ve önleyici mekanizmaları araştırmaktır.

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu durum laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Sonuçta hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır^{1, 2, 3}.

Dokuların iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabildiği halde nöronlarda dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkabilir. Hücresel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP'nin tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Na⁺ ve Ca⁺⁺ iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder^{1, 2, 3, 4}.

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden düzenlenmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır^{1, 5, 6}.

Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir^{3,7,8}.

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının mediatörleri olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar.



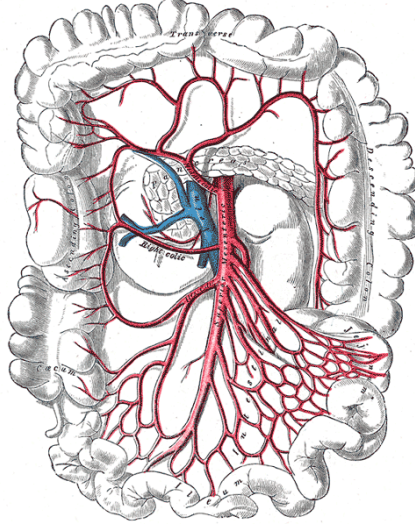
Resveratrol (3,4,5-trihidroksistilben) siyah üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenol yapıda doğal bir antioksidan maddedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar Güney Fransa'da yağlı diyet ve sigara kullanımının fazla olmasına rağmen bol tüketilen şarap nedeni ile koroner kalp hastalığı insidansının diğer bölgelere göre daha düşük bulunmasına yol açmış, bu tabloya "Fransız Paradoksu" adı verilmiştir^{9,10}. Bu konuda yapılan yayınlar paradoksa sebep olarak kırmızı şarap içinde bol miktarda bulunan resveratrolü işaret etmiştir¹¹. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda resveratrolün trombosit agregasyonunu engellediği¹², dokuları iskeminin zararlı etkilerinden koruduğu ortaya konmuştur^{13,14}.

Bilindiği gibi, nekrotizan enterokolit, invaginasyon, inflamatuvar barsak hastalıkları, pull-through ameliyatları, strangüle herniler, serbest pediküllü barsak flebi kullanımı ve barsak transplantasyonunun etiyojisinde iskemi ve reperfüzyon hasarı rol oynamaktadır. Bu gibi patolojilerin deneysel modellerinde çeşitli antioksidan ajanlar kullanılmış ve etkinlikleri değerlendirilmiştir.

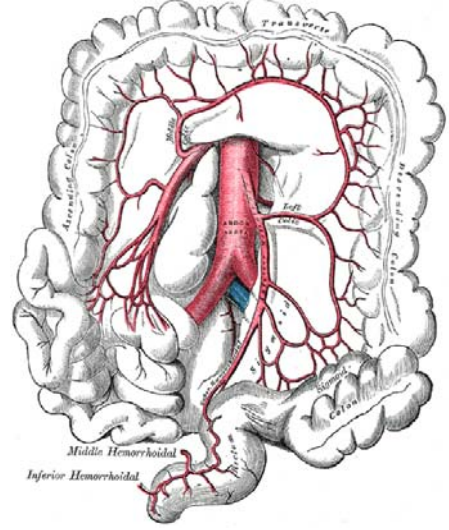
Resveratrolün antioksidan özelliği, endotelial nitrik oksit (NO) üretimini arttırması ve apoptozisi engellemesi bizi, resveratrolün intraperitoneal olarak verilmesinin iskemi-reperfüzyon (IR) hasarını önleyici, organ disfonksiyonlarını azaltıcı etkisi olup olmadığı konusunu araştırmaya yöneltmiştir. Bu noktadan hareketle çocuk cerrahisi pratiğinde kullanılabilirliği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İNTESTİNAL SİSTEM KANLANMASI



Şekil 1: Süperior Mezenterik Arter

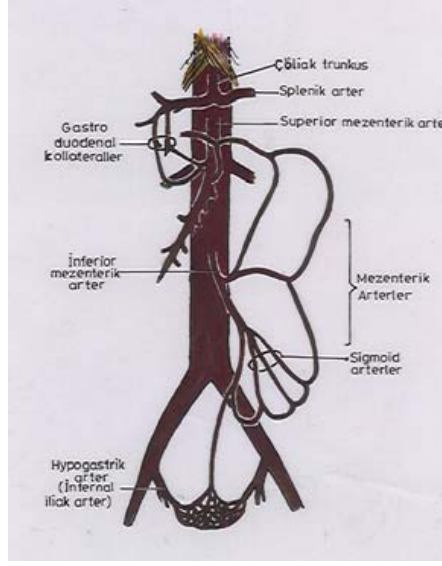


Şekil 2: İnförior Mezenterik Arter

Mezenterik dolaşım üç arter içerir.

- Çölyak turunkus, foregut'u (mide ve duodenumun proksimal yarısı) besler.
- Superior mezenterik arter (SMA), midgut'u (duodenumun distal yarısı, jejunum, ileum, çekum, apandiks, çıkan kolon ve proksimal 2/3 transvers kolon) besler.
- İnförior mezenterik arter (İMA), hindgut'u (1/3 distal transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anal kanalın proksimal kısmı) besler.

SMA, çölyak arterin yaklaşık 1cm altından, L1 düzeyinde karın aortundan çıkar. Çölyak arter, SMA ve İMA, embriyonun her iki vitellin arterinin kalıntısıdır.



Şekil 3: Süperior Mezenterik Arter Dalları

SMA'in en önemli dalları, inferior pankreatikoduodenal arter, 4- 6 jejunal dal, 9 -13 ileal dal, ileokolik arter, sağ kolik arter ve orta kolik arterdir.

Mezenter damarlarının birbirleri arasında zengin kollateral dolaşım vardır. Bu yan dal ağının zengin olması nedeniyle en azından iki ya da üç ana damarın tıkanması ya da kritik darlığa sahip olması durumunda klinik bulgular ortaya çıkar.

2.2 İSKEMİ VE REPERFÜZYON

2.2.1. İSKEMİ

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır^{1,2,3}.

Dokuların iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabildiği halde nöronlarda dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkabilir. Hücresel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP'nin tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Na⁺ ve Ca⁺⁺ iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder^{1,2,3,4}.

2.2.2. REPERFÜZYON VE REPERFÜZYON HASARI

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden düzenlenmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır^{1, 5, 6}.

Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir^{3,7,8}.

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının mediatörleri olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Bu faktörler şunlardır:

I- Ksantin Oksidaz

II- Nötrofillerin aktivasyonu

III- Endotelial faktörler

1-Araşidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂)

b)-Tromboksan A₂(TxA₂)

c)-Lökotrien B₄

2-Nitrik Oksit

3- Endotelin

IV- Trombosit aktive edici faktör (PAF)

V-Komplemanlar

VI-Sitokinler

VII-Prostaglandinler

VIII-Katekolamin oksidasyonu

2.2.3. KSANTİN OKSİDAZ YOLU

İskemi sonrası dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Bu enzim “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskemi sırasında ksantin dehidrojenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer,dalak, böbrek ve akciğerde ise 30 dakika sürmektedir. Bu durum değişik dokuların iskemi-reperfüzyon hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar^{1,7,15}.

2.2.4. NÖTROFİLLER (POLİMORF NÜVELİ LÖKOSİTLER)

İskemi ve reperfüzyonun yol açtığı mikrovasküler hasar için nötrofil ve endotelial hücre ilişkisi gerekmektedir. İskemi sırasında ve daha ağırlıklı olarak bunu takip eden reperfüzyon döneminde postkapiller venüllerde endotele artmış nötrofil adhezyonu görülür ki bunun iskemi-reperfüzyona bağlı barsak disfonksiyonunda önemli rolü vardır. PAF, LB₄ ve serbest oksijen radikalleri bu durumun en muhtemel kimyasal mediatörleridir^{1,16}.

2.2.5. ENDOTELYAL FAKTÖRLER

Vasküler endotelial çeper pek çok lokal hormon ve otokoid salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler¹.

1-Araşidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂): Endotel hücrelerinden serbestlenen ilk vazoaktif ajan olan PGI₂ endotelial yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür.

b)-Tromboxan A₂ (TXA₂): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TxA₂ trombositleri agrege eder ve vazokonstrüktör etkisi vardır. Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en potent uyarandır. TXA₂, iskemi-reperfüzyonda endotelyuma nötrofil adhezyonunu indükleyen güçlü bir kemotaktik maddedir.

c)-Lökotrien B₄ (LB₄): Lökotrienler, iskemi ve reperfüzyon boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitleridir. LB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Adhezyon moleküllerinin aktivasyonunu, endotelial hücrelere yapışmayı, serbest oksijen radikallerinin ve proteazların üretimini sağlar. Üç saatlik iskemik periyodu mukozal LB₄ seviyelerini değiştirmezken, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LB₄ seviyelerinde %200 ila 600 oranında artışa yol açmaktadır⁶.

2- Nitrik Oksit (NO): Endotel türevli nitrik oksit veya relaxing faktör (ENDO, EDRF) olarak da bilinen NO, asetil kolin uyarısı, hipoksi, endotoksin, hücresel zedelenme veya mekanik kesilme stresine yanıt olarak dolaşıma salınabilmektedir. Yarı ömrü bir kaç saniye olan, diffüze olabilen bir maddedir. NO kendiliğinden nitrat ve nitrite ayrışır. Septik şok ve travmada, nitrit ve nitrat metabolitleri ile ölçülen NO düzeyleri yüksekliğinin, düşük sistemik vasküler direnç ve yükselmiş endotoksin düzeyleri ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır². Hücresel hasarın yanında büyük miktarlardaki NO parakrin ve otokrin fonksiyonların bozulmasına, bölgesel kan akımında dağılım bozukluğuna, barsak motilitesinde azalmaya ve permeabilitesinde artışa yol açar¹⁷.

3. Endotelin: Arter ve venlerde kontraksiyona neden olan en güçlü vazokonstrüktördür. İskemik kalmış bir barsağın ürettiği endotelinin, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarının sistemik bir hasara dönüşmesinden sorumlu olabilecek güçlü bir aday olduğu ileri sürülmektedir².

2.2.6. KOMPLEMANLAR

Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anafatoksin C3a ve C5a'nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adhezyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır^{1,2}.

2.2.7. SİTOKİNLER

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF- α 'nın vasküler yaralanmaya katkıda buldukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir^{1,2}. İskemi ve reperfüzyonda sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direk mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir¹⁶.

2.2.8. PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF)

Fosfolipaz A₂'nin etkisiyle endotel hücreleri tarafından membran fosfolipidlerinden üretilir. Çok çeşitli inflamatuvar reaksiyonda (ARDS, Akut pankreatit, İnflamatuvar barsak hastalığı, glomeruler hasar vs.) etkin olduğu gözlenen bir substrattır^{1,6,18}.

Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna, ve granül içeriğinin salınmasına yol açan oldukça kuvvetli bir ajandır. Ek olarak PAF kuvvetli bir nötrofil kemoatraktan ve aktivatör bir maddedir ve TNF- α üretiminde önemli bir rol oynar. Dokuların reperfüzyonu sonucu lökositlerin aktivasyonuna, adhezyon ve diapedezine ve aynı zamanda vasküler permeabilitede artışa yol açar. Pek çok çalışma PAF'ın in vitro ve in vivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adhezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF'ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir^{1,2,19}.

2.2.9. SERBEST RADİKALLER VE REPERFÜZYON HASARINDAKİ ROLLERİ

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren, ileri derecede reaktif, kısa ömürlü ve anstabil moleküllerdir. Moleküler oksijenin indirgenmesi ve eksitasyonu ile çok değişik oksijen serbest radikalleri üretilebilirler^{1,2,15}.

Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali (O₂⁻) oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali (H₂O₂) oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali (OH⁻) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında hidrojen peroksit, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Diğerleriyle karşılaştırılığında O₂⁻ radikali yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Ancak oksijen radikallerinden en aktif olanı OH⁻ radikalidir^{1,15}.

Hücreler serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intraselüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir². Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar¹⁵. Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur.

a-)Lipid Peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikalının olduğu kabul edilmektedir. Yağ asidi, zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal alkil radikali olup dayanıksız bir tüevdir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali (LOO[•]) oluşur. Lipid peroksi radikali zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek hidroperoksit (ROOH) ve yeni bir alkil radikali oluşturur.

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür^{1,4,15}. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin

artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ek olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir^{4,15}.

b-)Protein oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disülfidlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir^{4,15}.

c-) DNA: Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar^{20,21}.

d-) Kovalan Bağlanma: Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, ve nitrozaminler gibi xenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir²¹.

e-) Kalsiyum: Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri (SOR) tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler²².

2.2.10. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Organizmada devamlı olarak serbest oksijen radikalleri oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz. Fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu bu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir.

İskemi-reperfüzyon hasarlanmasını inhibe eden pek çok endojen mekanizma bulunmakla beraber, ekzojen olarak da hasarlanmayı engelleyebilen bir çok ilaç tanımlanmıştır. Etki mekanizmaları farklı olan ekzojen ve endojen ajanlar şunlardır:

Antioksidan enzimler: Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz bu gruptan olup primer antioksidanlardır. Serbest radikalleri, biyolojik önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek veya başka moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler^{4,15}.

Serbest radikal toplayıcılar: Vitamin E, vitamin C, β-karoten, ürik asit, bilirubin, albümin bu gruptandır ve sekonder antioksidanlar olarak bilinir. Bunlar serbest radikalleri yakalayarak oluşabilecek zincir reaksiyonlarını engeller^{4,15,20}.

Nötrofil inhibitörleri: PAF antagonistleri ve 5-lipooksijenaz inhibitörleri kemotaksisi inhibe ederken Transforming Growth Faktör β ise nötrofillerin endotele yapışmasını ve adenosin reseptör mekanizması yoluyla aktive nötrofillerden serbest radikal üretimini inhibe eder^{23,24}.

Serbest radikal üretimi inhibitörleri: Allopurinol ve desferroksamin bu gruptandır.

Ekzojen antioksidanlar: α-tokoferol, propranolol, Ca kanal blokerleri, kaptopril bu grup ajanlardır.

2.3. APOPTOZİS

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır^{25,26}. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir²⁷. Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir²⁸.

Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir. Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozis yoluyla gerçekleşir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır^{25,29}.

Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir³⁰. Tümörlerde sık görülen bir olay olup apoptozise direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlar³¹.

Apoptozis çoğunlukla tek tek hücreleri etkiler, birçok fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkar ve genellikle enflamasyon söz konusu değildir³².

Hücrenin yaşam süresi, tipine göre değişmektedir. Örneğin; bağırsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Kalp kası hücreleri veya

nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır³³. Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hücresel yaranma ve enflamasyon olmaksızın, ustaca gerçekleştirilir³⁴. Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır³⁵.

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır³⁶.

Apoptozisin Görüldüğü Hücre Çeşitleri

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir³⁷. Bu doku ve hücrelere ince bağırsaklar, deri, timus, uterus, beyin ve göz örnek olarak gösterilebilir^{38, 39, 40, 41}.

Apoptozis çok hücreli canlıların gelişimi esnasında da görülür. Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri seçilmiş bazı hücrelerin apoptozisle ölmesine bağlıdır. Örnek olarak 1 mm uzunluğunda transparant bir kurtçuk olan *Caenorhabditis elegans*'in başlangıçta 1090 olan hücre sayısı tam olarak apoptozisle 131 hücre azalır ve böylece hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşür⁴². Kurbağaların metamorfozisi esnasında kuyruklarının kaybolarak erişkin forma geçmeleri apoptozisle gerçekleşir. Böylece yetişkin forma geçerler. Kuyruktaki hücreler apoptozisle ölecek kaybolur. İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir^{27, 43}.

Apoptozisin Morfolojisi

Apoptozisde ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır⁴⁴. İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern'

olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur⁴⁵. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz^{46, 47}.

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır⁴⁸.

Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir⁴⁹.

Apoptoz 30 – 60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir⁵⁰. Elektron mikroskopunda apoptozis esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptozis İndükleyici Faktör salınımı, olduğu bildirilen morfolojik değişikliklerdendir⁵¹.

Apoptozisin Mekanizmaları

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır²⁵.

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarıcı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarıcılar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)⁵², IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise

götürmektedir²⁵. Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır⁴⁶ (Tablo 1).

Tablo 1: Apoptozis ve Genler⁴⁶.

Apoptozisi Baskılayan Genler	Apoptozisi Uyarıcı Genler
<ul style="list-style-type: none">• Bcl 2 Grubundan; BHRL-1, bcl-x1, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1• c-abl geni• ras onkogeni• çözünebilir fas• p35• A20	<ul style="list-style-type: none">• Bcl 2 Grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk 1• c-myc• p53, p21• fas (CD 95/APO1)• FADD/MORT, RIP, FAST• İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (ICE)• LOH (MTS-1/CDK-41)

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (c-myc gibi) yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir⁴⁶.

Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur⁵³. Günümüzde bu çalışmalar; kanser, AIDS ve otoimmün bozukluklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi olanaklarını gündeme getirmektedir⁵⁴.

2.4. RESVERATROL

2.4.1. NİTRİK OKSİT

Bütün memeli hücreleri tarafından sentezlenebilen NO, kan damarları geriliminin düzenlenmesinden, sinirler arası iletişime ve savunma sistemine kadar pek çok fizyolojik olayda anahtar görevi gören bir moleküldür. Nitrogliserin gibi 1867'den beri kullanılan ilaçların yararlı etkilerinin NO üzerinden olduğu, ancak 100 yıl sonra farkedilebilmiştir⁵⁵.

NO'nun keşfi, 1979 yılında ABD'li araştırmacılar Furchgott ve Zawazki'nin ilginç bir gözlemi ile başlamıştır. Araştırmacılar, tavşan torasik aortasından hazırladıkları şeritleri, fizyolojik çözeltiyle doldurulmuş izole organ banyolarına uygun bir gerilimle takmışlar ve noradrenalin ile kastırmışlardır. Kasılma düzgün bir plato yaptıktan sonra uygulanan asetilkolin, doza bağımlı gevşeme oluşturmuştur. O güne kadar bilinen, önceden kasılmamış damar preparatlarında asetilkolinin kasılmaya neden olduğu şeklinde idi. Önceden kasılmış damar preparatlarında asetilkolinin yeni farkedilen bu gevşetici etkisi endotel varlığını gerektiriyordu. Çünkü endotel tabakası kazındığında bu etki ortadan kalkıyordu. Fizyolojik çözeltinin oksijenlenmesi bozulunca da gevşeme cevapları ortadan kalkmaktaydı. Furchgott, endotel hücrelerinden muskarinik reseptörlerin uyarılması sonucu salıverilen bu maddeye "endotel kökenli gevşetici faktör" adını verdi. Bu maddenin etkinliği oksihemoglobin ile bozulabiliyor, ama serbest oksijen radikalleri süpürücüsü SOD ile korunabiliyordu. Daha sonra, histamin, bradikinin, trombin, serotonin ve P maddesi gibi endojen vazoaktif maddelerin de endotele bağımlı gevşeme yanıtı oluşturabildiği gösterildi. Ayrıca, kan akışıyla ortaya çıkan basınç (makaslama basıncı, shear stress), hipoksi ve elektriksel uyarının da benzeri etkileri olduğu gösterildi⁵⁶.

Hücrelerde NO sentezi için kullanılan amino asit L-arjinin'dir. L-arjinin kimyasal olarak eşit 2 guanidin azotu taşımaktadır. Bu yapısıyla oksidasyona çok elverişlidir. L-arjinin'in guanido grubundaki nitrojenin hidroksilasyonu ile sentez başlatılır. Bu reaksiyonu, NOS enzimi gerçekleştirir. Reaksiyon sonunda

NO ve L-sitrülin elde edilir. Sitrülin, bir azot alarak L-arjinin'e geri dönüşebilir^{55,56}. NOS enziminin farklı izoformları vardır:

1. Sinir ve bazı hücre tiplerindeki (akciğer, pankreas, mide, uterus) nöronal NOS (nNOS, NOS1)
2. İmmünolojik uyarıyla indüklenen ve bütün çekirdekli hücrelerde bulunan indüklenebilir NOS (iNOS, NOS2)
3. Endotel hücrelerinde bulunan endotelial NOS (eNOS, NOS3).

Her üç NOS izoformunun aktivasyonu için de Ca'un kalmoduline bağlanması gereklidir. Fakat iNOS'un aktivasyonu için hücre içi Ca artışı gerekli değildir. Bu özelliği ile iNOS diğer izoformlardan ayrılır. iNOS sitokinler ve bakteriyel toksinlerle aktive olur, yapısal NOS (constitutive NOS (cNOS): nNOS ve eNOS) ise hücre içi Ca düzeyi artınca kalmodulin ile bir kompleks oluşturarak aktive olur. eNOS ve iNOS'un özellikleri tablo 2'de karşılaştırılmıştır⁵⁵.

Fazla sentezlenen NO, NOS üzerinde negatif feedback bir kontrol sağlayarak aşırı NO oluşumunu kontrol altında tutar.

Tablo 2: eNOS ve iNOS'un Özelliklerinin Karşılaştırılması

ÖZELLİK	eNOS	iNOS
Hücresel Kaynak	Endotel, Beyin Hücreleri NANK Sinirler	Makrofajlar, Kupfer Hücreleri, Damar Düz Kas Hücreleri
Aktivatörler	Asetilkolin, Histamin, Trombin	Glutamat, Kan Akışı, Makaslama Stresi
İndükleyiciler	Fiziksel Egzersiz	Lipopolisakkaritler, İnterferon γ , IL-1
Salınan Miktar	Az ve aralıklı (pikomol)	Bol ve uzun süreli (nanomol)
Hız Kısıtlayıcı	Ca-kalmodulin Bağlanması	Substrat ve Kofaktör Varlığı
Sentez İnhibitörü	L-Arginin Analogları	L-Arginin Analogları ve Glukokortikoidler
Önerilen Görev	Fizyolojik Düzenleme	Yabancı Mikroorganizmalara Karşı Savunma

2.4.1.1. NOS İnhibisyonu

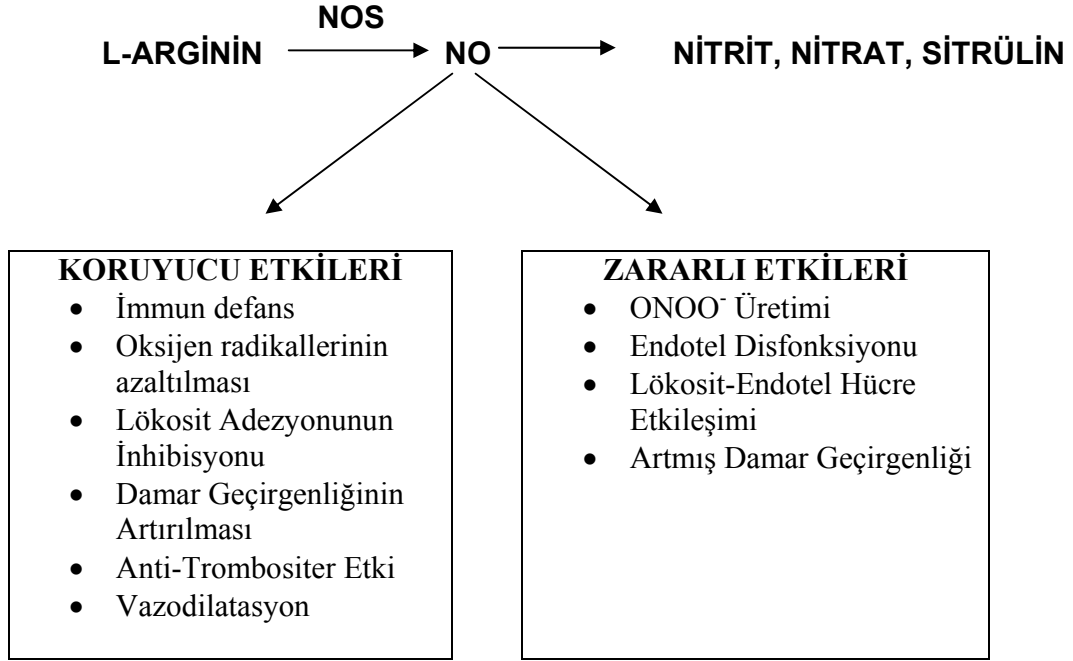
L-Arjinin'den NO sentezi, L-Arjinin analoglarıyla inhibe edilir. Bunlar arasında L-NAME, N^G-monometil-L-arjinin (L-NMMA) önemlidir⁵⁵.

2.4.1.2. NO Etki Mekanizması

NO, basit yapılı bir gaz olup, hem suda hem de yağda çözünebilen bir molekül olarak biyolojik zarlardan kolayca geçerek hedef moleküllere kovalent bağlarla bağlanır. NO, sentez edildikçe salınan bir molekül olup depolanmaz. Fazla miktarda oluşumu dokular için toksik olduğundan hızla etkisiz hale dönüştürülür. NO için klasik bir reseptör bölgesi yoktur; guanilil siklazın "hem" grubuna bağlanarak, hücre içi ikincil haberci molekül olarak çalışan cGMP'ın birikmesine neden olur. cGMP, miyozin hafif zincir kinazın defosforilasyonuna neden olarak düz kas gevşemesi yapar. Yarı ömrü kısadır (3-5 saniye) ve lokal olarak etkilidir. NO'nun antitrombositler, antimitojenik, sitotoksik vb. etkileri olduğu anlaşılmıştır. NO'nun ayrıca O₂⁻ akümüülasyonunu düzenlediği ve hücre membran geçirgenliğinin artışı engelleyici farkedilmiştir⁵⁶. Ancak NO'nun O₂⁻ ile etkileşime girerek ONOO⁻ oluşumu ile sonuçlanan sitotoksik etkileri de bulunmaktadır (Şekil 4).

NO'nun bazı etkilerine, K⁺ kanallarının açılması sonucu ortaya çıkan hiperpolarizasyon aracılık etmektedir. NO'nun, L tipi Ca kanallarından Ca girişini engellediği, intrasellüler depolardan Ca salıverilmesini önlediği ve intrasellüler depolara sarkoplazmik endoplazmik retikulum Ca-ATPaz aracılığıyla Ca depolanmasını arttırdığı yani sonuçta, hücre içi kalsiyumu düşürdüğü anlaşılmıştır⁵⁵. NO'nun plazma ve doku düzeyleri bazı dokularda IR'da azalır. NO seviyesindeki bu azalma endotelial hasar ve disfonksiyondan kaynaklanabilir. Bazı IR modellerinde L-Arjinin verilmesinin korunma sağladığı gösterilmişse de, in vivo olarak endotel hücreler tarafından NO üretiminde L-Arjinin ulaşılabilirliğinin hız kısıtlayıcı basamak olmadığı hususunda yeterli veri bulunmaktadır⁵⁵.

Şekil 4: NO'in Koruyucu ve Zararlı Etkileri



Bazı araştırmacılar, iskemik dokunun reperfüzyonu esnasında plazma nitrit-nitrat düzeylerinin arttığını göstermişler ve postiskemik dönemde NO metabolizmasının hızlandığını iddia etmişlerdir. Ancak bazıları da bu maddelerin düzeylerinde azalma bulmuşlardır. Nitrit ve nitratlar, NO ile O₂⁻ etkileşimi ve ONOO⁻ oluşumu sırasında da üretilirler. Bazı IR modellerinde, NO düzeylerindeki azalmanın NOS aktivitesinin düzeyindeki değişimleri yansıtabileceği söylenmiştir. Toplam eNOS aktivitesinin reperfüzyonu takiben azaldığı -bu azalma reperfüzyonun 2. saatinde anlaşılabilir- gösterilmiştir. Bu, L-NAME'in erken reperfüzyon döneminde verildiği zaman neden IR hasarını kötüleştirdiğini, ancak eNOS inhibe edildiği veya deprese edildiği 4. saatte neden etkisinin olmadığını açıklar⁵⁷. Bu bulgu aynı zamanda L-arjinin verilmesinin reperfüzyonun erken döneminde neden işe yaradığını ancak geç dönemde etkisinin olmadığını (enzimatik olarak L-arjinin'i NO'ya çevirecek eNOS ortamda bulunmamaktadır) da açıklayabilir.

iNOS'un dokularda saptanabilecek düzeye gelmesi için sitokinler veya endotoksin gibi bakteriyel ürünlerle en az 4 saat stimülasyon gereklidir. iNOS bir kez aktive oldu mu, sabit bir hızla 36 saate kadar L-arjinin'den NO salıverebilir. Bazı çalışmalar, birçok IR mediatörünün iNOS aktivitesini indüklediği halde, iNOS düzeyinin reperfüzyondan birkaç saat sonra azaldığını göstermiştir⁵⁷; bazı çalışmalarda ise iNOS aktivitesi görülmeden önce eNOS aktivitesinin arttığını ve reperfüzyonun 1.saatinde iNOS aktivitesinin gösterildiğini iddia etmişlerdir⁵⁸. iNOS aktivasyonunun, organ transplantasyonu sonrası oluşan değişiklikler gibi, IR'a kronik cevapta etkili olabileceği iddia edilmiştir.

2.4.1.3. Nitrik Oksitin Lökosit - Endotel İlişkisi ve Trombosit Fonksiyonlarındaki Rolü

L-Arjinin analogları ile NOS aktivitesinin inhibe edilmesi, vasküler endotele nötrofil adhezyonu ve interstisyuma migrasyonu gibi, iskemi sonrası görülen mikrovasküler ve inflamatuvar değişikliklere çok benzer etkiler gösterir. Mast hücre degranülasyonu ve trombosit-lökosit agregasyonu da IR hasarı ve NOS inhibisyonunda ortak gözlenen olgulardır. NO'nun IR hasarındaki rolüyle ilgili araştırmalar, NO-salan bileşiklerin lökosit-endotelyal hücre adhezyonu, trombosit-lökosit agregasyonu, mast hücre degranülasyonu ve artmış vasküler geçirgenlik gibi IR hasarı ile tetiklenen durumlarda NO'nun koruyucu özelliği üzerine yoğunlaşmıştır⁵⁹. NO'nun P-selektin yanı sıra, endotel hücrelerinde ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir^{60, 61}.

Aktive olmuş trombositler, adenozin difosfat ve serotonin salgırlar⁵⁵. Bu bileşikler endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanarak trombosit fonksiyonlarını ayarlayan NO oluşumu ve salınımını stimüle ederler⁶². NO, PGI₂ ile sinerjik davranır ve trombosit agregasyonunu engeller ve önceden oluşmuş olan agregatların çözünmesine yardımcı olur.

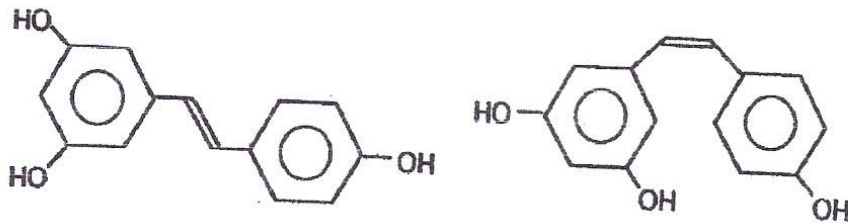
2.4.2. Resveratrol

Resveratrol, travmatik zedelenme veya fungal saldırılara karşı bitkiler tarafından sentezlenen flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir. Fitoaleksindenilen maddeler patojenik mikroorganizmalara karşı bitkiler tarafından korunma amaçlı üretilen kimyasal maddelerdir. "*Polygonum cuspidatum*" kökleri tarafından sentezlenir geleneksel doğu tıbbında bu bitkinin kökleri uzun zamandır kullanılmaktadır. Trans-resveratrol 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından "*Vitis vinifera*" bitkisinden izole edilmiştir ve bu araştırmacılar bileşiğin genellikle *Botrytis cinerea* adlı mantarın saldırısına karşı veya ultraviyole ışığa maruz kalan bitkinin yaprak dokularında üretildiğini bulmuşlardır. Resveratrol, 1992 yılında Siemann ve Creasy adlı araştırmacıların resveratrolün kırmızı şarabın içinde bulunduğu ve fransız paradoksundan sorumlu olduğunu iddia etmeleriyle dikkati çekmiştir⁶³.

3, 4', 5 trihidroksistilben ve 3, 4', 5 stilbenetriol adları ile bilinen resveratrol cis- ve trans- izomerik formlarında bulunur, ancak cis-izomeri üzüm ekstrelerinde bulunamamıştır. Resveratrol viniferinler isimli polifenol ailesinin ana molekülüdür (Şekil 5).

Resveratrolün molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$ 'tür ve molekül ağırlığı 228,25 Daltondur⁶⁷. Resveratrol en çok üzüm kabuğunda bulunmakla beraber üzüm meyvesinde ve yaprak saplarında, kökte, çekirdekte, yerbıstığında, kırmızı şarapta, dut meyvesinde ve "*Polygonum cuspidatum*" bitkisinin kök ve gövdesinde bulunur⁶².

Şekil 5: Trans- ve Cis- Resveratrol



Biyolojik Aktivite

Hiperlipidemik diyetle beslenen ratlarda, resveratrolün triaçilgliserol ve kolesterolün karaciğer tarafından akümülyasyonunu inhibe ettiği ve peroksidlenmiş yağla beslenen ratlarda karaciğer hasarını önlediği gösterilmiştir^{64,65}. Bertelli ve arkadaşları resveratrolün biyoyararlanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada 26 µg akut resveratrol dozu ve 15 günlük bir süreçte 13 µg'lık doz uygulaması yapılarak bileşimin hızla kana geçtiği ve tetkikinün mümkün olduğunu göstermişlerdir⁶⁶. Aynı grup, kardiyak biyoyararlanım ve böbrek ile karaciğere güçlü afinitiyi kanıtlamışlar; resveratrolün hem in vivo hem de in vitro düzeyde farmakolojik olarak aktif olduğunu göstermişlerdir⁶⁷. Resveratrolün temel biyolojik aktiviteleri tablo 3'de özetlenmiştir⁶²:

Tablo 3: Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri

RESVERATROLÜN TEMEL BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ
1. LİPİD PEROKSİDASYONUNUN İNHİBİSYONU (LDL VE MEMBRANLAR)
2. BAKIR ŞELASYONU
3. SERBEST RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ETKİ
4. TROMBOSİT AGGREGASYONUNUN İNHİBİSYONU
5. ANTI-İNFLAMATUAR AKTİVİTE
6. VAZORELAKSAN AKTİVİTE
7. LİPİD METABOLİZMASININ DÜZENLENMESİ
8. ANTI-KANSER AKTİVİTE
9. ÖSTROJENİK AKTİVİTE

Antioksidan Aktivite

Düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) özelliklerinin çoklu-doymamış yağ asitleri ile değiştirilmesi aterosklerozda önemli rol oynar⁶². Oksidasyon, LDL partiküllerinin, apo B proteinin içeriğini değiştirerek, apo B/E reseptör sistemi tarafından katabolizmasını engeller. Böylece fenolik bileşiklerce zengin yiyeceklerin koruyucu özellikleri antioksidan özelliklerine bağlanmıştır. Frankel

ve arkadaşları, LDL'ye trans-resveratrol eklenmesinin bakırın katalize ettiği oksidasyonu azalttığını göstermişlerdir⁶⁸. Resveratrol etkisini esas olarak bakırla şelasyon yaparak göstermektedir⁶⁹. Resveratrolün her iki izomerinin de eşit oranda serbest radikal süpürücü etkisi vardır ancak cis- izomerinin şelat yapma kapasitesi, trans- izomerinin yarısı kadardır. Resveratrol, membran lipidlerinin peroksidasyonunu inhibe eder, LDL'nin apo B proteinini okside etmesini önler ve apo B'nin intraselüler konsantrasyonlarını azaltır. Kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan monooksijenazı inhibe ederek kolesterol biyosentezini azaltır⁷⁰. Resveratrol, hücre membranlarını koruyarak yaşayan hücrelerde oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltmaktadır⁶². Chanvitayapongs ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada resveratrolün antioksidan ve antimutajenik özelliklerinin yanında hücre ölümünü de azalttığı gösterilmiştir⁷¹. Endotelial hücrelerde TNF- α ile indüklenen ICAM-1, VCAM-1 ve TF gen ekspresyonlarını azaltır⁷². Resveratrolün, NF κ B aktivasyonunu önleyerek endotoksinle indüklenen inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. NF κ B aktivasyonu, iNOS'un lipopolisakkarit tarafından indüklenmesi için gereklidir⁷³.

Trombosit Agregasyonunun İnhibisyonu

Trombosit agregasyonu, araşidonik asitten sentezlenen eikozanoidlere bağlıdır. Siklooksijenaz yolağıyla güçlü bir vazodilatör ve trombosit agregasyonunu inhibe edici bir madde olan PGI₂ ve güçlü bir agregan ve vazokonstriktör olan TxA₂ sentezlenir. Ayrıca lipoksijenaz yolağıyla hidroksiasitler (HHT, HPETE, HETE) ve lökotrienler üretilir. Kimura ve arkadaşları, resveratrolün lipoksijenaz ürünleri ve TxB₂ üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir⁶². Bir başka deyişle resveratrol hem lökosit hem de trombositlerde araşidonik asit metabolizmasını inhibe eder.

Östrojenik Aktivite

Resveratrol, östrojen reseptörüne bağlanarak onu aktive eder ve bu yüzden fitoöstrojen olarak da bilinmektedir. Trans-resveratrol ve dietilstilbesterol yapıca benzer⁶⁷.

Anti-Kanser Aktivite

Japonya'da *Yucca schidigera* ekstresi, bakteri hücrelerinde antimitojenik etki göstermiş ve ekstredeki resveratrolün hidroksil gruplarının bu etkiden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Resveratrolün, karsinojenlerin detoksifikasyonu, hücre farklılaşmasının indüklenmesi, arilhidrokarbonları genotoksik metabolitlere metabolize eden enzimlerin inhibisyonu ve arilhidrokarbon reseptör antagonizması, lösemi hücrelerinde ribonükleotid redüktaz inhibisyonu, p53 ve p21^{WAF1/CIP1} tümör baskılayıcı gen proteinlerinin artışı, hücre siklusunun S ve G₂ aşamalarında durdurulması, COX-2 inhibisyonu gibi çeşitli antimitojenik özellikleri vurgulanmıştır^{62,74,75}.

Vazorelaksan Aktivite

Resveratrolün vazodilatasyon etkisinin mekanizmaları halen araştırılmakla birlikte, bu etki araşidonik asit metabolizmasının inhibisyonuna ve NO sentezinin indüksiyonuna bağlanmıştır⁷⁶. Vasküler endotel, arter duvarının fizyolojik fonksiyonlarını sürdürmesinde, vasküler tonusun ayarlanması gibi, hayati öneme sahiptir⁷⁷. Endotelial hücreler NO ve endotelin gibi vasküler düz kaslara etki ederek arteriyal damar tonusunu ayarlayan vazoaaktif maddeler sentezler. Çeşitli mediatörler ve hormonlar (asetilkolin, bradikinin, insülin) ile aktivitesi artırılabilen NOS'a endotel cevabının ateroskleroz, obesite, tip II diabetes, hipertansiyon ve hiperkolesterolemide bozulduğu gösterilmiştir⁷⁶. L-NAME ile resveratrol-bağımlı vazorelaksasyonun önlenmesi, resveratrolün endotelden NO salınımı yoluyla etkisini gösterdiğini göstermiştir⁷⁶. Naderalı ve arkadaşlarının domuzlarla yaptığı çalışmada, noradrenalin veya potasyum klorür ile kastırılmış arterlerde resveratrolün doz-bağımlı olarak hem rezistans hem de konduktan arterlerde vazodilatasyon yaptığı ancak rezistans damarlarda bu etkinin daha belirgin olduğu gösterilmiştir⁷⁵. Resveratrolün vasküler etkilerinin hem endotel-bağımlı [düşük resveratrol konsantrasyonlarında belirgindir ve NOS inhibitörleri (L-NAME) ile bloke edilebilir.] hem de endotel-bağımsız (yüksek resveratrol konsantrasyonlarında açığa çıkar ve NOS inhibitörleri veya endotel

hasarı ile bloke edilemez.) olduğu düşünülmektedir⁷⁵. Endotel-bağımsız mekanizmada, resveratrolün vazodilatör etkileri olan cAMP ve cGMP yıkımını inhibe etmesi ve guanilil siklaz aktivasyonu öne sürülmüştür. Endoteli alınmış aort parçalarında siklik nükleotid fosfodiesteraz inhibitörlerinin dilatasyonu indüklemesi bu fikri doğrulamıştır⁷⁵. Resveratrolün ayrıca düz kas hücre membranı ile, bir membran reseptörü veya kalsiyum kanalları yoluyla, birleşerek vazorelaksan aktiviteyi indüklediği öne sürülmüştür⁷⁵.

Yapılan çalışmalarda resveratrolün domuz trakeal düz kaslarında antijen ile indüklenen kontraksiyonları, izole rat aortasında fenilefrin ile indüklenen kasıcı cevabı ve izole domuz koroner arterlerinde histamin veya flor ile indüklenen vazokonstriksiyonu değiştirdiği rapor edilmiştir⁷¹.

Fang-Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada endotel hücrelerde resveratrolün geri-dönüşümlü olarak K^+ dışı akım büyüklüğünü arttırdığı, konsantrasyon ve voltaj bağımlı olarak K^+ -bağımlı büyük-konduktan Ca^{++} kanallarının (BK_{Ca}) aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir⁷¹. Yazarlar resveratrolle indüklenen BK_{Ca} kanal aktivasyonunu, kanalın açık ve kapalı kalma sürelerindeki kısalmaya bağlamışlardır. BK_{Ca} kanal aktivasyonunun yarattığı membran hiperpolarizasyonu ve takiben K^+ dışı akımının yarattığı myoendotelial aralıkta K^+ konsantrasyonunu artırarak vasküler miyositleri hiperpolarize akımının etkilenmediğini görerek vazodilatör etkinin östrojen reseptörlerinden bağımsız olduğunu ileri sürmüşlerdir⁷¹. Yazarlar, resveratrolün östrojen agonist etkisini göz önüne alarak, bir östrojen reseptör antagonisti olan tamoksifen kullanmışlar ve dışarı K^+ akımının etkilenmediğini görerek vazodilatör etkinin östrojen reseptörlerinden bağımsız olduğunu ileri sürmüşlerdir⁷¹.

2.5. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARININ KLİNİK YANSIMALARI

İskemi-reperfüzyon hasarı günümüzde klinik olarak kalp ve beyin başta olmak üzere tüm organların iskemik durumlarını takip eden, örneğin stent uygulaması, anjioplasti ya da fibrinolitik tedavi sonrası reoksijenasyonunda, viseral dokuların allotransplantasyonunda, hemorajik şokta, plastik cerrahide replantasyon ve mikrovasküler flep cerrahisinde karşımıza çıkmaktadır⁷⁸.

Nekrotizan enterokolit, inflamatuvar barsak hastalıkları, pull-through ameliyatları, strangüle herniler, serbest pediküllü barsak flebi kullanımı ve barsak transplantasyonu durumlarında da iskemi/reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir. Bu patolojilerden, klinik olarak sıklıkla karşımıza çıkan nekrotizan enterokolit, yenidoğan döneminde özellikle prematürlerde görülen tıbbi ve cerrahi bir sorundur. Yüzyılı aşkın klinik birikim ve literatürler ile modern anlamda ilk raporların yayınlandığı 1965'ten günümüze kadar, hala patogenezi tam olarak açıklanamamış, önlem tedbirleri tartışmalı, morbidite ve mortalite açısından önemli bir problemdir.

İlk olarak 19. yüzyılda tanımlanmıştır. Tutulum bölgesi sıklıkla terminal ileumdur. İntestinal iskeminin başlamasında tetiği çeken faktörlerin neler olduğu henüz tam açıklık kazanmamıştır; ancak faktörlerin ulaştığı ortak yol intestinal iskemidir.

ABD'de NEK insidansı, her 1000 canlı doğumda 1-3, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde yatan yenidoğanlarda da %0.8-8, ortalama % 2-4 arasındadır. Ancak gerçek insidansının bunun çok daha üzerinde olduğu sanılmaktadır. NEK genellikle posnatal 10. günden ve özellikle de enteral beslenme başladıktan sonra ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle popülasyon ilk günlerde ölen bebekler hariç tutularak sadece enteral beslenen bebeklerden oluşturulduğunda NEK sıklığı %15'e çıkmaktadır. Prematürite insidansının düşük olduğu ülkelerden Japonya'da yapılan çok merkezli bir çalışmada NEK sıklığı %0.3 bulunmuştur.

Semptomlar bebeklerin %90'ında yaşamın ilk 10 günü içinde ortaya çıkar. Prematüre bebeklere nazaran miadında doğmuş bebeklerde semptomlar daha erken ortaya çıkmaktadır. Hastalık ne kadar erken ortaya çıkarsa komplikasyon ve mortalite oranı o kadar yüksek olmaktadır.

Çok sayıda klinik ve deneysel çalışmaya rağmen NEK patogenezi gizemini sürdürmektedir. Hastalığın ortaya çıkışından barsak mukozası kan akımını azaltan durumların, hipoksinin, prematür bebeğin barsak motilitesindeki bozukluğun ve immatür bir mukozal bariyere sahip olmasının, hiperozmolar beslenmenin ve bazı enfeksiyon ajanlarının sorumlu olduğu sanılmaktadır. Ancak benzer koşullarda bulunan pek çok başka yenidoğanda NEK'in neden ortaya çıkmadığı bilinmemektedir.

Etiyopatogenezinde birçok risk faktörü mevcuttur.

İndirekt Risk Faktörleri:

Vazospazm → Dalma refleksi, umbilikal arter kateterizasyonu, hipotermi, şok

Tromboz → Exchange transfüzyon, polisitemi, trombositoz,

Hipovolemi → Hipotansiyon, asfiksi, PDA, RDS

Direkt Risk Faktörleri:

Bakteriler, viruslar, hipertonic beslenme.

Yukarıda belirtilen risk faktörlerine rağmen son yıllarda hiç mama verilmemiş ve hatta belirgin iskemik problemlere maruz kalmamış prematürelere de NEK izlenmesi acaba patogeneizde değişmesi gereken özellikler mi var konusunu gündeme getirmiştir. Yeni epidemiyolojik çalışmalar NEK için primer faktörün prematürite olduğunu ortaya koymaktadır. Günümüzde de mortalite ve morbiditesi yüksek seyreden, nekrotizan enterokolit ile ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Deney, Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra ağırlıkları 180-220 gr arasında değişen, Wistar albino cinsi, 35 erişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

3.2. Deney Grupları

Sıçanlar randomize olarak 5 eşit gruba ayrıldı (Tablo 4).

Tüm gruplarda 1 saat reperfüzyon yapıldı ve deney sonunda denekler sakrifiye edilerek 3 cm.lik terminal ileal segment histolojik inceleme için alındı.

Tablo 4: Gruplar

Gruplar	Sayı	Yapılan işlem + Uygulanan ilaç
Grup 1	7	Laparotomiye takiben superior mezenter arterin (SMA) eksplorasyonu yapılarak kontrol grubu olarak ayrıldı.
Grup 2	7	SMA buldog klemple ile oklüze edilerek batın kapatıldı ve 30 dakika beklendi. Ardından batın tekrar eksplore edilerek buldog klemple açıldı ve reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon sonrası intraperitoneal yoldan 10 ng/kg dozdan Resveratrol uygulandı.
Grup 3	7	SMA buldog klemple ile oklüze edilerek batın kapatıldı ve 120 dakika beklendi. Ardından batın tekrar eksplore edilerek buldog klemple açıldı ve reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon sonrası intraperitoneal yoldan 10 ng/kg dozdan Resveratrol uygulandı.
Grup 4	7	SMA buldog klemple ile oklüze edilerek 30 dakika beklendi. Ardından batın tekrar eksplore edilerek buldog klemple açıldı ve reperfüzyon uygulandı.
Grup 5	7	SMA buldog klemple ile oklüze edilerek 120 dakika beklendi. Ardından batın tekrar eksplore edilerek buldog klemple açıldı ve

		reperfüzyon uygulandı.
--	--	------------------------

3.3. Deneysel İşlemler

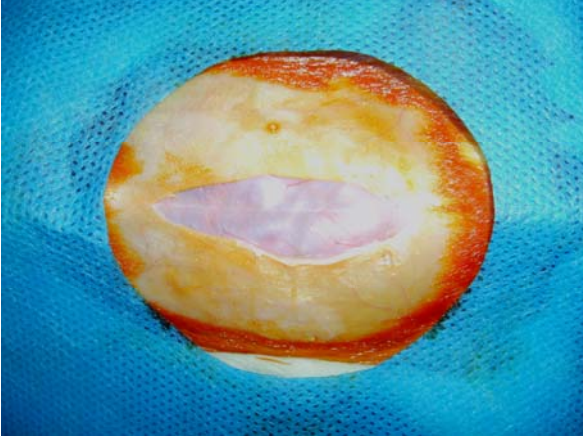
Deneysel işlem, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Hayvanlara anestetik indüksiyon için ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) intramusküler olarak verildi. Denekler oda havası soludular. Sıçanlar supin pozisyonda iken ekstremiteleri zemine bant ile tespit edildi. Sıçan karın bölgesi tıraş edildikten sonra povidon iodin emdirilmiş steril gazlı bez ile temizlendi. (Şekil 6)

Şekil 6: Supin pozisyonda zemine bant ile tespit edilen sıçanlar



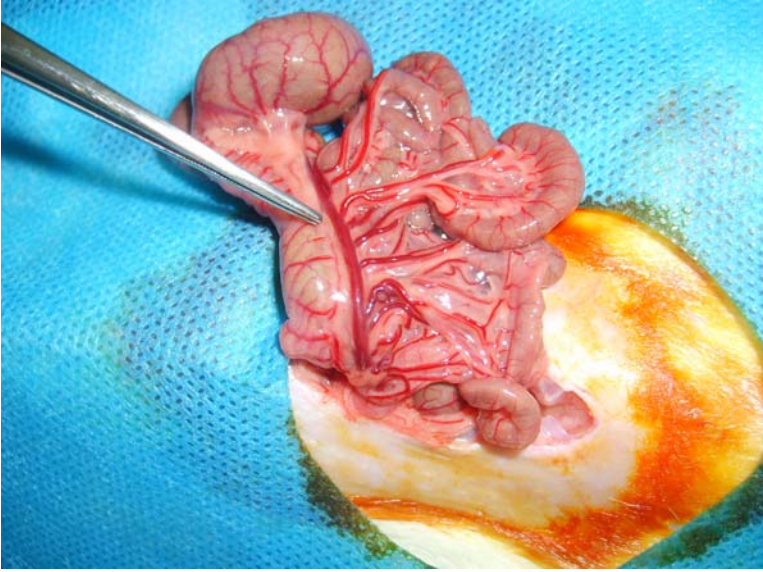
Steril koşullarda, ortalama 5 cm. uzunluğunda, median laparotomi insizyonu yapılarak batına girildi (Şekil 7).

Şekil 7: Median laparotomi insizyonu yapılan sıçanlar



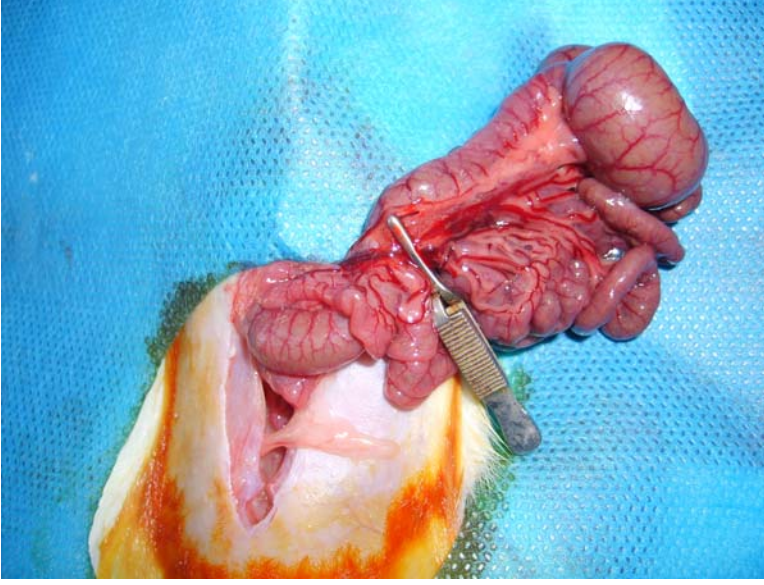
Batın eksplere edilerek ileoçekal valv ve superior mezenterik arter ortaya kondu. (Şekil 8)

Şekil 8: İleoçekal valv ve superior mezenterik arter eksplorasyonu



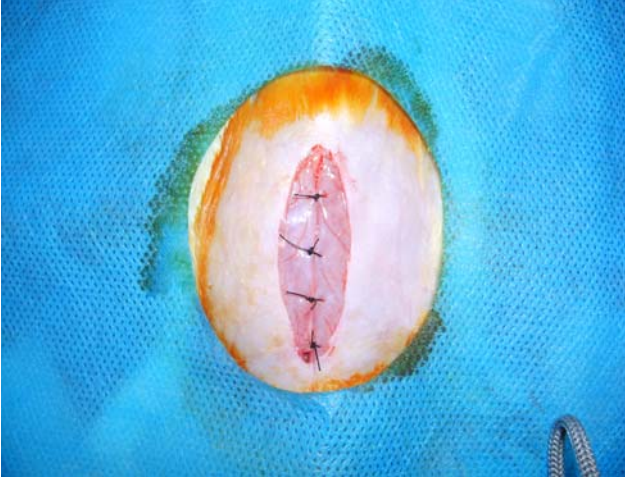
Ardından buldog klempler yardımıyla superior mezenterik arter oklüze edildi. (Şekil 9)

Şekil 9: Superior mezenterik arter oklüzyonu



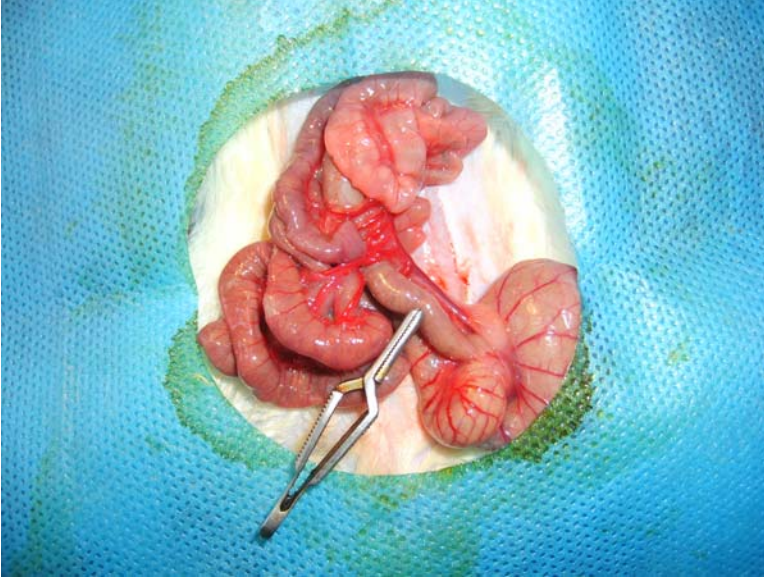
Bağırsaklar batın içine redükte edildi ve batın kapatıldı. (Şekil 10)

Şekil 10: Bağırsakların batın içine redüksüyonu ve batının kapatılması



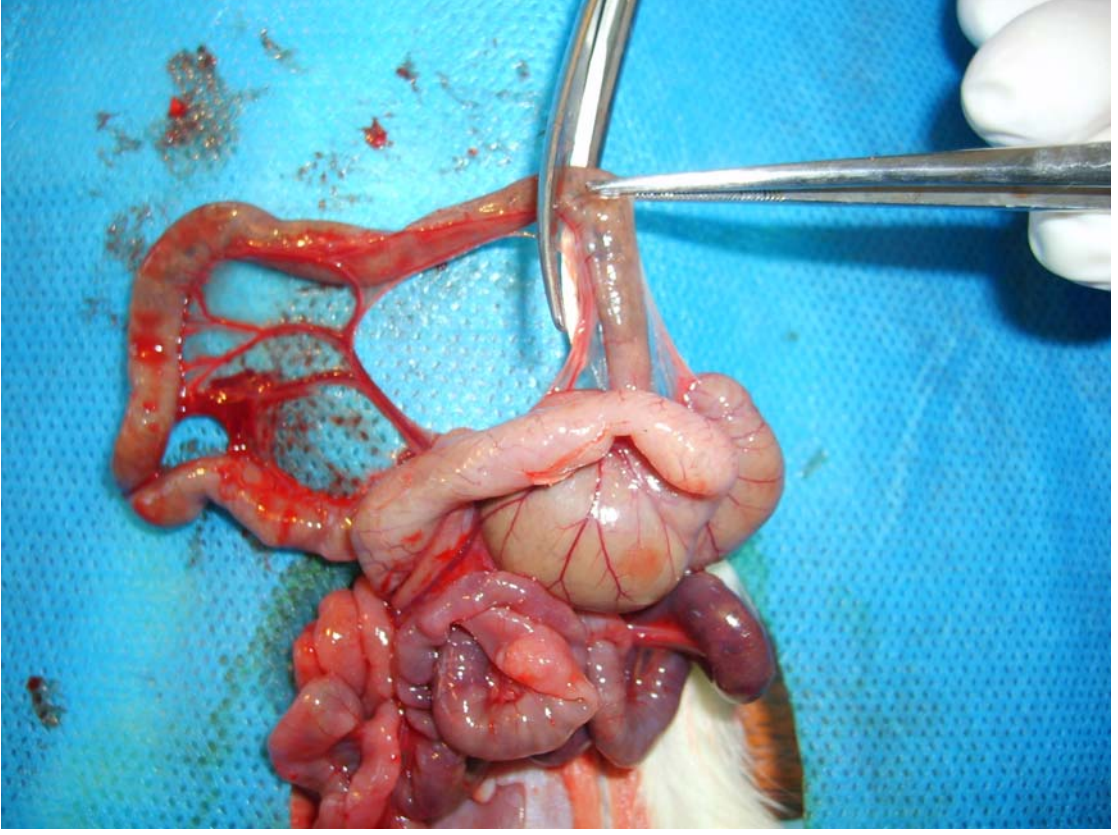
İskemik hasar oluşturulması amacıyla grup 2 ve 4 için 30 dakika ve grup 3 ve 5 için 120 dakika beklendi. Ardından batın tekrar eksplore edilerek buldog klempler açıldı ve reperfüzyon sağlandı. Bu arada grup 2 ve 3'e 10 ng/kg dozdan intraperitoneal yolla resveratrol uygulaması yapıldı. Yaklaşık 60 dakika süren reperfüzyon sonrası batın tekrar eksplore edilerek terminal ileum ortaya kondu. (Şekil 11)

Şekil 11: Superior Mezenterik Arter'in Reperfüzyonu



Deney sonunda denekler sakrifiye edilerek yaklaşık 3 cm.lik terminal ileal segment histopatolojik inceleme için alındı. (Şekil 12)

Şekil 12: Yaklaşık 3 cm.lik terminal ileal segmentin eksizyonu



3.4. Histolojik Değerlendirme

Denekler deney sonucunda servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Her bir gruptan alınan ileum örnekleri direkt %10' luk formalin solüsyonu içerisinde

24-48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu. Alınan kesitler dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin ile boyanır iken, diğer kesitler apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL yöntemi, doku enflamasyon mekanizmalarının açıklanabilmesi için TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 dağılımları indirekt immunoperoksidaz tekniği ile incelendi.

3.4.1. Parafin doku takibi

Tespit edilen ileum örnekleri, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 15'er dakika %60'dan %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 15 dakika 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 30'ar dakika parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 5).

Tablo 5: Parafin doku takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat

Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	15 dk
	% 70 etil alkol	15 dk
	% 80 etil alkol	15 dk
	% 95 etil alkol	15 dk
	% 95 etil alkol	15 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen – Alkol	15 dk
	Ksilen	15 dk
	Ksilen	15 dk
Emdirme %60 C etüv	Ksilen parafin	15 dk
	Parafin	30 dk
	Parafin	30 dk
Gömme	Parafin	

3.4.2. Hematoksilen-Eozin boyaması:

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5µ' luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30' ar dakikalık iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidrasyon işlemi için %95' den %60' a azalan oranlarda alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dk akar su altında yıkandı. 2 dk hemotoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dk akar suda yıkanma yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95' lik alkol serilerinde geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dk iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 6).

Tablo 6: Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
-------	-------	------

Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
	% 80 alkol	1 dakika
	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.4.3.TUNEL Boyaması:

Bu teknik için Dead-End Colorimetric TUNEL system kiti (Apoptag, Peroksidase Insitu Detection Kit, 90419, Chemicon, Temecula, CA) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak fosfat tampon solüsyonunda (PBS: Posphate buffer solution) 5 dk yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında 15 dk 20 µg/ml proteinase K ile inkübe edilen kesitler 3 defa 5' er dk PBS ile yıkandı. Endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulanan kesitler PBS ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkandı. Equilibration tampon solusyonu ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilen kesitler, TdT enzimi ile 37 °C de 1 saat bekletildi. Kontrol boyama kesitleri TdT enzimi konmayıp, sadece reaksiyon solusyonunda bekletildi. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında 10 dakika tampon solüsyonu ile, 3 defa 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Anti-digoxigenin konjugat solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen kesitler 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. TUNEL reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacı ile kesitler 5 dakika diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL pozitif hücre sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda Image-Pro Plus 5.1.2 hüce sayım programında her gruptan her bir denkten alınan kesitlerde en az 5 farklı alanda boyalı ve boyanmayan hücreler belirlenerek sayım yapıldı (Tablo 7)

Tablo 7: TUNEL boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K solusyonu	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	% 3'lük hidrojen peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Tamponlama	Equilibration tampon sol.	5 dk
Primer antikor	Enzim solusyonu	37°De 1 saat
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Anti-digoxigenin konjugat	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB boyası	10 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt boyama	Mayer hematoksilen	4 dakika
İşlem	Madde	Süre
Dehidratasyon	%80- %90'lık alkol serileri	2 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika
Kapama	Entellan	

3.4.4. İndirek İmmunohistokimya boyaması:

Alınan ileum kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS; ile yıkanan kesitler 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edidi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolarlar anti-TNF- α (HP8001, Hycult Biotechnology, Uden The Netherlands), anti-IL-1 β (sc-7884, Santa Cruz, California, USA), anti-IL-6 (ab6672, Abcam, Cambridge, UK) ve anti-IL-8 (H0000357-M05, Abnova, ...) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, biotinylated anti-mouse ve anti-rabbit, conjugated streptavidin-horsedish peroxidase solüsyonları ile (KP-500, Universal Phosphatase Kit, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) 30'ar dakika boyandı. Her bir ikincil antikor 3 defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla kesitler DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (H701, CC/Mount, Universal Phosphatase Kit, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) ile kapatıldı (Tablo 8).

Tablo 8: İndirek immunohistokimyasal boyama

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Bcl-2, p53, Bax	2 saat, 4°de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	AEC	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Kapatma maddesi	

3.4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Renk ayrımı kullanılarak sayım yapılan histolojik kesitlerde TUNEL sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda her bir alanda görülen hücrelerden 100 hücre sayılarak, bunlardan kaçının pozitif oldukları sayıldı. Bu sayım işlemi, her bir örnekte farklı 5 alanda sayılarak değerlendirildi. Elde edilen değer % olarak verildi.

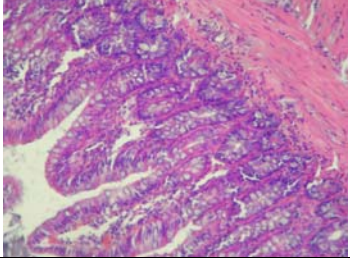
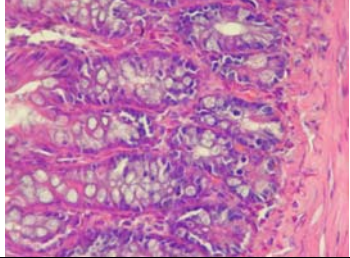
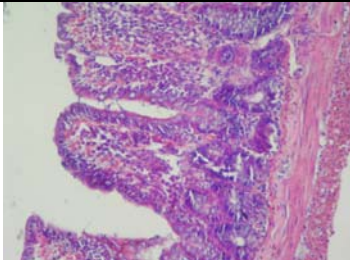
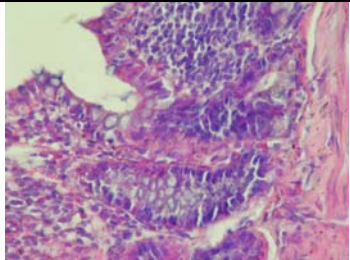
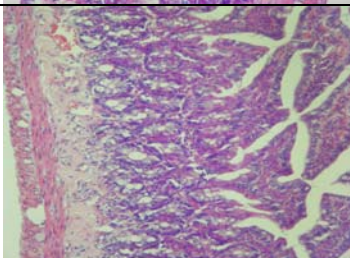
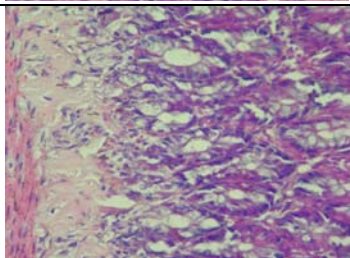
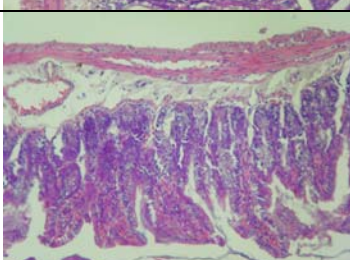
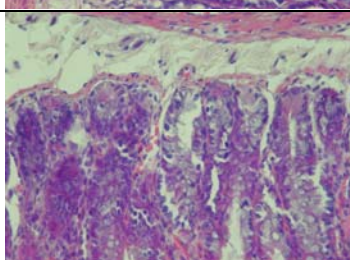
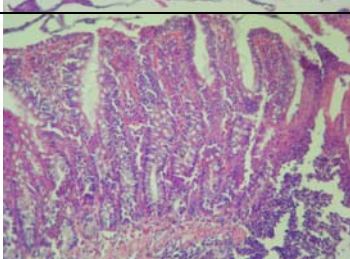
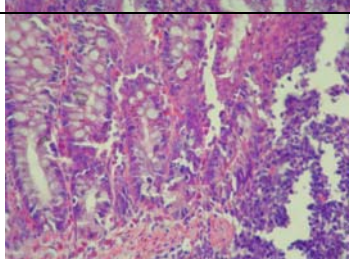
İmmunohistokimyasal değerlendirme yine iki farklı histolog tarafından ayrı zamanlarda incelenerek çok zayıf (-/+), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi. Veriler nonparametrik ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. Mean±SEM olarak verilen değerlendirmelerin karşılaştırılmasında $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histokimyasal İnceleme

İleum dokusunun histolojik yapısı incelendiğinde, üç tabakadan oluştuğu gözlenmektedir; Tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya. Tunika mukoza tabakasının epitelyum ve lamina propriadan oluştuğu gözlenmektedir. Tüm grupların epiteli incelendiğinde tek katlı prizmatik epitelyum ile döşeli olduğu ve tüm gruplarda normal yapısını koruduğu gözlenmektedir. Bununla beraber epitelyum tabakasında goblet hücreleride seçilmektedir. Epitel villus ve kriptalardan oluşmaktadır. Tüm gruplarda villusların parmaksı çıkıntılar şeklinde olduğu ve kriptalarda da intestinal bezlerin varlığı tespit edildi. Lamina propria tabakası bağ dokusu elemanlarından oluşmaktaydı. Bununla beraber peyer plaklarında normal yapıda gözlendi. Hiçbir grupta lamina propria tabakasında PNL infiltrasyonu gözlenmedi. Tunika muskularis tabakası ise tüm gruplarda içte sirküler, dışta longitudinal şekilde düzenlendiği ve tüm gruplarda normal yapısını koruduğu gözlenmekte idi. Tunika adventisya tabakası da bağ dokusu elemanlarından oluşmuş olup tüm gruplarda normal olarak izlendi (Şekil 13).

Şekil 13: Tüm gruplara ait ileum örneklerinin histokimyasal olarak değerlendirilmesi. Hematoksilen-Eozin.

Gruplar	X200	X400
Grup 1		
Grup 2		
Grup 3		
Grup 4		
Grup 5		

4.2.TUNEL Tekniği ile İnceleme

TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) boyaması ile yapılan apoptotik hücrelerin belirlenmesi çalışmasında, TUNEL pozitif hücreler çekirdekleri kahverengi boyalı olarak gözlenen hücrelerdir. Tüm gruplarda apoptotik hücrelerin hem epitel hem lamina propriada olduğu gözlemlendi. Epiteldeki apoptotik hücrelerin hem villus hem de kripta bulunan hücrelerde olduğu saptandı. Bununla beraber lamina propriadaki apoptotik hücre sayısının tüm gruplarda epiteldeki apoptotik hücre sayısından daha az olduğu gözlemlendi. 30 dakika klempten sonra Resveratrol uygulanan grup (grup 2), sadece 30 dk klempten uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında (Grup 4) TUNEL pozitif hücre sayısının daha az olduğu izlendi. Bununla beraber 120 dakika klempten sonra Resveratrol uygulanan grup (grup 3), sadece 120 dk klempten uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında (Grup 5) ise yine TUNEL pozitif hücre sayısının daha az olduğu gözlemlendi. Bununla beraber 30 dk klempten uygulanan gruplar ile (Grup 2,ve Grup 4), 120 dakika klempten uygulanmış gruplar ile karşılaştırıldığında (Grup 3 ve Grup 5) TUNEL pozitif hücre sayısının 120 dakikalık gruplarda daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 14). Her bir alandaki hücreler sayılıp, istatistiksel analiz yapıldığında, TUNEL pozitif hücre sayısının Grup 1'de % 4.0 ± 0.52, Grup 2'de % 12.83 ± 0.60, Grup 3'de % 34.17 ± 1.56, Grup 4'de % 39 ± 1.44 ve Grup 5'de % 43.5 ± 1.80 hesaplandı. Tüm sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir. Elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise, Grup 4 değerlerinin grup 3 ve 5 değerleri ile arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (P>0.05), tüm diğer verilen karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu (P<0.001) saptandı. Sham grubunda TUNEL pozitif hücre sayısı en az olması ve diğer gruplar ile olan verilen değerlendirilmesinde, çalışma gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısının artmış olduğunda istatistiksel olarak desteklemektedir. Bununla beraber Resveratrol uygulanan 30 dk klempten uygulanmış grupta TUNEL pozitif hücre sayısının Resveratrol uygulanmamış gruba oranla daha fazla olduğu ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Fakat 120 dakika

klemp uygulanan grupta Resveratrol tedavisinde TUNEL pozitif sayısı artmış olarak görülmesine rağmen, Resveratrol uygulanmamış grupta TUNEL pozitif sayısı daha da fazladır. Buda göstermektedir ki Resveratrol uygulanması apoptotik mekanizmayı durduramasa bile, bir miktar azaltmıştır, ayrıca erken dönemdeki etkisi uzun döneme oranla daha fazladır ve gecikmiş bir apoptozise neden olduğu düşünülmüştür.

Tablo 9: Grupların Karşılaştırmalı İstatistiksel Sonuçları

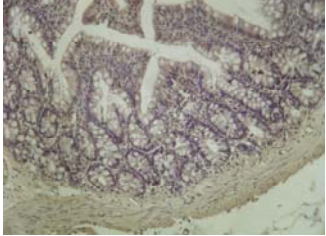
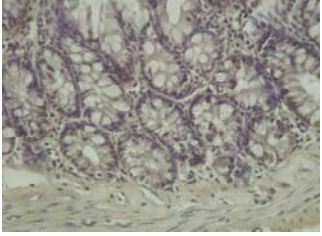
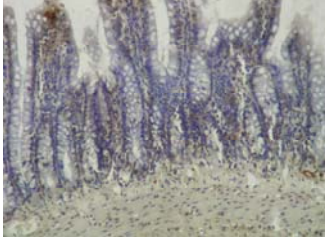
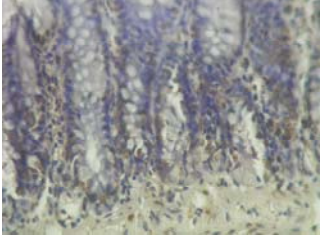
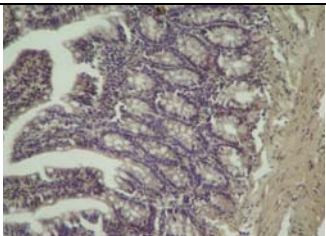
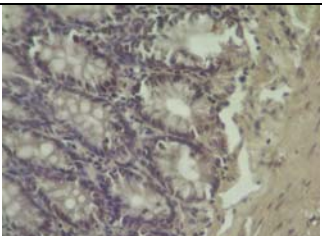
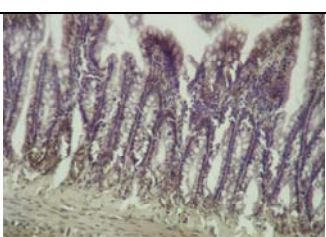
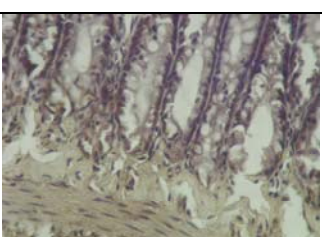
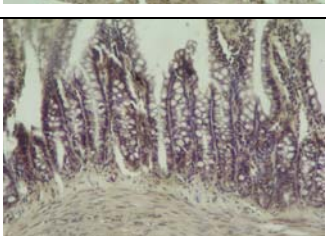
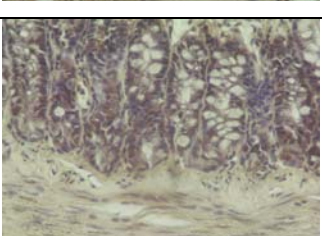
Karşılaştırılan Gruplar (Apoptozis)	İstatistiksel Anlamlılık
grup 1 - grup 2	*** P<0.001
grup 1 - grup 3	*** P<0.001
grup 1 - grup 4	*** P<0.001
grup 1 - grup 5	*** P<0.001
grup 2 - grup 3	*** P<0.001
grup 2 - grup 4	*** P<0.001
grup 2 - grup 5	*** P<0.001
grup 3 - grup 4	ns P>0.05
grup 3 - grup 5	*** P<0.001
grup 4 - grup 5	ns P>0.05

Tablo 10: İleum örneklerinde TUNEL boyaması sonucunda pozitif hücre oranları

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
TUNEL %	4.0 ± 0.52	12.83 ± 0.60	34.17 ± 1.56	39 ± 1.44	43.5 ± 1.80

Grup 3 değerinin Grup 4, Grup 4 değerinin de Grup 5 ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlam gözlenmez iken (P>0.05), diğer tüm verilen karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlamlı (P<0.001) bulunmuştur.

Şekil 14: Tüm gruplara ait ileum örneklerinin TUNEL tekniği ile değerlendirilmesi.

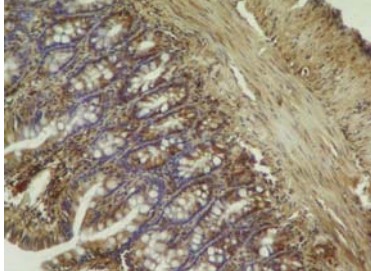
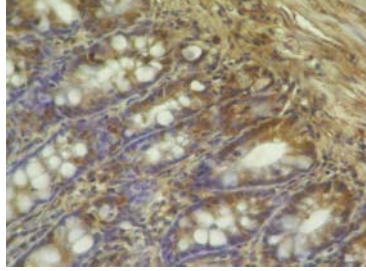
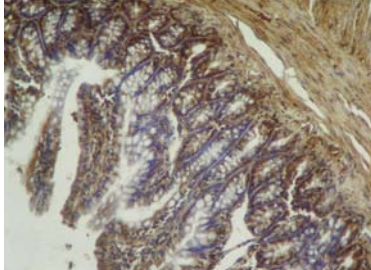
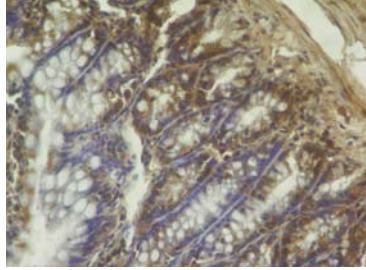
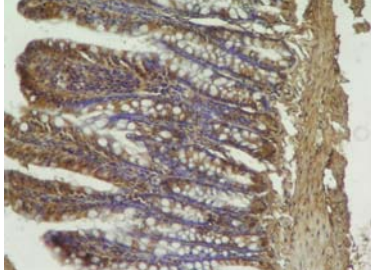
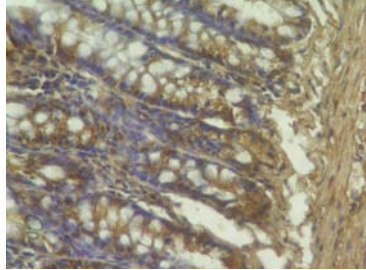
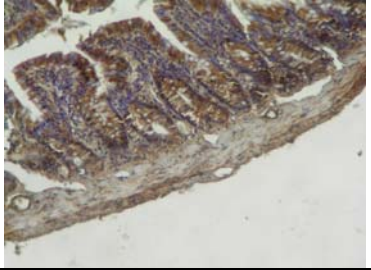
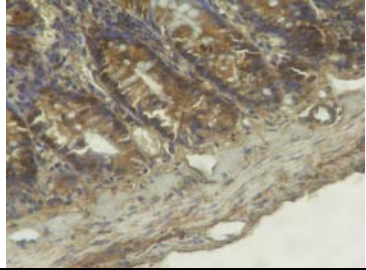
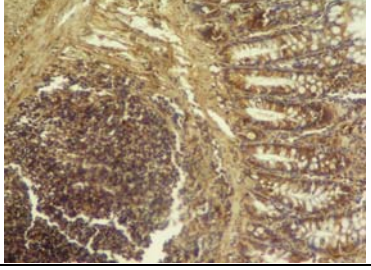
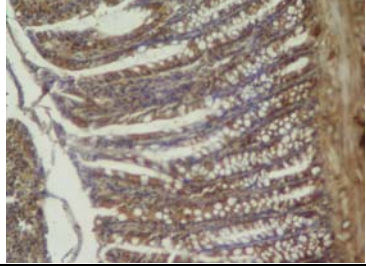
Gruplar	X200	X400
Grup 1		
Grup 2		
Grup 3		
Grup 4		
Grup 5		

4.3.İmmunohistokimya Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deneysel işlem sonucunda ileum örneklerindeki apoptotik mekanizmanın yanı sıra sitokin salınımı açısından TNF- α , IL-1 β , IL-8 ve IL-6 ve IL-10 dağılımlarına bakıldı.

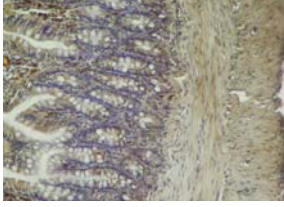
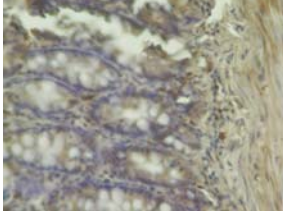
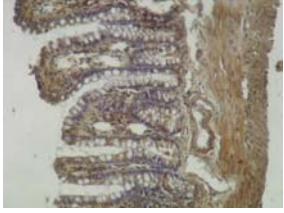
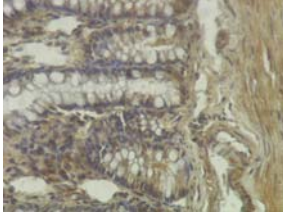
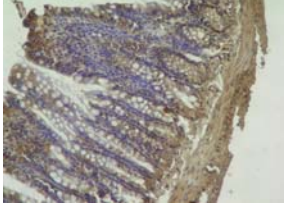
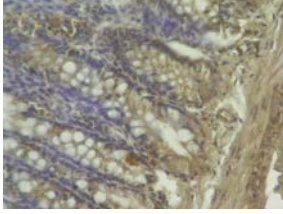
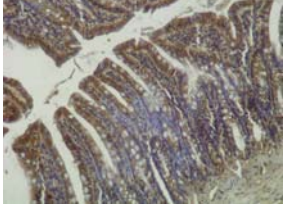
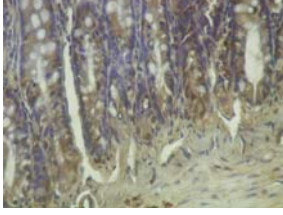

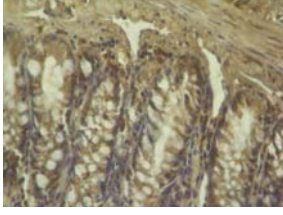
TNF- α Dağılımı: Tüm gruplarda TNF- α dağılımının pozitif olduğu gözlemlendi. TNF- α immunoreaktivitesinin esas olarak epitelyum tabakasında olduğu, lamina propriada ise yer yer bazı hücrelerde olduğu saptandı. Bununla beraber peyer plağındaki hücrelerde de yer yer pozitif olduğu izlendi. Grup 1 de immunoreaktivite şiddeti orta şiddette iken (++) , grup 2 ve 3'de TNF- α immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) , yer yer ise kuvvetli pozitif (+++) olduğu gözlemlendi. Grup 4'de TNF- α immunoreaktivitesinin grup 2 ve 3 ile benzer iken, grup 5 de TNF- α immunoreaktivitesinin tüm alanlarda kuvvetli pozitif (+++) olduğu saptandı. (Şekil 15).

Şekil 15: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde TNF- α dağılımı. X400

Gruplar	X200	X400
Grup 1		
Grup 2		
Grup 3		
Grup 4		
Grup 5		

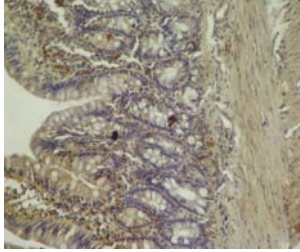
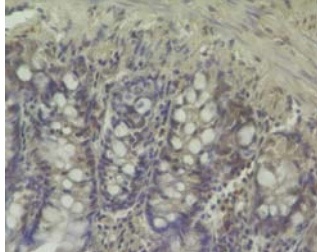
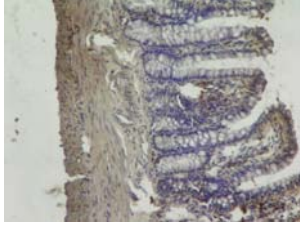
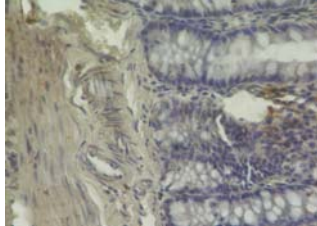
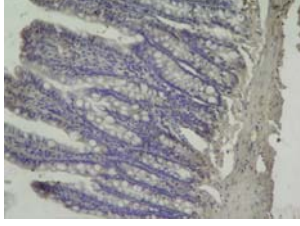
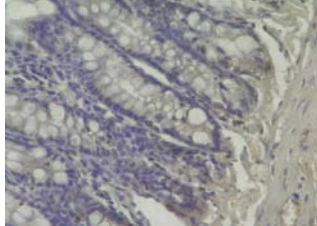
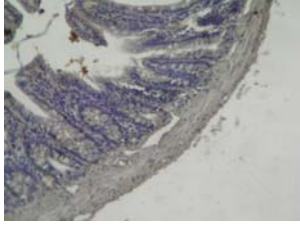
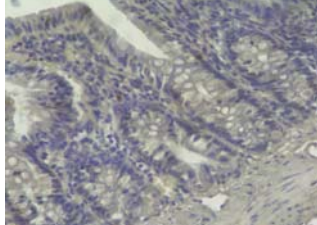
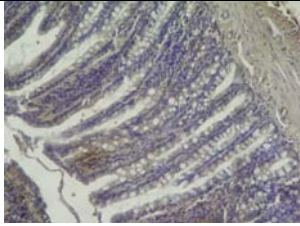
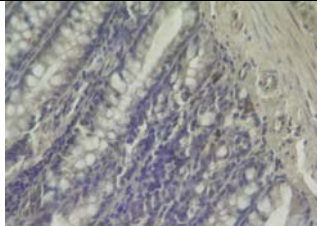
IL-1 β Dağılımı: IL-1 β immunoreaktivitesinin tüm gruplarda hem Tunika mukoza hem de Tunika muskularis tabakasında olduğu gözlemlendi. Grup 1'de IL-1 β immunoreaktivitesinin her iki tabakada da orta şiddette (++) yer yer ise zayıf şiddette (+) olduğu izlendi. Grup 2 de ise IL-1 β immunoreaktivitesinin hem tunika mukoza hem de tunika muskularis tabakasında orta şiddette (++) , yer yer şiddetli pozitif (+++) olduğu gözlemlendi. Grup 3'de IL-1 β immunoreaktivitesinin grup 1 le benzer olduğu yer yer zayıf şiddette (+) yer yerde orta şiddette olduğu (++) gözlemlendi. Grup 4 de ise IL-1 β immunoreaktivitesinin tunika mukoza tabakasında orta şiddette (++) iken, tunika muskularis tabakasında negatif (-) olduğu gözlemlendi. Grup 5 de ise IL-1 β immunoreaktivitesinin her iki tabakada da gözlemlendiği ve orta şiddette (++) olduğu saptandı. (Şekil 16).

Şekil 16: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde IL-1 β dağılımı. X400

Gruplar	X200	X400
Grup 1		
Grup 2		
Grup 3		
Grup 4		
Grup 5		

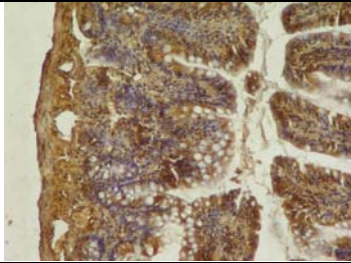
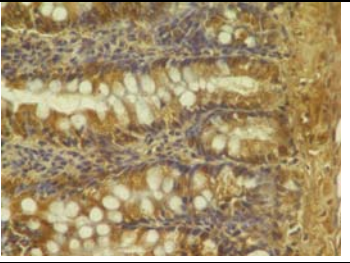
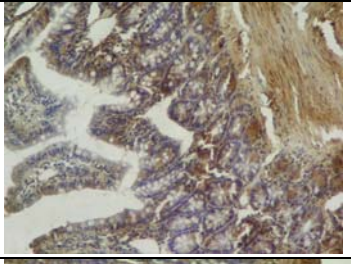
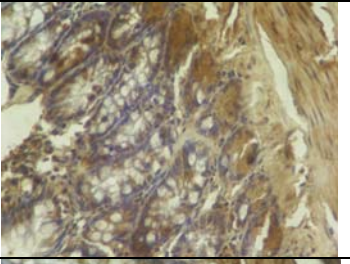
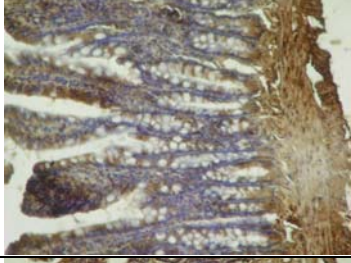
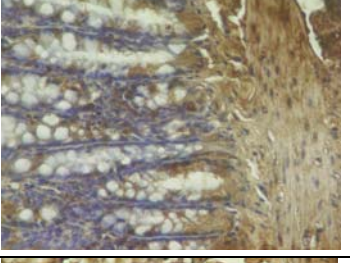
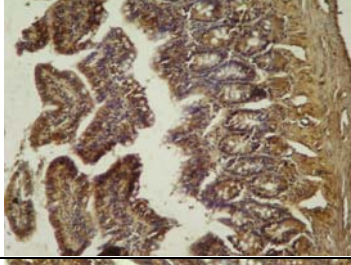
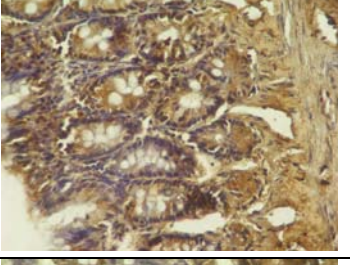
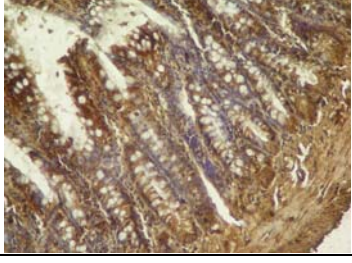
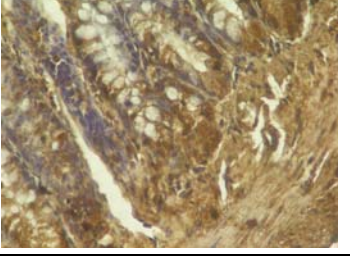
IL-8 Dağılımı: IL-8 immunoreaktivitesinin tüm gruplarda zayıf şiddette (+) hatta negatif (-) olarak gözlemlendi ve immunoreaktivitenin esas olarak lamina propriada bulunan hücrelerde olduğu, tunika mukoza ve tunika muskularis tabakalarının esas olarak negatif olduğu izlendi. Grup 1 de IL-8 immunoreaktivitesinin negatif olduğu, Grup 2 ve Grup 5'de zayıf şiddette (+) olduğu, Grup 3 ve Grup 4'de ise negatif (-) olduğu gözlemlendi (Şekil 17).

Şekil 17: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde IL-8 dağılımı. X400

Gruplar	X200	X400
Grup 1		
Grup 2		
Grup 3		
Grup 4		
Grup 5		

IL-6 Dağılımı: IL-6 immunoreaktivitesinin tüm gruplarda pozitif olduğu izlendi. İmmunoreaktivitenin ise hem tunika mukoza hem de tunika muskularis tabakasında bulunan hücrelerde olduğu saptandı. Grup 1'de IL-6 immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif (+++) olduğu izlenir iken, grup 2 ve 3'de immunorektivitenin bir miktar azaldığı ve orta şiddette olduğu (++) saptandı. Grup 4 ve Grup 5'de de IL-6 immunoreaktivitelerinin kuvvetli pozitif olduğu izlendi (Şekil 18).

Şekil 18: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde IL-6 dağılımı. X400

Gruplar	X200	X400
Grup 1		
Grup 2		
Grup 3		
Grup 4		
Grup 5		

Tüm gruplara ait immunohistokimyasal dağılımlar Tablo 10'da özetlenmiştir.

Tablo 11: Tüm gruplara ait ileum örneklerinde TNF- α , IL-1 β , IL-8 ve IL-6 dağılımlarının immunohistokimyasal olarak karşılaştırılmalı sonuçları

İleum	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
TNF- α	++	++ Yer yer +++	++ Yer yer +++	++ Yer yer +++	+++
IL-1 β	++ Yer yer +	++ Yer yer +++	++ Yer yer +	++ T. muskularis (-)	++
IL-8	-	+	-	-	+
IL-6	+++	++	++	+++	+++

Bu sonuçlar doğrultusunda, klemp uygulanan gruplarda erken dönemde (Grup 4) IL-8 haricinde tüm diğer sitokinlerin salınımlarının olduğu, geç dönemde ise IL-8 immunoreaktivitesinin de pozitif olduğu gözlemlendi. Bununla beraber Resveratrol tedavisi ile birlikte TNF- α immunoreaktivitesinin kontrol grubuna oranla bir miktar arttığı, IL-1 β ve IL-8 immunoreaktivitelerinin erken dönemde artış gösterdiği saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Nekrotizan enterokolit, inflamatuvar barsak hastalıkları, pull-through ameliyatları, strangüle herniler, serbest pediküllü barsak flebi kullanımı ve barsak transplantasyonu durumlarında iskemi/reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir. İskeminin dokulara ve yara iyileşmesine olumsuz etkileri iyi bilinmektedir. İnce barsaklarda 20 dakikadan kısa süren bir iskemi mukozada anlamlı bir değişiklik yapmazken iki saatten uzun süren bir iskemi transmural nekroza kadar giden kalıcı hasara neden olabilmektedir⁷⁹. Reperfüzyonun dokular üzerinde, öncesindeki iskemiden daha fazla zararlı olduğunu ve bu zararların reperfüzyon süresi arttıkça büyüdüğünü bilmekteyiz⁸⁰.

Parks ve arkadaşları, 20 dakikalık strangülasyon iskemisine maruz bırakılan ratlarda mukozal hasar saptamamıştır. 20 dakikanın üzerinde villüs hasarı, 60 dakikayı aşan strangülasyonda transmukozal hasar, 8-12 saatlik total veya totale yakın iskemide ise transmural gangren geliştiğini görmüşlerdir. 20 dakikanın altında veya 8-12 saatlik sürenin üzerindeki iskemilerde reperfüzyonun iskemik hasarı arttırdığına dair veri olmadığını, en belirgin hasarın 40-60 dakikalık iskemi-reperfüzyonla geliştiğini ifade etmektedirler⁸¹.

Parks ve Granger, mezenterik iskemi ve reperfüzyon tablosunda, reperfüzyon sırasında oluşan doku lezyonlarının, iskemi sırasında oluşarlardan daha büyük olduğunu bildirmişlerdir⁸². İnce barsağın iskemi ve reperfüzyonu, mukozal bariyerin bozulmasına, bakteriyel translokasyona, inflamatuvar cevapların aktivasyonuna, dokuların su, elektrik yük ve asit-alkali dengelerinde değişimlere yol açar⁸³. Bakteriyel translokasyon, bakterilerin intestinal mukoza tabakasını geçerek mezenterik lenfatiklere, diğer organ ve dokulara yayılmasıdır. Bakteriyel translokasyon tablosu, bakterilerin ilk defa barsak duvarı ile teması demektir ve bu da tek başına sitokin üretimi ve inflamatuvar cevabı indükler. Bakteri bir kez mukozayı penetre ettiği zaman, dolaşım sistemi ile uzak organlara gidebilir. Cerqueira ve arkadaşlarının yaptığı işaretlenmiş bakterilerin kullanıldığı hayvan çalışmasında, farelerde bakteriyel translokasyonun

mezenterik reperfüzyonu takiben 24 saat sonra belirgin hale geldiği bildirilmiştir; bu da bize zamanın translokasyon için önemli bir faktör olduğunu gösterir⁸⁴.

1990'lı yıllarda iskemi-reperfüzyon hasarının sistemik etkilerinin olduğu ve sistemik bir inflamatuvar cevaba yol açtığı kabul edilmiştir⁸⁵. 2000'li yıllara gelindiğinde uzak organ ve intestinal iskemi-reperfüzyon, mukozal hasara neden olmakta ve intestinal doku bu durumdan olumsuz etkilenmektedir⁸⁵.

Reperfüze olan barsakta açığa çıkan serbest oksijen radikalleri zararlı etkilerden sorumludur. Serbest oksijen radikallerinin önemli bir kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Post-iskemik durumda polimorfonükleer lökositler de içerdikleri myeloperoksidaz enzimi ile iskemi reperfüzyon hasarında rolü olan serbest oksijen radikallerinin oluşumuna katkıda bulunurlar⁸⁶.

İskemi/reperfüzyon sürecinde reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda oluştuğu ve bunların da özellikle reperfüzyonda arttığı, bu nedenle intestinal doku hasarının da reperfüzyonda geliştiği ileri sürülmektedir⁸⁷. İskemi sırasında oksidatif mekanizmaların devreye girmesi bu klinik problemin çözümünde antioksidan sistemin kilit rol oynayabileceğini düşündürmüştü ve konuyla ilgili birçok deneysel çalışma yapılmıştır^{88,89,90,91,92}.

Augustin ve arkadaşları, vitamin E'nin intestinal iskemi/reperfüzyon sonrası nötrofil birikiminin sebep olduğu serbest radikal oluşumunu önlediği ve lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Yine bu çalışmada intestinal iskemi/reperfüzyon sonrası 15 kat artan mieloperoksidaz (MPO) aktivitesini Vitamin E'nin normal düzeyine yaklaştırdığı bulunmuştur⁸⁸. Schmeling ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sodyum diklofenak (DS)'in ise iskemik dokuda ATP'nin sentezlenememesi ile oluşan hasarları, özellikle MPO aktivitesini, azaltarak bir koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur⁸⁹.

Kafeik asid fenetil ester⁹⁰ ve pentoksifilin⁹¹ 'in antioksidan karakteri ile ilgili araştırmalarda bu maddelerin intestinal iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği, antioksidan enzim aktivitelerindeki artış ve lipid peroksidasyonundaki düşüş ile gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise melatonin intestinal dokuda iskemi sonrası oluşan lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir⁹².

Melatonin pineal bezden salgılanan endojen bir hormondur. Melatonin'in en önemli özelliklerinden biri lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatonin'in serbest radikal süpürücü özelliğinin yanında hücrenin total antioksidatif savunma sistemini güçlendirdiği de ileri sürülmektedir^{93,94}.

Bu deneysel çalışmaların ışığında patofizyolojisinde iskemi ve reperfüzyon hasarının rol oynadığı nekrotizan enterokolit gibi hastalıklarda, reperfüzyon hasarını engellediği deneysel olarak ısıpatlanmış antioksidan ajanların, tedavide ve proflekside kullanılabileceği düşünölmektedir.

Nekrotizan Enterokolit, daha önceki bölümlerde de değinildiği gibi, klasik olarak prematür ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde sıklıkla ortaya çıkan ve barsakların kısmi veya tam iskemisi ile karakterli önemli bir gastrointestinal hastalıktır. İlk olarak 19. yüzyılda tanımlanmıştır. Tutulum bölgesi sıklıkla terminal ileumdur. İntestinal iskeminin başlamasında tetiği çeken faktörlerin neler olduğu henüz tam açıklık kazanmamıştır; ancak faktörlerin ulaştığı ortak yol intestinal iskemidir¹¹⁵.

NEK yenidoğan periyodunda en sık görölen gastrointestinal problemdir^{95,96}. İnsidansı ölkeden ölkeye, hastaneden hastaneye değışmektedir. Çok merkezli çalışmalarda 100 canlı doğumda 0.3 ile 2.4 arasında değışen oranlarda bildirilmektedir. Nekrotizan Enterokolit sıklığı, yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki hastaların %1-5'i kadardır. Esas olarak prematüre bebeklerde görölmekle birlikte, NEK gelişen bebeklerin %10'unu zamanında doğan bebekler oluşturmaktadır^{92,93,97,98,99}. Düşük gestasyonel yaştaki yenidoğanlarda, sıklık belirgin derecede artar. Vakaların %62-94'ünü prematüre bebekler oluşturur. Gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı düştükçe hastalığa yakalanma oranı artmaktadır. Wilson ve arkadaşları¹⁰⁰ 148 NEK'li hastayı değerdirmişler ve en yüksek oranların 1000 gramın altındaki bebeklerde olduğunu görmüşlerdir (%42). Doğum ağırlığı 1000-1500 gram arasındaki bebeklerde %39.0, 1501-

2000 arasındaki grupta %3.8, 2500 gramın üstündeki bebeklerde ise % 0.11 oranında NEK saptamışlardır.

Hastalığın başlangıç zamanı genellikle 3-10. günler arasında olmakla birlikte, 24. saatte veya 3.ayda bildirilen Nekrotizan Enterokolit vakaları bulunmaktadır. Nekrotizan Enterokolit her iki cinste de eşit oranlarda görülmektedir, ancak gram pozitif ve gram negatif neonatal sepsis oranının erkek yenidoğanlarda daha fazla olduğu bildirilmektedir. NEK hastalığı için yöresel ve sosyoekonomik farklılığın önemi gösterilememiştir¹⁰¹.

Nekrotizan enterokolitin etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak yıllardır NEK patogenezindeki en önemli faktörün mezenter iskemisi olduğu ileri sürülmektedir. Dalma refleksi (kalp ve beynin selektif olarak refleks dolaşım şantlarıyla perfüzyonunun sağlanması) selektif olarak splenik iskemiye yol açar. Prematüre bebekler, hipoksi, asidoz, hipotansiyon, hipotermi, umbilikal kateterizasyon gibi yenidoğanın barsak hasarının patogenezinde rol oynayan önemli faktörlere maruz kalır^{102,103,104}. İskemi sonrası gelişen reperfüzyon evresinde, yapımı artan serbest oksijen radikalleri, tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF-alfa), trombosit aktive edici faktör gibi inflamatuvar mediatörlerin intestinal mukozal zedelenmeyi daha da arttırarak ülserasyon ve nekroz oluşturdukları düşünülmektedir. Deneysel çalışmalarla da TNFalfa ve trombosit aktive edici faktörün (PAF) NEK patogenezindeki rolü gösterilmiştir^{105,106,107,108,109}.

Enteral beslenmeye hızlı ve erken geçiş, enterik kan akımında ve mukozanın oksijen ihtiyacında artmaya neden olmaktadır. Stoll ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, NEK gelişen bebeklerin %90-95'inde enteral beslenmenin major rol oynadığı görülmüştür¹¹⁰. Tamamen sindirilemeyen mamalar, gastrointestinal sistemde bakteri proliferasyonu için substrat görevi yaparak NEK gelişimine zemin hazırlarlar. Besinlerin emilimi sırasında bağırsakları etkileyen metabolik ihtiyacın artması, hipoksik iskemik stres, immatür vasküler düzenleme kapasitesi, immatür immün sistem ve gastrointestinal dismotilite doku hipoksisine yol açar ve takiben bakteriyel invazyonun da eklenmesiyle nekrotizan enterokolit gelişir. Lukas ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise hiperosmolar mamalarla beslenmenin de NEK riskini arttırdığı saptanmıştır¹¹¹.

Anne sütü; içerdiği lenfositler, makrofajlar, laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozimler, kompleman komponentleri, antistafilokokal ajanlar ve sekretuar IgA başta olmak üzere immünooglobulinler gibi laktobasillerin üremesini arttıran faktörler sayesinde NEK'ten koruyucu etki yapmaktadır. Ayrıca anne sütü NEK patogenezinde önemli rol oynayan mediatörlerden biri olan platelet aktive edici faktörün metabolizmasında anahtar enzim olan PAFasetilhidrolaz enzimini içermektedir. Ancak inek sütünde bu enzim bulunmamaktadır. Minekawa ve arkadaşları¹¹² ile Reber ve arkadaşlarının¹¹³ yaptığı çalışmalar göstermiştir ki, beslenme PAF sentezini stimüle ederek de NEK gelişimine zemin hazırlamaktadır.

Platelet aktive edici faktör NEK patogenezinde rol oynayan primer mediatördür. Gonzalez-Crussi ve arkadaşları¹¹⁴ aort içine PAF enjeksiyonunun NEK'e benzer şekilde intestinal nekroza yol açtığını deneysel olarak göstermişlerdir. PAF-asetilhidrolaz ve PAF-degrading enzim gibi PAF'ın metabolizmasında rol oynayan enzimlerin prematür bebeklerde önemli oranda düşük olduğu ve enteral beslenmenin başlanmasını takiben dışkıda PAF düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Yenidoğan farelerde formula ile beslenme ve hipoksik stresin NEK'e yol açtığı, ayrıca fosfolipaz-A2 ile PAF reseptör mRNA'nın intestinal ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır. Tam tersi olarak Caplan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise PAF reseptör antagonisti veya PAF asetilhidrolaz enzimi ile kombine formulaların deneysel olarak NEK gelişimini önlediği tespit edilmiştir¹¹⁵. Ayrıca yapılan çalışmalarda NEK'li hastalarda IL-1, IL-3, IL-6 ve TNF-alfa düzeyleri yüksek bulunmuştur¹¹⁶.

Son birkaç yıldır prematüre infantlarda dikkatli beslenme rejimleri ile NEK insidansının önemli oranda azaldığı bildirilmiştir. Neonatoloji uzmanlarının çoğu, az miktarda ve dikkatli olarak beslenmeyi önerse de, bu teknik az sayıdaki çalışma ile desteklenmiştir^{117, 118}.

NEK patogenezinde yer alan bir diğ er önemli faktör bakteri proliferasyonudur. Bakterilerin hastalığın primer başlatıcısı olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak prenatal dönemde steril olan intestinal sistemde in utero NEK vakası tanımlanmamıştır ve inflamatuvar barsak nekrozunun başlangıcı için önceden barsak kolonizasyonunun olması gerekmektedir. Beslenmeye başlayan bebeklerde laktobasilus ve bifidus bakterisi gibi anaerob bakteriler hızla intestinal sistemde kolonize olur. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen ve anne sütü ile beslenmeyen premature bebeklerin barsak florasının, sağlıklı term bebeklerden farklı olduğu tespit edilmiştir¹¹⁹. Çok düşük doğum ağırlıklı premature bebeklerin de barsak florasının bakteri kolonizasyonunun yetersiz olduğu, anne sütü ile beslenenlerde flora bakterilerinin arttığı, antibiotik tedavisi ile de flora bakterilerinin azaldığı görülmüştür¹²⁰.

NEK vakaları çoğunlukla sporadiktir. Epidemiler esnasında etkilenen bebeklerin özellikleri sporadik olanlardan farklıdır. Bu bebeklerde sporadik olgulara göre daha yüksek apgar skoru ve doğum ağırlığı, daha az perinatal komplikasyon ve daha düşük ölüm oranları bildirilmiştir.

NEK epidemilerine rağmen etken olan spesifik bir mikroorganizma tespit edilememiştir. Bakteriler (K. pneumoniae, E. coli, koagülaz negatif stafilokoklar), viruslar (rotavirus, corona virus ve diğ erleri), klostridumlar etken olabilmektedir. Nonspesifik gastrointestinal rahatsızlıklar NEK salgınları esnasında artar, yenidoğan yoğun bakım personeli arasında epidemik periyottan önce, sonra ve epidemik esnasında da yine gastrointestinal rahatsızlıkların insidansı artar. Yenidoğan yoğun bakım üniteleri kalabalık olduğunda, NEK epidemisi riski artar.

NEK riskini arttıran diğ er hazırlayıcı nedenler arasında enteral ve parenteral verilen E vitamini, indometazin ve metilksantinler sayılabilir. Barsakların fonksiyonel immatüritesi, azalmış motilite de NEK gelişimi için hazırlayıcı faktörlerdendir. Antenatal steroid kullanımının NEK riskini azalttığı saptanmıştır. Prematüre bebeklerde safra tuzları havuzu term bebeklerden

küçüktür, safra tuzları endotoksinleri nötralize eder. Steroidler safra tuzu havuzunun büyüklüğünü ve bağırsak matürasyonunu artırır.

NEK tanısı ile rezeke edilmiş intestinal segmentlerden elde edilen en yaygın patolojik bulgu barsağın koagülasyon ya da iskemik nekrozudur. Yaklaşık % 50 olguda, hem kolon ve hem de ince barsakta nekroz saptanmıştır. Perforasyon genellikle antimezenterik sınırdadır, normal ve canlılığını yitirmiş barsak birleşme noktasında olmaktadır, ancak nekrotik segment içinde de olabilir. Canlı barsak bölgeleri sıklıkla canlı olmayan segmentlerin arasına karışmakta ve intramural hemoraji nekroz ile karışabilmektedir.

Biz bu çalışmada yukarıda bahsedildiği gibi patogenezinde iskemi ve reperfüzyon hasarının rol oynadığı patolojilerde, doğal bir antioksidan olan resveratrolün etkinliğini araştırdık. Resveratrolün zengin ve güçlü etkinliği birçok çalışmaya malzeme olmuştur ve olmaya devam etmektedir.

Üzüm, yerbıstığı ve grefurt gibi bitkilerden elde edilen resveratrolün çeşitli iskemi-reperfüzyon modellerinde aktive olan, lipid peroksidasyonu ve LDH inhibe edici etkisi, lökosit adezyonunu azaltıcı, serbest radikal süpürücü, anti-inflamatuar ve anti-oksidan etkileri ve NO salınımını stimüle edici etkileri gösterilmiştir¹²¹. Resveratrolün vasküler etkilerinin hem endotel-bağımlı [Düşük resveratrol konsantrasyonlarında belirgindir ve NOS inhibitörleri (L-NAME) ile bloke edilebilir], hem de endotel-bağımsız (yüksek resveratrol konsantrasyonlarında açığa çıkar ve NOS inhibitörleri veya endotel hasarı ile bloke edilemez) olduğu düşünülmektedir¹²².

NO'nun iskemi ve reperfüzyon hasarındaki fonksiyonel ve metabolik etkileri halen tamamen aydınlatılamamıştır. NO potent bir endojen vazodilatör gibi davranabildiği gibi, doku hasarına neden olabilen bir molekül gibi de davranabilir¹²³. Normal fizyolojik ortamda, NO, vasküler tonusu ayarlar, endotele trombosit agregasyonunu ve nötrofil adhezyonunu engeller¹²⁴. Ancak, patofizyolojik ortamda, IR, sitokinlerin indüklediği aşırı NO üretimi doku hasarında kritik bir öneme sahiptir¹²⁵.

Resveratrol, deneysel çalışmalarda, intravenöz, intraperitoneal, intrahepatik, subkutan ve peroral olarak kullanılmıştır. Biz bu çalışmada intraperitoneal olarak uygulamayı tercih ettik. Klinik olarak resveratrolün kullanılabilmesi durumunda operasyon sırasında intraperitoneal uygulamanın cerrah için uygulaması kolay ve etkili olabileceğini gösterdik. Ayrıca intraperitoneal uygulamanın postoperatif adezyonların önlenmesinde de etkili olduğunu gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur. Adezyon formasyonunun oluşmasında ilk basamak inflamatuvar yanıttır. Travma sonrası peritoneal yaralanma, enfeksiyon veya iskemi gibi durumlarda, akut fibroproliferatif inflamatuvar yanıt meydana gelmektedir. Vasküler permeabilite artar ve fibrinden zengin sıvı salınımı ortaya çıkar. Sonuçta peritoneal yaralanmada inflamatuvar cevap oluşması ile postoperatif adezyon formasyonu meydana gelmektedir.

Daha oncedeki çalışmalarda resveratrolün, antioksidan, antiplatelet ve antiinflamatuvar¹²⁶ etkileri ile vasküler hemostazı arttırıcı ve endotelial zedelenmeyi azaltıcı¹²⁷ etkilerine değinilmiştir. Araşidonik asit, sitokinler ve nitrik oksit gibi çeşitli inflamatuvar mediatörler postoperatif adezyon formasyonunun gelişmesinde etkilidir¹²⁸. Siklooksijenaz-2 salınımı inflamatuvar stimulusa yanıt olarak artar ve lokal prostaglandinlerin seviyelerinde artışa neden olur. Bu ilk inflamatuvar yanıtı azaltan çeşitli ajanlar kullanılmıştır. Kazunori ve arkadařları¹²⁹, ibuprofenin, fibroproliferatif inflamasyonun supresyonu yoluyla adezyon formasyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır. Diğer bir çalışmada ise, aspirinin, postoperatif adezyon formasyonunu sınırlayarak etkili olduğu saptanmıřtır¹³⁰. Plasminojen aktivatör ve kalsiyum kanal blokerleri¹³¹ de, inflamasyonu azaltıcı etkilerinden ötürü bu tip çalışmalarda kullanılmışlardır. Resveratrol, antiinflamatuvar etkilidir¹³² ve siklooksijenaz aktivitesini inhibe etmektedir¹³³. Günsel çalışmalarda bu etkilerden faydanılarak resveratrol uygulanan denek hayvanlarda adezyon formasyonunun anlamlı olarak gerilediği gozlenmiřtir¹²⁴.

Erkek sıçanlarda yapılan çalışmalarda alkolsüz kırmızı sarap ekstresinin ve resveratrolün kalbi iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğu

gösterilmiştir¹³⁴. Sıçanlara, 25 mg/mL resveratrolün içme suyu içinde 15 gün boyunca verilmesi sonucunda, Langendorf perfüze sıçan kalplerindeki iskemi-reperfüzyon hasarının belirgin olarak azaldığını bildirmiştir. Bu koruyucu etkinin, kısmen nitrik oksit sentezindeki artışa bağlı olarak ortaya çıktığı ileri sürülmüştür¹³⁵. Hung ve arkadaşları, 10 µM resveratrolün Langendorf perfüze sıçan kalplerinde süperoksit oluşumunu ve infarkt alanını azalttığını göstermişlerdir¹³⁶. Baska bir çalışmada da izole perfüze sıçan kalplerinde 10 µM resveratrolün infarkt alanını küçülttüğü, MDA düzeylerini düşürdüğü, oksidatif hasarı önleyerek kalbi iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir¹³⁷. Fare kalplerinde, 15 dakika 10 µM resveratrolle perfüze edildiğinde, 25 dakikalık iskemi ve 2 saatlik reperfüzyonu izleyen süreçte, resveratrolün iNOS ekspresyonunu indüklediği ve bu artışa paralel olarak reperfüzyona bağlı iskemik alanı küçülttüğü saptanmıştır. Kalpte resveratrolün ön kosullayıcı etkisinde iNOS' un önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür¹³⁸.

İzole sıçan kalplerinde yapılan bir baska çalışmada da 30 dakikalık iskemi izleyen 2 saatlik reperfüzyon periyodundan önce kalpler 15 dakika 10 µM resveratrol veya 10 µM resveratrol ve 100µM L-NAME veya 10 µM resveratrol ve 100 µM iNOS blokörü olan aminoguanidin ile perfüze edilmiştir. 10 µM resveratrol ile perfüze edilen kalplerde, iskemi sonrası dolum basıncı ve aortik akış gibi parametrelerle ölçülen ventriküler fonksiyonun iyileştiği, miyokardiyal infarkt alanının küçüldüğü ve resveratrolün oluşturduğu bu olumlu, kalbi koruyucu etkilerin L-NAME ve aminoguanidin varlığında tamamen ortadan kalktığı gösterilmiştir. Resveratrolle perfüze edilen kalplerde 30 dakika reperfüzyondan itibaren 60 dakika ve 120 dakika reperfüzyondan sonra iNOS mRNA ekspresyonu anlamlı şekilde artmış ve aminoguanidin preinkübasyonu yapıldığında iNOS mRNA ekspresyonlarındaki artış kaybolmuştur. Bu çalışmayla resveratrolün kalpte önkosullayıcı etkisinde nitrik oksidin rol oynadığı gösterilmiştir¹³⁹. Bu çalışmalardan farklı olarak, erkek Sprague Dawley sıçanlara 0.5 veya 1 mg/kg i.p. resveratrol enjekte edildikten 60 dakika sonra koroner arter oklüzyonu ve ardından reperfüzyon yapıldığı bir çalışmada, kontrol hayvanlarda

oklüzyon ve reperfüzyondan sonra iNOS protein ekspresyonunun arttığı fakat, oklüzyon öncesi resveratrol infüzyonu yapıldığında iNOS indüksiyonunun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Kontrol hayvanlarında, oklüzyon öncesi ve sonrasında eNOS ve nNOS ekspresyonlarında bir farklılık gözlenmediği fakat, resveratrol uygulanan hayvanlarda oklüzyon sonrasında eNOS ve nNOS protein ekspresyonlarında anlamlı artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca resveratrolün iNOS mRNA ekspresyonunu azalttığı, eNOS mRNA ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiş ve iNOS ekspresyonu üzerindeki etkisinin transkripsiyonel seviyede eNOS üzerine etkisinin de protein düzeyinde olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, resveratrol uygulanan hayvanlarda iskemiyle indüklenen aritmilerin şiddeti ve sıklığı azalmış ve L-NAME verildiğinde bu etki ortadan kalkmamıştır. Oluşan bu antiaritmik etkinin, nitrik oksitten bağımsız mekanizmalarla muhtemelen de serbest radikal süpürücü etkiden kaynaklanabileceği gösterilmiştir¹⁴⁰.

Tavşanlarda iskemi öncesinde 10 mg/kg resveratrol infüzyonu¹⁴¹ ve 100 µg/kg resveratrol inkübasyonu¹⁴² yapıldığında, resveratrolün spinal kordu iskemi ve reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir. Bu yararlı etki iskemik spinal kord dokusunda oksidatif stresin azalmasına¹³² ve nötrofil göçünde azalmaya bağlı olarak gerçekleşmektedir¹³³. Erkek Wistar sıçanlara 0.23 µg/kg dozda verilen resveratrolün sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon hasarı sonucu ortaya çıkan mortaliteyi %50'ye varan ölçülerde azalttığı gösterilmiştir¹⁴³. Erkek Wistar sıçanlarda 21 gün boyunca 20 mg/kg i.p. *trans*-resveratrol tedavisinin ise serebral arter oklüzyonu sonucu ortaya çıkan fokal iskemi alanını, MDA ve glutasyon düzeyindeki düşmeye paralel olarak azalttığı saptanmıştır¹⁴⁴.

Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada resveratrolün iskemiden koruyucu etkileri 10^{-6} ile 10^{-9} g/kg aralığında farklı dozlarda araştırılmış ve en etkili dozun 10^{-6} g/kg olduğu gösterilmiştir¹⁴⁵. Bununla birlikte resveratrolün çeşitli etkileri ile ilgili birçok çalışma olmasına karşın, biyolojik etkilerine karşı oluşan moleküler cevap mekanizmaları ve maddenin farmakokinetiğine dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. Resveratrol farmakolojik olarak hem in vivo hem de in vitro etkilidir¹⁴⁶. Genellikle iskemi ve reperfüzyon hasarı

çalışmalarında, 5-10 mg/kg doz konsantrasyonunda uygulanmıştır¹⁴⁷. Biz ise çalışmamızda tüm ilaç gruplarında resveratrolü 10^{-5} g/kg (10 ng/kg) dozunda uyguladık. Ancak farklı doz aralıklarının karşılaştırılması için daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Hei Zi-qing¹⁴⁸ ve arkadaşlarının yaptığı iskemi ve reperfüzyon hasarı çalışmasında, antihistaminik ajanlar reperfüzyon hasarı oluşturulmadan hemen önce ratlara uygulanmış ve reperfüzyon hasarının önlenmesine dair anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Yine Colak T. ve arkadaşlarının¹⁴⁹ yaptığı intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarı modeli çalışmada, antianjinal ilaç olarak kullanılan, antioksidan özellikteki Trepidil maddesini, superior mezenterik arterin reperfüzyonunun sağlanmasından sonra deneklere uygulamışlar ve bu metot ile Trepidil'in iskemi reperfüzyon hasarını engellediğini bulmuşlardır. Biz de çalışmamızda, deneklere resveratrolü, iskemi sonrası, reperfüzyon hasarı oluşturulmasından hemen önce (SMA klempi açılmadan önce) uyguladık. Bu metodun araştırılmasının, özellikle nekrotizan enterolit, strangüle herniler gibi acil eksplorasyon kararı verilebilen olgularda, cerrahın, operasyon sırasında reperfüzyonu sağlamadan hemen önce veya reperfüzyon sonrası uygulayabilmesi ve reperfüzyon hasarını engelleyebilmesi açısından, bize daha anlamlı olabileceğini düşündürmektedir.

Daha önceki çalışmalarda TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın iskemi reperfüzyon hasarındaki rollerine değinilmiştir¹⁵⁰. IL-10 ise antiinflamatuvar özelliktedir ve iskemi ve reperfüzyon hasarını takiben ortaya çıkan doku inflamasyonunu azaltıcı etkidedir¹⁵¹.

Travma sonrası, hastanın hemostazının sağlanması amacıyla başlangıç inflamatuvar yanıt meydana gelmektedir. Bununla birlikte, travmatik olayın büyümesi ve devam etmesi sonucunda, multiple organ yetmezliğine kadar ilerleyen, malign seyirli sistemik inflamatuvar yanıt ortaya çıkmaktadır¹⁵². Bu olay esnasında TNF α , IL1, IL8, IL6 salınımı da artmaktadır^{153, 154, 155}. Özellikle travma sonrası artan serum IL6 seviyeleri oluşabilecek komplikasyonların artışı ile paralel saptanmıştır ve iyi bir marker olarak kabul edilmektedir^{156, 157, 158}.

Pimenta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada abdominal aortik klemleme sonrası oluşan reperfüzyon hasarında inflamatuvar sürecin sonucunda serum IL6 seviyelerinde anlamlı düzeyde artış saptamışlardır¹⁵⁹.

Roumen ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise major künt travma, rüptüre aort anevrizması ve şok tablosu sonrasında oluşan iskemi reperfüzyon hasarı sonucunda TNF α , IL 1 β ve IL 6 seviyelerinde artış ve bu artışa paralel olarak mortalite ile ARDS ve multiorgan yetmezliği gelişimi riskinde artış saptanmıştır¹⁶⁰.

Spanos ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada ise, superior mezenterik arterin klemlenmesi sonrası oluşturulan iskemi ve reperfüzyon hasarı ile terminal ileumdan alınan doku örneklerinin histolojik incelemesinde, sitokin seviyelerinde artış saptanmıştır. L-Arginin ve Aprotinin'nin 30 dakikalık iskemi sonrası uygulanmasının ardından, doku sitokin seviyelerinde anlamlı düzeyde azalma olduğu görülmüştür¹⁶¹.

Biz bu çalışmada ise doku enflamasyon mekanizmalarının açıklanabilmesi için resveratrol uygulanmayan ve uygulanan gruplar oluşturarak dokudaki TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 dağılımlarını indirekt immunoperoksidaz tekniği ile inceledik. Sonuçta klemp uygulanan gruplarda erken dönemde (Grup-4) IL-8 haricinde tüm diğer sitokinlerin salınımlarının olduğu, geç dönemde ise IL-8 immunoreaktivitesinin de pozitif olduğu gözlemlendi.

Tüm gruplarda TNF- α dağılımının pozitif olduğu gözlemlendi. Grup 1 de immunoreaktivite şiddeti orta şiddette iken (++) , grup 2 ve 3'de TNF- α immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) , yer yer ise kuvvetli pozitif (+++) olduğu gözlemlendi. Grup 4'de TNF- α immunoreaktivitesinin grup 2 ve 3 ile benzer iken, grup 5 de TNF- α immunoreaktivitesinin tüm alanlarda kuvvetli pozitif (+++) olduğu saptandı. 120 dakika iskemi reperfüzyon sonrası Resveratrol uygulanan grup 3, uygulanmayan grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde immunoreaktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir.

Grup 1'de IL-1 β immunoreaktivitesinin her iki tabakada da orta şiddette (++) yer yer ise zayıf şiddette (+) olduğu izlendi. Grup 2 de ise IL-1 β

immunoreaktivitesinin hem tunika mukoza hem de tunika muskularis tabakasında orta şiddette (++) , yer yer şiddetli pozitif (+++) olduğu gözlemlendi. Grup 3'de IL-1 β immunoreaktivitesinin grup 1 le benzer olduğu yer yer zayıf şiddette (+) yer yerde orta şiddette olduğu (++) gözlemlendi. Grup 4 de ise IL-1 β immunoreaktivitesinin tunika mukoza tabakasında orta şiddette (++) iken, tunika muskularis tabakasında negatif (-) olduğu gözlemlendi. Grup 5 de ise IL-1 β immunoreaktivitesinin her iki tabakada da gözlemlendiği ve orta şiddette (++) olduğu saptandı.

IL-8 immunoreaktivitesi, tüm gruplarda zayıf şiddette (+) ve yer yer negatif (-) olarak gözlemlendi. Grup 1 de IL-8 immunoreaktivitesinin negatif olduğu, Grup 2 ve Grup 5'de zayıf şiddette (+) olduğu, Grup 3 ve Grup 4'de ise negatif olduğu gözlemlendi.

Grup 1'de IL-6 immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif (+++) olduğu izlenir iken, grup 2 ve 3'de immunoreaktivitenin bir miktar azaldığı ve orta şiddette olduğu (++) saptandı. Grup 4 ve Grup 5'de de IL-6 immunoreaktivitelerinin kuvvetli pozitif olduğu izlendi.

Bu sonuçlar doğrultusunda resveratrol antiinflamatuvar özelliği ile, özellikle geç iskemi ve reperfüzyon hasarında sitokin immunreaktivitesini bizim çalışmamızda azaltmıştır. Ancak denek sayısının artırılarak istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz. Daha önce de değinildiği gibi literatürde istatistiksel anlamlı sonuçların elde edildiği çalışmalar mevcuttur, ancak resveratrolün sitokin seviyelerine etkisi ile ilgili literatür çalışmaları yapılması gerekmektedir.

Rosario ve arkadaşları, inflamatuvar cevap sırasında artan intraluminal tripsinin, barsak duvarına nötrofil infiltrasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir¹⁶². Böylelikle inflamatuvar cevapta rol alan lipidik bir mediatör olan PAF ve ince barsakta iskemi ve reperfüzyon ile aktivasyonu sonucu, mukozal apoptoza neden olur. Aktive edilen PAF, IL6 salımını artırırken, IL10 salımını azaltır ve antiinflamatuvar fonksiyonları deprese eder¹⁶³. Apoptozu uyaran faktörlerden biri de, mitokondrial sitokromların sitozole salımı sonucu aktive olan, caspase-9'dur.

Noda ve arkadaşları ratlarda yaptıkları çalışmada, süperior mezenterik arter oklüzyonu ile oluşturdukları intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarında jejunum ve ileum'da gelişen apoptozu rapor etmişlerdir¹⁶⁴.

Apoptozis, iskemi reperfüzyon hasarı sonrası intestinal hücrelerdeki hücre ölümünün anlamlı bir göstergesidir. Sağlıklı bağırsakta apoptozis, villus uçlarından dökülen enterositler vasıtasıyla sürekli hücre yenilenmesine izin vermektedir. Normal jejunumda kript hücrelerde apoptozis nadirdir, ancak iskemi reperfüzyon hasarı sonrası özellikle reperfüzyondan sonraki ilk birkaç saatte apoptozis anlamlı bir şekilde artmaktadır. Tunel tekniği ile apoptozisin incelenmesinin yararı ise hangi enterositlerin etkilendiğini bize göstermesidir. Chanvitayapongs ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada resveratrolün antioksidan ve antimutajenik özelliklerinin yanında hücre ölümünü de azalttığı gösterilmiştir⁷⁵.

Resveratrol uygulanan grup (grup 2), 30 dakika klempten sonra sadece 30 dk klemp uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında (Grup 4) apoptozis görülen hücre sayısının daha az olduğu izlendi. Bununla beraber 120 dakika klempten sonra Resveratrol uygulanan grup (grup 3), sadece 120 dk klemp uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında (Grup 5) ise yine apoptozis görülen hücre sayısının daha az olduğu gözlemlendi. Resveratrol uygulanan 30 dk klemp uygulanmış grupta apoptozis görülen hücre sayısının, resveratrol uygulanmamış gruba oranla daha fazla olduğu ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Fakat 120 dakika klemp uygulanan grupta resveratrol tedavisinde apoptozis görülen hücre sayısı artmış olarak görülmesine rağmen, resveratrol uygulanmamış grupta bu sayı daha da fazladır. Buda göstermektedir ki resveratrol uygulanması apoptotik mekanizmayı durduramasa bile, bir miktar azaltmıştır, ayrıca erken dönemdeki etkisi uzun döneme oranla daha fazladır ve gecikmiş bir apoptozise neden olduğu düşünülmüştür.

Çalışmanın dezavantajları ise ilk olarak denek sayısının daha fazla olması durumunda istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Ayrıca resveratrolün ülkemizde üretilmemesi nedeniyle ekonomik açıdan çok pahalı olduğunu söyleyebiliriz. Resveratrolün özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalar sonucunda onkoloji hastalarına destek tedavisi amacıyla birçok merkezde rutin olarak kullanıldığını bilmekteyiz. Ülkemizde de yaygın olarak üretilen siyah üzümden uygun koşullar sağlandığında resveratrolün üretilebileceğini düşünmekteyiz. Dünyanın en potent antioksidan maddesi olduğu söylenen resveratrolü içeren, doğal ürünler ile beslenme alışkanlığının ülkemizde halkın bilinçlendirilerek yaygın olarak desteklenmesi gerekmektedir.

Resveratrolün klinik olarak kullanılabilmesi için farmakokinetik özelliklerinin ortaya konması ve bu kapsamda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Tüm dünyada üzerinde birçok çalışma yapılan resveratrolün yan etkilerinin de araştırılması sonrası ivedilikle klinik kullanıma gireceğine inanıyoruz. Özellikle nekrotizan enterokolit açısından risk grubunda bulunan prematür yenidoğan servislerindeki olgulara ileride koruyucu amaçlı resveratrol uygulanabileceğini düşünüyoruz.

6. SONUÇLAR

- Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde (iskemi), o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir.
- Kan akımının tekrar sağlanması ile reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir. Nekrotizan enterokolit, invaginasyon, inflamatuvar barsak hastalıkları, pull-through ameliyatları, strangüle herniler, serbest pediküllü barsak flebi kullanımı ve barsak transplantasyonunun etiyojisinde iskemi ve reperfüzyon hasarı rol oynamaktadır.
- Reperfüzyon dokular üzerinde, öncesindeki iskemiden daha fazla zararlı olmakta ve bu zararlar reperfüzyon süresi arttıkça artmaktadır.
- Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir.
- Reperfüze olan barsakta açığa çıkan serbest oksijen radikalleri zararlı etkilerden sorumludur. Serbest oksijen radikallerinin önemli bir kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Post-iskemik durumda polimorfonükleer lökositler de içerdikleri myeloperoksidaz enzimi ile iskemi reperfüzyon hasarında rolü olan serbest oksijen radikallerinin oluşumuna katkıda bulunurlar.
- İskemi sırasında oksidatif mekanizmaların devreye girmesi bu klinik problemin çözümünde antioksidan sistemin kilit rol oynayabileceğini düşündürmektedir.
- Doğal bir antioksidan olan resveratrol, deneysel modelde etkin olarak, intraperitoneal yolla uygulanabilmektedir.
- 10 ng/kg dozdan uygulanan resveratrol, apoptozisi ve sitokin salınımını tamamen durdurmasa bile, anlamlı ölçüde azaltmaktadır.

- Resveratrol, iskemi ve reperfüzyon hasarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde apoptozisi azaltmaktadır. Bu çalışmada apoptozisi değerlendirmek amacıyla, doku örnekleri Tunel metodu ile histopatolojik olarak incelenmiştir.
- Sitokin seviyelerinde ise, resveratrol uygulaması sonrası azalmanın saptandığı sonuçlar elde edilmiştir.
- Denek sayısının daha fazla olması durumunda istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.
- Tüm dünyada üzerinde birçok çalışma yapılan resveratrolün yan etkilerinin ve farmakokinetik özelliklerinin araştırılması sonrası ivedilikle klinik kullanıma gireceğine inanıyoruz.
- Özellikle nekrotizan enterokolit açısından risk grubunda bulunan prematür yenidoğan servislerindeki olgulara ileride koruyucu amaçlı resveratrol uygulanabileceğini düşünüyoruz.

7. ÖZET

İntestinal iskemi ve reperfüzyon hasarında resveratrolün etkinliğinin değerlendirilmesi

İskemi ve reperfüzyon hasarı, nekrotizan enterokolit, invaginasyon, inflamatuvar barsak hastalıkları, pull-through ameliyatları, strangüle herniler, serbest pediküllü barsak flebi kullanımı ve barsak transplantasyonunun etiolojisinde rol oynamaktadır. Resveratrolün antioksidan özelliği, endotelial nitrik oksit üretimini artırması ve apoptozisi engellemesi bizi, resveratrolün intraperitoneal olarak verilmesinin iskemi-reperfüzyon hasarını önleyici, organ disfonksiyonlarını azaltıcı etkisi olup olmadığı konusunu araştırmaya yöneltmiştir. Bu çalışmada deneysel modelde iskemi ve reperfüzyon hasarında resveratrolün etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Deney, ağırlıkları 180-220 gr arasında değişen, Wistar albino cinsi, 35 erişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar randomize olarak 5 eşit gruba ayrıldı. 1. Grup, kontrol grubu olarak ayrıldı. Diğer gruplarda superior mezenterik arter oklüze edilerek 2. ve 4. Gruplara 30 dakika, 3. ve 5. Gruplara ise 120 dakika iskemi uygulandı. İskemi sonrası, 2. ve 3. Gruplara, 10 ng/kg dozdan intraperitoneal resveratrol verildi. Ardından iskemiye takiben 60 dakika reperfüzyon uygulanarak, tüm gruplardan deney sonunda histopatolojik inceleme amacıyla yaklaşık 3 cm terminal ileal segment rezeke edildi.

Histopatolojik olarak, alınan kesitlerde apoptozis ve TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 dağılımları incelendi.

Sonuçta, resveratrol uygulanması apoptotik mekanizmayı durduramasa bile, bir miktar azaltmıştır, ayrıca erken dönemdeki etkisi uzun döneme oranla daha fazladır ve gecikmiş bir apoptozise neden olduğu düşünülmüştür. Yine bu uygulanmanın, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sitokin immunreaktivitesini bir miktar azalttığı görülmüş ve bu etkinin özellikle geç iskemi sonrası ortaya çıktığı saptanmıştır. Resveratrolün yan etkilerinin ve farmakokinetik özelliklerinin araştırılması sonrası hızla klinik kullanıma gireceğine inanıyoruz. Özellikle nekrotizan enterokolit açısından risk grubunda bulunan prematür yenidoğan servislerindeki olgulara ileride koruyucu amaçlı resveratrol uygulanabileceğini düşünüyoruz.

8. SUMMARY

Evaluating the efficiency of resveratrol at intestinal ischemia and reperfusion injury

Ischemia and reperfusion injury plays a role at the etiology of necrotising enterocolitis, invagination, inflammatory diseases of intestine, pull-through operations, strangulated hernias, free and pedicled flaps of intestine and intestinal transplantation. The features of resveratrol such as antioxidant activity, prevention of apoptosis and increasing production of endothelial nitric oxide directed us to research whether intraperitoneal administration of resveratrol has an effect on reducing organ dysfunction or not. With this experimental study model, we aimed to evaluate the effectiveness of resveratrol at ischemia and reperfusion injury.

The experiment was performed with 35 adult male Wistar albino rats, weighing 180-220 gram. Rats were assigned at 5 equal groups randomly. Group 1 was separated as the control group. Ischemia was applied at Group 2 and Group 3 for 30 minutes and Group 3 and Group 5 for 120 minutes by occluding the superior mesenteric artery. After ischemia, resveratrol was administrated intraperitoneally to the Group 2 and 3 with a dose of 10 ng/kg. Subsequent to the ischemia, we performed reperfusion for 60 minutes to the all groups and at the end of the experiment approximately 3 cm of terminal ileal segment was resected for the histopathological research.

Apoptosis and dispersion of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 was investigated at the sections histopathologically.

As a result, even application of resveratrol can't stop the mechanism of apoptosis, it reduced this mechanism a little. Also it was thought that early phase effect was more than long term effect and it causes a delayed apoptosis. Again it was observed that administration of resveratrol was not statistically significant and this effect occurred especially after late ischemia. We believe that resveratrol will be in clinical usage with time after sufficient researching on its side effects and pharmacokinetics. We suppose that in the future resveratrol should be used for the purpose of prevention, particularly for the cases at the prematurity and newborn clinics who are under the risk of necrotising enterocolitis.

9. KAYNAKLAR

- ¹ Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81: 637-647.
- ² Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7th Edition 1999; Vol I: 13-32.
- ³ Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res*. 2000;86: 117-118.
- ⁴ Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*. 2000; 39:1529-1542.
- ⁵ Kuzu MA, K ksoy C, Kale İT, et al, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176: 348-351.
- ⁶ Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America* 1992; 72: 65-83
- ⁷ Terzi C, Kuzu A, Tanık A ve ark. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun s reli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000, 8;1: 10-16.
- ⁸ Bathe OF, Chow AWC, Phang PT et al. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery* 1998, 123;1: 79-88.
- ⁹ Renaud SC, Geuguen R, Schenker J et al. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 1998;9:184-8.
- ¹⁰ Law M, Wald N. Why heart disease mortality is low in France: The time lag explanation. *Br Med J* 1999;318:1471-6.
- ¹¹ Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the "French Paradox". *Euro J Endo* 1998;138:619-20.
- ¹² Russo P, Tedesco I, Russo M et al. Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11:25-9.
- ¹³ Huang SS, Tsai TC, Chih CL et al. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci* 2001;69:1057-65.

-
- ¹⁴ Bradamante S, Piccinini F, Barenghi L, et al. Does resveratrol induce pharmacological preconditioning? *Int J Tissue React* 2000;22:1-4.
- ¹⁵ Ertan T, Soran A, Kılıç M ve ark. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) önemi.Cerrahi Tıp Bülteni 2001,2;4: 154-167.
- ¹⁶ Sun Z, Wang X, Lasson A, et al. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36;1: 55-65 (Abstract).
- ¹⁷ Mishima S, Xu D, Lu Q, et al. The relationships among nitric oxide production, bacterial translocation, and intestinal injury after endotoxin challenge in vivo.The *J Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 1998, 44;1: 175-182.
- ¹⁸ Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, et al. Combined treatment with endothelin- and PAF antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury.The *Journal of Heart and Lung Transp* 1999, 18;9: 862-868.
- ¹⁹ Souza DG, Cara DC, Casalli GD, et al. Effects of the PAF receptor antagonists UK74505 on local and remotereperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *British Journal of Pharmacology* 2000; 131: 1800-1808
- ²⁰ Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ, et al. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers& Prevention* 2000; 9: 647-652.
- ²¹ Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000, 21;3:361-370
- ²² Unno N, Fink MP.Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998,27;2: 289-307
- ²³ Chen HF, Kou YR. Vagal and mediator mechanism underlying the tachypnea synthase caused by pulmonary air embolism in dogs. *J Appl Physl* 2000; 88: 1247-1253.

-
- ²⁴ Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, et al. Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intensive visible light: Suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Biochemistry* 1995; 92: 1177- 1181.
- ²⁵ Erdoğan B B (2003): Apoptosis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.
- ²⁶ Hikim A P S, Wang C, Leung A R, et al (1995): Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136 (6): 2770-2775.
- ²⁷ Mcphie D L, Coopersmith R, Peralta A H, et al (2003): DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*, 23 (17): 6914–6927.
- ²⁸ Kerr J F R, Winterford C M, Harmon B V, et al (1994): Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73 (8): 2013-2026.
- ²⁹ Nagata S, et al (1997): Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365.
- ³⁰ Özvaran M K (2004): Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi*, 5 (2): 110-115.
- ³¹ Rashed M M, Ragab N M. (2004): The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas. *Turk. J. Haematol.*, 21 (3): 141-147.
- ³² Öztürk F (2002): Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9 (2): 143-148.
- ³³ Ulukaya E (2007): Apoptozis ders notları. Erişim: <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisersnotu.pdf>, Erişim tarihi: 01.09.2008.
- ³⁴ Guimaraes C A, Linden R (2004): Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1638–1650.
- ³⁵ Tomatır A G (2003): Apoptozis; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci.* 23: 499-508.

-
- ³⁶ Yılmaz İ (2005): Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- ³⁷ Stassi G (2006): Detection of apoptosis in tissues, Apoptozis, hastalıklarla ilişkisi ve güncel belirleme yöntemleri kursu. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- ³⁸ Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel A, et al. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119 (3): 493-501.
- ³⁹ Giannetti L, Consolo U, Magnoni C, et al (2004): Apoptosis; escaping strategies in human skin cancer. *Oncology Reports*, 11: 401-405.
- ⁴⁰ Güvenç T (2002): İnfeksiyöz barsak hastalığının immunoperoksidaz tekniği ile tanısı ve B lenfositlerde apoptozisin incelenmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.
- ⁴¹ Walker P R, Leblanc J, Smith B, et al (1999): Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology*, 17: 329-338.
- ⁴² Herrmann M, Kalden J R (2003): Apoptosis and autoimmunity, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, University of Erlangen-Nuremberg, Institute for Clinical Immunology, Weinheim, Germany.
- ⁴³ Piret J P, Arnould T, Fuks B, et al (2004): Caspase activation precedes PTP opening in TNF- α -induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion*, 3: 261-278.
- ⁴⁴ Willingham MC (1999): Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47 (9): 1101-1109.
- ⁴⁵ Walker P R, Leblanc J, Smith B, et al. (1999): Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology*, 17: 329-338.
- ⁴⁶ Öktem S, Özhan M H, Özol D ve ark. (2001): Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1): 91-95.

-
- ⁴⁷ Zhang J, Xu M (2002): Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 12 (2): 84-89.
- ⁴⁸ Wijsman J H, Jonker R R, Keijzer R, et al. (1993): A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41 (1): 7-12.
- ⁴⁹ Dayan Y B, Kaveri S V, Kazatchkine M D, et al. (2000): Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies?. *Medical Hypotheses*, 55 (2): 103–108.
- ⁵⁰ Saraste A, Pulkki K (2000): Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45: 528-537.
- ⁵¹ Roshal M, Zhu Y, Planelles V, et al. (2001): Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, 6: 103–116.
- ⁵² Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M ve ark. (2004): Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 29 (3): 237-242.
- ⁵³ Staley K, Blaschke A J, Chun J, et al. (1997): Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation*, 4: 66 -75.
- ⁵⁴ Estaquier J, Idziorek T, Bels F D, et al. (1994): Programmed cell death and AIDS; significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Immunology*; 91: 9431-9435.
- ⁵⁵ Granger DN, Stokes KY. Role of Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury. Ignarro LJ (Ed). *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. Academic Press London, UK, 2000; 633-647.
- ⁵⁶ Lefer AM. Nitric Oxide: A Critical Determinant in Ischemia-Reperfusion. Ignarro LJ (Ed). *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. Academic Press London, UK, 2000; 649-660.

-
- ⁵⁷ Kanwar S, Tepperman BL, Payne D, et al. Time course of nitric oxide production and epithelial dysfunction during ischemia/reperfusion of the feline small intestine. *Circ Shock* 1994 Mar; 42(3):135-40.
- ⁵⁸ Chandrasekar B, Streitman JE, Colston JT, et al. Inhibition of nuclear factor kappa B attenuates proinflammatory cytokine and inducible nitric-oxide synthase expression in postischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1998 Feb 27; 1406(1):91-106.
- ⁵⁹ Kurose I, Wolf R, Grisham MB, et al. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 1994 Mar; 74(3):376-82.
- ⁶⁰ Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM, et al. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994 Oct; 267(4 Pt 1):G562-8.
- ⁶¹ Engelman DT, Watanabe M, Maulik N, et al. L-arginine reduces endothelial inflammation and myocardial stunning during ischemia/reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995 Nov; 60(5):1275-81.
- ⁶² Cheung PY, Salas E, Schulz R, et al. Nitric oxide and platelet function: implications for neonatology. *Semin Perinatol* 1997 Oct; 21(5):409-17.
- ⁶³ Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000 Jan 14; 66(8):663-73.
- ⁶⁴ Arichi H, Kimura Y, Okuda H, et al. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1982 May; 30(5):1766-70.
- ⁶⁵ Kimura Y, Ohminami H, Okuda H, et al. Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats. *Planta Med* 1983 Sep; 49(1):51-4.
- ⁶⁶ Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, et al. Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp Clin Res* 1998; 24(1):51-5.

-
- ⁶⁷ Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, et al. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res* 1998; 24(3):133-8.
- ⁶⁸ Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE, et al. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993 Apr 24; 341(8852):1103-4.
- ⁶⁹ Belguendouz L, Fremont L, Linard A, et al. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 1997 May 9; 53(9):1347-55.
- ⁷⁰ Laden BP, Porter TD, et al. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* 2001 Feb; 42(2):235-40.
- ⁷¹ Chanvitayapongs S, Draczynska-Lusiak B, Sun AY, et al. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport* 1997 Apr 14; 8(6):1499-502.
- ⁷² Li HF, Chen SA, Wu SN, et al. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2000 Mar; 45(4):1035-45.
- ⁷³ Lin JK, Tsai SH. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1999 Jul; 23(3):99-106.
- ⁷⁴ Hsieh TC, Juan G, Darzynkiewicz Z, et al. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res* 1999 Jun 1; 59(11):2596-601.
- ⁷⁵ Ray PS, Maulik G, Cordis GA, et al. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999 Jul; 27(1-2):160-9.
- ⁷⁶ Naderali EK, Doyle PJ, Williams G, et al. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin Sci (Lond)* 2000 May;98(5):537-43.

-
- ⁷⁷ Naderali EK, Smith SL, Doyle PJ, et al. The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats. *Clin Sci (Lond)* 2001 Jan; 100(1):55-60.
- ⁷⁸ Vedder N.B.:Flap physiology. *Mathes Plastic Surgery*, 2nd edition Philadelphia: Saunders Elsevier Inc, vol:1;483-506, 2006.
- ⁷⁹ Park PO, Haglund U, Bulkley GB, et al. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990;107:574-80.
- ⁸⁰ Ladipo JK, Seidel SA, Bradshaw LA, et al. Histopathologic changes during mesenteric ischaemia and reperfusion. *West Afr J Med* 2003;22:59-62.
- ⁸¹ Park PO, Haglund U, Bulkley GB, et al. The sequence of development of intestinal tissue injury after ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107: 574-580.
- ⁸² Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986 Jun; 250(6 Pt 1):G749-53.
- ⁸³ Turnage RH, Guice KS, Oldham KT. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. *J Surg Res* 1994 Jun; 56(6):571-8.
- ⁸⁴ Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005 Jul-Aug; 20(4):336-43. Epub 2005 Jul 18.
- ⁸⁵ Cohen IK, Diegelmann RF, Yager DR, et al. Wound care and wound healing. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7.th edition 1999; Cilt 1: 263-295.
- ⁸⁶ Grisham MB, Hernandez CA, Granger N, et al. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986;251: 567–574
- ⁸⁷ Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376-1386.

-
- ⁸⁸ Augustin AJ, Goldstein RK, Milz JL, et al. Influence of anti-inflammatory drugs and free radical scavengers on intestinal ischemia induced oxidative tissue damage. *Advances In Experiment Med Biol* 1992;316:239-251.
- ⁸⁹ Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS. Cytoprotection by diclofenac sodium after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1994;29:1044-1048.
- ⁹⁰ Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999;34:1458-1462.
- ⁹¹ Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, et al. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:69-74.
- ⁹² Kazez A, Demirbağ M, Üstündağ B, et al. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 2000;35:1444-1448.
- ⁹³ Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980; 1:109-131.
- ⁹⁴ Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991;79:153-158.
- ⁹⁵ Jane S Lee, Richard A Polin, et al. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Seminars in Neonatology* 2003;8:449-59.
- ⁹⁶ Dimmit RA, Lawrance R. Clinical management of necrotizing enterocolitis. *American Academy of Pediatrics* 2001;2:110-7.
- ⁹⁷ The Canadian Neonatal Network. Variations in Incidence of Necrotizing Enterocolitis in Canadian Neonatal Intensive Care Units. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 2004;39:366-72.
- ⁹⁸ Henry MC, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2004;28:221-33.

-
- ⁹⁹ Maayan-Metzger A, Itzchak A, Mazkereth R, et al. Necrotizing enterocolitis in full-term infants: case-control study and review of the literature. *J Perinatol* 2004;24:494-9.
- ¹⁰⁰ Wilson R, Kanto WP Jr, McCarthy BJ, et al. Epidemiologic characteristics of necrotizing enterocolitis: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1981;114:880-7.
- ¹⁰¹ Llanos AR, Moss ME, Pinzon MC, Dye T, Sinkin RA, Kendig JW. Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002;16:342-9.
- ¹⁰² Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenetic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996;43:409-32.
- ¹⁰³ Ledbetter DJ, Juul SE. Necrotizing enterocolitis and hemotopoieticcytokines. *Clin Perinatol* 2000;27:697-716.
- ¹⁰⁴ Covert RF, Neu J, Elliott MJ et al. Factors associated with age of onset of necrotizing enterocolitis. *Am J Perinatol* 1989;6:455-60.
- ¹⁰⁵ Ford HR, Sorrells DL, Knisely AS, et al. Inflammatory cytokines, nitric oxide and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 1996;5:155-9.
- ¹⁰⁶ Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin. *Am J Pathol* 1983;112:127-35.
- ¹⁰⁷ MacKendrick W, Hill N, Hsueh W, et al. Increase in platelet-activating factor levels in enterally fed reterm infants. *Biol Neonate* 1993;64:89-95.
- ¹⁰⁸ Claud EC, Walker WA. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *Faseb J* 2001;15:1398-1403.
- ¹⁰⁹ Ng PC, Li K, Wong RP et al. Proinflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:209-13.

-
- ¹¹⁰ Stoll BJ. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994;21:205-18.
- ¹¹¹ Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1990;336:1519-23.
- ¹¹² Minekawa R, Takeda T, Sakata M, et al. Human breast milk suppresses the transcriptional regulation of IL-1beta-induced NF-kappaB signaling in human intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:1404-11.
- ¹¹³ Reber KM, Nankervis CA. Necrotizing enterocolitis: preventative strategies. *Clin Perinatol* 2004;3:157-67.
- ¹¹⁴ Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin. *Am J Pathol* 1983;112:127-35.
- ¹¹⁵ Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Hsueh W. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Pathol* 1994;14:1017-28.
- ¹¹⁶ Oygür N. Nekrotizan Enterokolit. Yurdakök M, Erdem G (eds). *Neonatoloji*. 2.Baskı. Alp Ofset I. 2004.p.552-6.
- ¹¹⁷ Reber KM, Nankervis CA. Necrotizing enterocolitis: preventative strategies. *Clin Perinatol* 2004;3:157-67.
- ¹¹⁸ Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol*. 2003;8:449-59.
- ¹¹⁹ Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999;117:577-83.
- ¹²⁰ Caplan MS, Jilling T. The Pathophysiology of Necrotizing Enterocolitis. *American Academy of Pediatrics* 2001;2:103-9.
- ¹²¹ Hung LM, Su MJ, Chu WK, et al. The protective effect of resveratrols on ischemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br J Pharmacol* 2002; 135(7):1627-1633.

-
- ¹²² Naderali EK, Doyle PJ, Williams G, et al. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin Sci (Lond)* 2000 May;98(5):537-43.
- ¹²³ Kobara M, Tatsumi T, Takeda M, et al. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2003 Sep; 98(5):319-28. Epub 2003 Jun 20.
- ¹²⁴ Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012.
- ¹²⁵ Ferdinandy P, Dariau H, Ambrus I, et al. Peroxynitrate is a major contributor to cytokine induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 2000; 87:241-247.
- ¹²⁶ Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, et al. Effect of transresveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* 1998; 123:1691–1699.
- ¹²⁷ Kaplan S, Morgan JA, Bisleri G, et al. Effects of resveratrol in storage solution on adhesion molecule expression and nitric oxide synthesis in vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2005;80: 1773–1778.
- ¹²⁸ Galili Y, Ben-Abraham R, Rabau M, et al. Reduction of surgery-induced peritoneal adhesions by methylene blue. *Am J Surg* 1998;175:30–32.
- ¹²⁹ Kazunori N, Nakamura RM, di Zerega GS. Biochemical evaluation of postsurgical wound repair: prevention of intraperitoneal adhesion formation with ibuprofen. *J Surg Res* 1983;34:219–226.
- ¹³⁰ Golan A, Maymon R, Winograd I, et al. Prevention of postsurgical adhesion formation using aspirin in a rodent model: a preliminary report. *Hum Reprod* 1995;10:1797–1800.
- ¹³¹ Dunn RC, Steinleitner AJ, Lambert H. Synergistic effect of intraperitoneally administered calcium channel blockade and recombinant tissue plasminogen activator to prevent adhesion formation in an animal model. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1327–1330.

-
- ¹³² Birrell MA, McCluskie K, Wong S, et al. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF- κ B-independent mechanism. *FASEB J* 2005;19:840–841.
- ¹³³ Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218–220.
- ¹³⁴ SATO M., MAULIK N., DAS D.K., et al: Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 957,122-35. (2002)
- ¹³⁵ Bradamante S., Barengi L., Piccinini F., et al: Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric oxide- and adenosine-mediated mechanism, *Eur. J. Pharmacol.*, 465,115-123. (2003)
- ¹³⁶ Hung L.M., Su M.J., Chu W.K., et al.: The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy, *Br. J Pharmacol*, 135,1627- 1633. (2002)
- ¹³⁷ Ray P.S., Maulik G., Cordis G.A., et al: The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury, *Free Radic. Biol. Med.*, 27,160-169. (1999)
- ¹³⁸ Imamura G., Bertelli A.A., Bertelli A., et al : Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, 282(6),H1996-2003. (2002)
- ¹³⁹ Hattori R., Otani H., Maulik N., et al : Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide, *Am. J. Physiol.*, 282, H1988-H1995. (2002)
- ¹⁴⁰ Hung L.M., Su M.J., Chen J.K., et al: Resveratrol protects myocardial ischemiareperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms, *Free Radic. Biol. Med.*, 36(6),774-781. (2004)
- ¹⁴¹ Kızıltepe U., Turan N.N., Han U., et al :Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury, *J. Vasc. Surg.*, 40(1),138-45. (2004)

-
- ¹⁴² Kaplan S., Bisleri G., Morgan J.A., et al : Resveratrol, a natural red wine polyphenol, reduces ischemia-reperfusion-induced spinal cord injury, *Ann. Thorac. Surg.*, 80, 2242-2249. (2005)
- ¹⁴³ Giovannini L., Migliori M., Longoni B.M., et al : Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 37(3),262-70. (2001)
- ¹⁴⁴ Sinha K., Chaudhary G., Gupta Y.K.: Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats, *Life Sci.*, 71(6), 655-65. (2002)
- ¹⁴⁵ Huang SS, Tsai MC, Chih CL et al. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sciences* 2001;69:1057-65.
- ¹⁴⁶ Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, et al. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res* 1998;24:133-8.
- ¹⁴⁷ Martín AR, Villegas I, La Casa C, et al. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1399-410.
- ¹⁴⁸ Hei Zi-qing, Gan Xiao-liang, Huang Pin-jie, et al. Influence of Ketotifen, Cromolyn Sodium, and Compound 48/80 on the survival rates after intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterology* 2008, 8:42
- ¹⁴⁹ Colak T., Polat A., Bagdatoglu O., et al. Effect of Trapidil in Ischemia/Reperfusion Injury on Rat Small Intestine. *Journal of Investigative Surgery*, 16:167–176, 2003
- ¹⁵⁰ Spanos CP, Papaconstantinou P, Spanos P, et al: The Effect of L – arginine and Aprotinin on Intestinal Ischemia-reperfusion Injury. *J Gastrointest Surg* 2007, 11(3):247-255.
- ¹⁵¹ Souza DG, Guabiraba R, Pinho V, et al: IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *J Immunol* 2003, 170(9):4759-4766.

-
- ¹⁵² Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, et al. Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch Surg.* 1980;115: 136-40.
- ¹⁵³ Giannoudis PV. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury.* 2003; 34:397-404.
- ¹⁵⁴ Norwood MG, Bown MJ, Sayers RD. Ischaemiareperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 28:234-45.
- ¹⁵⁵ Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004;70: 71-86.
- ¹⁵⁶ Damas P, Ledoux D, Nys M, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg.* 1992; 215:356-62.
- ¹⁵⁷ Muehlstedt SG, Richardson CJ, Lyte M, et al. Systemic and pulmonary effector cell function after injury. *Crit Care Med.* 2002; 30:1322-6.
- ¹⁵⁸ Pape HC, Van Griensven M, Rice J, et al. Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers. *J Trauma.* 2001; 50:989-1000.
- ¹⁵⁹ Pimenta M, Nascimento J, Martins D, et al. The intestinal tract as the major source of interleukin 6 production during abdominal aortic clamping and hind limb ischaemia-reperfusion injury. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 22 (S 1) 2007*
- ¹⁶⁰ Roumen RMH, Hendriks T, Ven-Jongekrijg J, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock and severe blunt trauma. *Ann Surg* 1993;218:769–76.
- ¹⁶¹ Spanos C. P., Papaconstantinou P., Spanos P., et al. The Effect of L-arginine and Aprotinin on Intestinal Ischemia–reperfusion Injury. *J Gastrointest Surg* (2007) 11:247–255
- ¹⁶² Rosario HS, Waldo SW, Becker SA, Schmid-Schonbein GW. Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Pathol* 2004 May; 164(5):1707-16.

¹⁶³ Wu B, Iwakiri R, Ootani A, Fujise T, Tsunada S, Fujimoto K. Platelet-activating factor promotes mucosal apoptosis via FasL-mediated caspase-9 active pathway in rat small intestine after ischemia-reperfusion. *FASEB J* 2003 Jun; 17(9):1156-8. Epub 2003 Apr 22.

¹⁶⁴ Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1998 Feb; 274(2 Pt 1):G270-6.