T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Adnan ABASIYANIK
ANABİLİM DALI BAŞKANI

115 264

DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNDE SELEKTİF VE NONSELEKTİF NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİM İNHİBİTÖRLERİNİN İNTESTİNAL HASARA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlhan ÇİFTCİ

115264

TEZ DANIŞMANI
Yard. Doç. Dr. Alaeddin DİLSİZ

DOKÜMAN

KONYA-2002

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ **3**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT 4

2.2. NEK VE NO 12

2.3. LNAME VE AMİNOGUANİDİNE 14

3. MATERYAL VE METOD **15**

3.1. DENEYSEL ÇALIŞMA 15

3.2. NEK OLUŞTURULMASI 15

3.3. ÇALIŞMA GRUPLARI 15

3.4. DEĞERLENDİRME 16

3.5. İSTATİSTİK ANALİZ 17

4. BULGULAR **19**

4.1. SAĞ KALIM ORANLARI 19

4.2. AĞIRLIK DEĞİŞİMİ 19

4.3. MAKROSKOPİK BULGULAR 20

4.4. MİKROSKOPİK BULGULAR 21

4.5. NİTRİT+NİTRAT SEVİYELERİ 22

5. TARTIŞMA VE SONUÇ **24**

6. SONUÇLAR **29**

7. TÜRKÇE ÖZET **30**

8. İNGİLİZCE ÖZET **31**

9. KAYNAKLAR **32**

KISALTMALAR

NO.....:Nitrik Oksit

iNOS.....:İnducible Nitric Oxide Synthase

cNOS.....:Constitutive Nitric Oxide Synthase

AG.....:Aminoguanidine

LNAME.....:N-nitro L-arjinin Metil Ester

K.....:Kontrol

N.....:Nekrotizan Enterokolit Grubu

NŞ.....:Nekrotizan Enterokolit Şem Grubu

AG.....:Aminoguanidine

L.....:LNAME Grubu

NEK.....:Nekrotizan Enterokolit

GİS.....:Gastro İntestinal Sistem

PAF.....:Platelet Aktive Edici Faktör

TNF-alfa.....:Tümör Nekrozis Faktör Alfa

İL.....:İnterlökin

İg.....:İmmunglobulin

İFN.....:İnterferon

LPS.....:Lipopolisakkarit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğanların en sık acil cerrahi müdahale gerektiren bir patolojidir. Bu hastalığın görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Yenidoğan Yoğunbakım Ünitelerinde hasta takip ve tedavi uygulamalarının gelişmesi ile özellikle yenidoğanın respiratuar distres sendromu tedavisinde başarı sağlanması ve prematüre bakımının gelişmesi bu hastalığın görülme sıklığını daha da artırmıştır.

NEK yenidoğanın ince barsağını tutan, mukozadan başlayıp tüm katları tutabilen inflamasyon ve nekroz ile karakterize, ilerleyici bir hastalıktır. Mortalitesi oldukça yüksektir. Önemi gittikçe artmasına rağmen hastalığın etyopatogenezi tam olarak ortaya konulamamıştır. Prematürite, hipoksi, beslenme, farmakolojik ajanlar, infeksiyon, sitokinler, barsak bariyerinin bozulmasına sebep olan etkenler gibi bir çok faktör suçlanmaktadır. Ama bunlar arasında kesinleşmiş etyolojik faktör henüz bulunamamıştır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda barsak inflamasyonunda önemli rol oynayan NO'in NEK'te barsak hasarının patogenezinden de sorumlu olabileceği yolunda bulgular elde edilmiştir.

NO gastrointestinal sistemde etkin bir moleküldür. İki farklı enzim tarafından kontrol edilir. Bu enzimlerin etkisi ile ortamda belirli miktarda bulunmaktadır. Bazal seviyenin sağlanması ve yararlı etkilerin oluşmasında etkili olan enzim cNOS'dır. İnflamasyonda NO seviyesini aşırı miktarlarda artıran ve inflamatuar kaskatta rol alan mediatörler tarafından aktive edilebilen iNOS'ın patolojik etkiyi oluşturduğu tezi savunulmaktadır. Bu enzimlerin inhibisyonu ile deneysel inflamatuar barsak hastalıkları ve sepsis modellerinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmaların çoğunda iNOS'un nonselektif inibitörü olan LNAME kullanılmıştır. LNAME L-arjinin metil esteridir ve NOS'u total olarak inhibe etmektedir. AG ise 1892 yılında nitroguanidinin redüksiyonu ile oluşturulmuş bir moleküldür. Daha sonra yapılan çalışmalarda NOS inhibisyonu yaptığı tespit edilmiştir. NEK'de iNOS un arttığı gözlemlenmişse de iNOS inhibisyonunun intestinal hasara etkisini ortaya koyacak çalışmalar yapılmamıştır.

Çalışmamızda, bu sonuçtan hareket ederek hem NEK etyopatogenezi, hemde NEK'den korunma açısından faydalı olabilecek yeni bir yaklaşım ve katkı olarak iNOS inhibisyonunun intestinal hasara etkisi, deneysel NEK modelinde araştırılmıştır. Bunun için selektif ve nonselektif iNOS inhibitörleri verilerek, mortalite, makroskopik ve mikroskopik morfoloji, NO üretiminin seviyeleri tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

Çocuk Cerrahisi açısından önemi gittikçe artan ve üzerinde bilinmeyenlerin çoğunlukta olduğu NEK, 1960 ortalarına kadar infantların mortalite ve morbiditesinde önemli bir sebep değildi. Daha sonra yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde GİS'in önemli bir hastalığı olarak öne çıktı. Sıklıkla prematür bebeklerin GİS'ini tutar ve ölümcül seyreder. NEK, yenidoğanlarda en sık acil cerrahi gerektiren bir patoloji olup, diğer cerrahi müdahale gerektiren GİS hastalıklarından daha yüksek mortaliteye sahiptir[1]. Son 30 yılda insidansı gittikçe artmaktadır. Mortalite oranı %10-50 arasında değişmektedir ve pannekrozda oran daha da artmaktadır[2,3].

Bu ciddi hastalığın etyolojisi yaygın klinik ve laboratuvar araştırmalara rağmen net olarak ortaya konulamamıştır.

NEK etyopatogenezi tam oarak ortaya konmamasıyla multifaktöriyel olduğu kabul edilir. NEK'in etyolojik faktörleri arasında, en tutarlı ve yaygın sebep prematüriteye bağlı barsak immatüritesidir. Diğer faktörler arasında; gelişmemiş yenidoğan barsak bariyeri, özellikle çok hassas olan splanknik hipoperfüzyon, perinatal asfiksinin mezenterik sirkülasyonu etkilemesi buna bağlı intestinal hasar, mikrofloranın invazyonu sayılabilir[4,5].

NEK genellikle prematür bebeklerde hayatın ilk haftasında görülür. Fullterm bebeklerde de görülebilir. Hayatın ilk günü, ilk haftası veya ilk ayında meydana gelebilir. Epidemiyolojik olarak iki tipi vardır. Sporadik tip (% 80) epidemik tipten fazladır. Etkilenen vakalar genellikle ağızdan beslenen ve ortalama 3 günlük bebeklerdir. Kız/erkek oranı 1/2'dir. Hasta bebeklerin çoğunluğu beslenmiştir. Fakat beslenmemiş bebekler de etkilenebilir.

1975'ten beri kritik olgulardaki risk faktörlerini belirlemek, hastalığın gidişi ve erken teşhis, cerrahi tedavinin daha iyi seçimi, klinik tablonun daha iyi tanımlanmasına yönelik daha fazla bilgi edinmek maksadı ile NEK'li hastaların takip ve tedavisi daha düzenli şekilde ele alınmaya başlanmıştır.

Erken tanı ve uygun tedavi mortalitede belirgin azalma sağlamıştır.

2.1.1. TARİHÇE

170 yıl önce NEK benzeri vakalar bildirilmiştir. Fakat yayınlanmış ilk gerçek NEK vakası belirlenememiştir. Bazı araştırmacılar Siebold'un 1825'de ilk NEK olgusunu yayınladığını inanmaktadır[6]. 1888 yılında, NEK olduğu düşünülen peritonitten

ölen 5 hasta yayınlandı[7]. Başarılı tedavi ilk olarak lokalize NEK'li bir yenidoğanda1943 yılında 35 haftalık bir bebekte gelişen distansiyon sonucu bebek opere edilerek ileal perforasyona primer sütür konularak gerçekleştirildi[8].

2.1.2. İNSİDANS

Son çalışmalarda Amerika Birleşi Devletleri'nde 1-3/1000 canlı doğum oranında, tanımlanmasına rağmen NEK'in gerçek insidansı hala açık değildir. Doğum ağırlığı 2000 gramdan daha az ve yoğun bakım ünitesinde bakılan bebeklerde daha fazla görülmektedir. Doğum ağırlığı 1000 gram ve daha az olan bebeklerde görülme oranı %1 iken, bu bebekler yoğun bakıma alınırsa bu oran % 5'e kadar çıkmaktadır.

2.1.3. EPİDEMİYOLOJİ VE PATOGENEZ

Hastalık etyopatogenezi tam olarak açıklanamamakla beraber suçlanan bazı faktörler şunlardır:

2.1.3.1. GESTASYONEL YAŞ VE DÜŞÜK DOĞUM AĞIRLIĞI:

Kliegman ve Fanaroff çalışmalarında düşük doğum ağırlığının NEK patogenezinde önemli rol oynadığını göstermişler. Ortalama 31 haftalık 123 yenidoğan üzerinde yapılan bir çalışmada NEK % 7,3 oranında bulunmuş[9]. En yüksek insidansın doğum ağırlığı 750-1000 gr olan çocuklarda olduğu bilinmektedir[10].

NEK gelişimi doğum ağırlığı arttıkça azalır. Savunulan diğer görüş ise gestasyonel yaşın düşük doğum ağırlığından daha önemli olduğudur. Ortalama 33,4 haftadan daha önce doğanlar NEK gelişimi açısından yüksek riske sahiptir[11]. Diğer bir özellik NEK'in başlangıç zamanıyla gestasyonel yaş arasında ters bir ilişki bulunmasıdır[12].Gestasyonel yaş 35-36 haftayı geçince riskte keskin bir azalma olur. NEK gelişiminde GİS matürasyonunun primer rol oynadığı düşünülmektedir[13]. Annesine fetal akciğer matürasyonnu sağlamak maksadı ile steroit verilen bebeklerde NEK insidansı normale göre daha düşük bulunmuştur[14]. Buradaki asıl etken steroidin akciğerle beraber barsak matürasyonuna olan etkisidir. Verilen steroit barsak matürasyonunun erken olmasını sağlamaktadır. Barsakların matürasyonu ile barsak bariyer bütünlüğü artmakta ve NEK oluşma riskini azalmaktadır.

2.1.3.2. BESLENME

NEK gelişen bebeklerin %90-95 i ticari mamalarla beslenmiştir. Buna karşılık prematüte bebeklerde oral beslenmeyi geciktirerek veya volümü azaltarak NEK'i önlemeye yönelik çalışmalar hastalığın insidansını düşürmede tartışmalı sonuçlar vermiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, anne sütü tüm enfeksiyonlar için ve NEK için koruyucu role sahiptir[15,16]. Anne sütü bebeğe sekretuar

lgA ve makrofaj sağlar. Bu nedenle anne sütü alan bebeklerde NEK insidansı azalmaktadır. Aynı zamanda anne sütü yenidoğan barsak florasının bifidobakterium ile kolonize olmasını sağlayarak diğer patojen kolonizasyonunu azaltır[17]. Beklemiş ve soğutulmuş anne sütünün koruyucu etkisi yoktur[18]. Mama alanlarda anne sütü alanlara göre 6 kat daha fazla NEK oluşmaktadır. Mama bakteriyel çoğalma için bir substrat görevi görür.

Mamaların yüksek osmolaritesi veya çok hızlı ilerleyen beslenme rejimi doğrudan barsak mukoza hasarına yol açabilir. Çeşitli hayvan çalışmaları göstermiştir ki yüksek volümde hipertonik solüsyonların intraluminal uygulaması vasküler alandan barsak lümenine hızlı bir sıvı kaymasına neden olur ve bu da serum osmolaritesinde artışla sonuçlanır. Bu hemodinamik değişiklikler barsak mukoza kan akımını azaltır ve mukozayı yaralar. Fakat küçük miktarlarda (14 ml. daha az) hipertonik ilaçlar GİS'e verildiğinde kan volümü ve hemodinamik şartlarda önemli değişiklikler olduğunu ileri sürmek zordur[19]. Hipertonik solüsyonların doğrudan intestinal mukozaya uygulanması deney hayvanlarında mukozal hücre hasarına yol açar. Fakat çoğu hiperosmolar formüller ve medikasyonlar hastaya mide yoluyla verilir. Mide, duodenum ve ince barsakta önemli derecede dilüsyon meydana gelir. Öyle ki alınan hipertonik sıvının NEK'in en sık geliştiği yer olan distal ince barsağa ulaştığında hala yüksek tonositeli olduğu şüphelidir. Yetişkinlerde yapılan bir deneyde fazla miktarda % 15'lik mannitol mideye verildiğinde tüm deneklerde diare, %2'sinde dumping semptomların gelişmesine karşın minimal mukozal değişiklikler bulmuşlar[20]. Bunlardan başka asitleştirilmiş kazein verilen yenidoğan tavşanlarda NEK oluşturulmuştur[21].

Bütün bunlara rağmen hiç beslenmemişlerde, yalnız anne sütü alanlarda veya parenteral yolla beslenen az sayıda bebekte de hastalık meydana gelebilir.

Beslenmenin NEK oluşumundaki rolünde mukozal yapı, bakterilerin sayısı ve tipi, besin içeriğinin bakteri sayısını artırması gibi faktörlerin etkili olduğu kabul edilir.

2.1.3.3. İNFEKSİYON AJANLARI

NEK'in normal veya yaralı barsağı tutan bir infeksiyöz hastalık olduğu, çeşitli bakteri ve virüslerin primer ajanlar olduğu ileri sürülmüştür[22,23]. İnfeksiyonun etyolojik bir faktör olduğunu destekleyen deliller sunlardır:

1-NEK'li hastalarda bazen aynı enfeksiyöz ajanların mevcudiyeti ve NEK'in epidemik olarak görülebilmesi. NEK'li infantlarda yapılan bir arastırmada hastaların kan, gayta ve BOS kültürlerinde önemli oranda ECHO virüs Tip-22, Eschercia coli, Klebsiella gibi bir çok mikroorganizma üremiştir[24,25].

2-Clostridial türlerle NEK arasında ilişki[26]. Clostridium türlerinin oral alınmasından sonra NEK benzeri bir hastalık oluşumu.

3-Bilinen risk faktörü taşımayan bebeklerde NEK gelişimi.

4-Hidrojen gazının varlığı (%30 olguda). Bu gazı üreten bakterilerdir. Pnömatozis intestinalis görünümü bu gazın göstergesidir[27].

5-Antibiyotiklere cevap alınması.

6-Perinatal iskemiden günler ve haftalar sonra geç NEK oluşumu[28].

7-Deneysel olarak endotoksinin verilmesi ile NEK'e benzer lezyonlar oluşması. Endotoksinler TNF-alfa ve PAF salınımına aracılık eder. NEK'li prematüre infantların serumunda TNF-alfa, PAF ve İL-6 seviyeleri yüksektir[29]. Endotoksin NEK li olgulardan kan kültüründe gram(-) bakteri üreyen olguların %80 inde, NEK li olguların ise yaklaşık % 50 sinde tespit edilmiştir.

Clostridial türleri NEK'in sebebi olarak kabul edilmiştir[26]. Bu organizmalar zorunlu anaerobdur iskemik dokuyu istila eder, gaz ve oldukça güçlü toksinler üretirler. Hayatın ilk günü yenidoğan barsağında hızla kolonize olurlar. Fakat bu bakteri hasta olmayanların gaitasında da izole edilmektedir, bu yüzden gerçek anlamda hastalığa sebep olup olmadığını değerlendirmek mükün görülmemektedir.

NEK'in muhtemel bir ajanı olarak Clostridium difficile üzerine yakın zamanda bir hayli ilgi duyulmuştur. Han ve ark[30]. yaptıkları çalışmada 2 ayda 13 hastayı tutan NEK salgını ve kontrollerde % 11.8 hasta bebeklerde % 92.3 Clostridium difficile sitotoksini bulmuşlar, NEK'li çocukların % 61.5 inde bu organizma izole edilirken kontrol bebeklerin hiçbirinde tespit edememişlerdir. Bu bilgiler NEK vakalarında Clostridial türlerin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Fakat Clostridianın mevcut nekrotik dokuya yerleşerek inflamasyona sekonder olarak etki ettiği veya güçlü toksinler salgılayarak intestinal inflamasyon ve nekrozu primer olarak başlattığı açık değildir.

Bakterilerin yanısıra Rotavirüs ve Coronavirüsle ilişkili çeşitli NEK salgınları rapor edilmiştir[31, 32].

2.1.3.4. FARMAKOLOJİK AJANLAR:

Prenatal dönemde annesi teofilin alan bebeklerde NEK insidansında bir artış gözlenmektedir[33]. Teofilin, aminofilin gibi ksantin deriveleri ürik asit metabolizması ile ilişkili olarak toksik olan serbest oksijen radikallerinin üretimine neden olarak mukozal hasara yol açmakta ve aynı zamanda barsak motilitesini yavaşlatmaktadır.

Yüksek doz oral vitamin E verilen olgularda NEK insidansında artış tespit

edilmiştir. Nedeni hiperosmolar olmasıdır[34].

İndometazin, Prostoglandin sentezinin bloke edilmesine ve vazokonstrüksiyona neden olur. Bu ilaç Patent Duktus Arteriozusun kapatılmasında kullanılır. Bu ilacın düşük doğum ağırlıklı infantlarda GİS perforasyonlarına ve NEK'e neden olduğu görülmüştür[35]. İndometazin mezenterik vasküler rezistansı artırır ve mezenterik kan akımını azaltır. İntrauterin girişimlerden sonra tokolitik olarak kullanılan İndometazin, NEK insidansını artırmaktadır. Ancak İndometazin tek başına NEK nedeni değildir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklere verildiğinde NEK için bir risk faktörü olduğu söylenebilir.

Kokainin vazokonstrüktif etkileri nedeniyle NEK için etyolojik bir faktör olduğu düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada anneleri kokain alan yenidoğanlarda NEK insidansı % 11 kontrol grubunda ise % 6 olarak tespit edilmiştir[36]. Prenatal dönemde kokaine maruz kalan yenidoğanlarda 238 kat daha fazla NEK oluşmaktadır. Bu gruplarda mortalite oranı daha yüksektir. Bu olguların trakeal aspirasyon, gaita ve kan kültürlerinde Clostridium türleri ve Eschercia coli tespit edilmiştir[30].

2.1.3.5. SİTOKİNLER

Bakteriyel hücre duvar ürünleri endotoksin olarak adlandırılır ve enfeksiyonlarda birçok patolojik role sahiptir. Prematür infantlarda enteral beslenme sonucu gaytada endotoksin yapımının arttığı ve buna bağlı spontan endotoksemi gelişebileceği gösterilmiştir[37]. Endotokseminin kapiller permeabilitede artış, hipotansiyon, nötrofil agregasyonu, trombosit agregasyonu, pulmoner hipertansiyon, bronkokonstriksiyon gibi sistemik etkileri vardır. Hayvan deneylerinde endotoksemiye cevap bazı faktörlerle olmaktadır. Bunlar: PAF[38], TNF-alfa[39], İL-1[40]. Bu sitokinlerin barsak nekrozunda da görev aldığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir[41] .

Sitokinlerin hemodinamik olarak mı, yoksa doğrudan doku hasarı ile mi etkili olduğu tam olarak açık değildir. NEK etyopatogenezinde önemli faktörlerden hipoksi ve bakteriyel invazyon ile sitokinlerin dolaşımdı artması birbirine bağlıdır[42]. Hipoksi ve endotoksemi sinerjist etkilidir. Hipotansiyon, hemokonsantrasyon, intestinal hipoperfüzyon ve buna bağlı oluşan intestinal hasarda birbirine katkıda bulunurlar.

Klinik olarak mama alan prematür infantlarda spontan olarak endotoksemi ve PAF seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir. PAF'ın yarı ömrünü sınırlandıran, PAF'a spesifik bir enzim olan asetil hidrolaz yenidoğanlarda düşük seviyededir ve NEK'li infantlarda kontrol grubuna göre aktivitesi daha düşüktür. Anne sütünde bu enzim bulunmaktadır[43]. PAF'ın mezenterik sirkülasyona verilmesi ile barsaklarda NEK'e

benzer hasar oluştuğu gözlenmiştir[44]. Bunu takiben dozun artırılması barsak nekrozu ile sonuçlanmıştır[45]. Endotoksine bağlı intestinal hasar PAF antagonisti verilerek engellenmiş bu sebeple hasarın PAF'a bağlı olduğu düşünülmüştür[45]. PAF'ın hipoksi ve metabolik asidozda arttığı bilinmektedir[46]. Yenidoğanın asfikside kalması NEK açısından risk oluşturmaktadır. Bu mekanizma da PAF'ın etyopatogenezde rol aldığı görüşünü desteklemektedir.

PAF ile beraber TNF-alfa, IL-6, IL-8'in salınımı NEK patogenezinde rol oynadığı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir[29,47]. Formule mama ile beslenen yenidoğan ratlarda NEK benzeri intestinal hasar oluştuğu ve İL-12 seviyesinin azaldığı, iNOS ve İFN-gama'nın arttığı tespit edilmiştir[48].

NEK ağır bir sepsisin klinik görünümü olduğu için inflamatuar sitokinlerin ve NO'nun lokal intestinal üretimi NEK deki barsak nekrozunun patogenezisinde rol oynamaktadır[48]. Son zamanlarda NO'nun septik şokun patogenezinde rol aldığı ve sepsisli yenidoğanlarda ve adultlarda sitokinlerle beraber NO seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir[49].

2.1.3.6. YENİDOĞANLARDA BARSAK BARİYERİ

Bozulmuş barsak bariyeri NEK oluşumunda önemli bir faktördür. Barsak bariyeri enterik bakteriler tarafından vücudun istila edilmesini önleyen fonksiyonel ve anatomik bir savunma sistemidir. Barsak bariyerini oluşturan faktörler; gastrik asit, pepsin, pankreas enzimleri, mukus, immunglobülinler ve intestinal peristaltizmdir. Prematür infantların barsak bariyeri hem fizyolojik hem de immünolojik olarak olgunlaşmamıştır. Bakterileri öldüren gastrik asit ve pepsinin sekresyon seviyeleri ilk 4 haftada düşüktür. Pankreas enzimleri de ilk bir yıl içerisinde relatif olarak az salgılanır. İmmatür barsak goblet hücrelerinden de az miktarda mukus salgılanır. Mukoza hücreleri az gelişmiştir ve fonksiyonlarını yürütmek için yetersizdir.

Prenatal dönemin sonlarına doğru peristaltik hareketler başlar ancak 8. aya kadar tam olarak gelişim olmaz. Koruyucu İg'ler ve özellikle İgA prematür barsakta yetersizdir. Bebek anne sütüyle de beslenmiyorsa, anne sütünde bulunan sekretuar lgA, oligosakkarid, laktoferrin, lizozim, epidermal growth faktör ve immun hücrelerden yararlanamaz[50].

NEK için en çok suçlanan etyolojik faktörlerden biri mukozal kan akımının azalmasıdır ve bu olay mukozanın hipoksik kalması ve hücrenin yaralanması nekroze olması demektir. Mukozal nekroz ile bariyer anatomik olarak bozulunca bakteriyel invazyon için uygun şart oluşur.

NEK de barsak bariyerinin bozulduğunu destekleyen bulgular:

1) Prematüre bir infant hazır mama aldığı zaman spontan endotokseminin ve yükselmiş PAF seviyelerinin görülmesi[47].

2) NEK yönünden yüksek riskli olan durumlarda kortikosteroidlerin verilmesi ile NEK insidansının azalması. Kortikosteroidlerin mukoza hücrelerinin olgunlaşmasını sağladığı ve barsak bariyer fonksiyonunu düzelttiği düşünülmektedir[51,52].

3) Anne sütünün deneysel çalışmalarda mukozal bariyeri güçlendirerek NEK'i önlediği görülmüştür[15,16].

4) Hazır mama alan infantlarda anne sütü alanlara göre NEK insidansı 6 kat daha fazladır[15,16].

5) Yapılan çalışmalarda, oral IgA ve IgG verilen hastalarda NEK görülme sıklığı azalmıştır[53,54].

MUKOZAL BARİYERİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Hipoksi: Hipoksiye yenidoğanın cevabı kuşlarda ve memelilerde dalma refleksinin (diving) analoğudur. Buna göre hipoksi sırasında aşırı vazokonstriksivon ile kan perifer organlardan (böbrek, barsak gibi) hayati organlara (kalp ve beyne) yönelir[55]. Böylece barsak mukoza kan akımı ciddi oranda azalmaktadır.

Umblikal Ven Kateteriyle Exchange Transfüzyon: Bu işlemden sonra % 1-2 NEK gelişimi rapor edilmiştir. Kateterin ucu umblikal ven ve duktus venozus veya portal yen ayrımına yerleşir. Exchange transfüzyonun injeksiyon fazında bu bölgeye kateterden olan akım sonucu ven basıncı anlamlı şekilde artar ve venöz konjesyon sonucu barsakta arteriyel akım azalır[56].

Umblikal Arter Kateterizasyonu: NEK gelişen bebeklerde % 25-45 arasında değişen sıklıkta umblikal arter kateterizasyonu yapıldığı gösterilmiştir[57]. Bu bebeklerde kateterizasyona bağlı mezenterik tromboembolizm ile NEK arasında bir etyolojik ilişki olabileceği öne sürülmüştür[57]. Eğer beslenmeye bağlı barsakta büyük metabolik ihtiyaç varsa, beslenme ve multipl tromboemboli kombinasyonu intestinal nekroz ve NEK'e yol açabilir. Pratikte kanıtlayacak kontrollü bir çalışma yoktur.

Kardiovasküler Hastalıklar: İnfantlarda supraventriküler taşikardi tedavisine alınanlarda NEK insidansı belirgin şekilde artrnıştır[58]. Yine kardiak anomalileri tespit amacıyla yapılan kardiak kateterizasyon ve[59] kardiyovasküler anomalilere bağlı azalmış kardiyak output mezenterik kan akımında azalmaya neden olabilir[58].

Hiperviskozite: Viskozite bir sıvı tabakası diğer bir tabaka üzerinde hareket ettiğinde oluşan iç sürtünmenin bir ölçüsüdür. Kanın viskozitesinin ana belirleyicisi

hematokrittir. Kan nonnewtonian bir sıvı olduğundan Hct % 62'nin üzerine çıkınca viskozite özellikle artar. yenidoğanda polisitemi % 65 ve üzeri hematokrit ile karakterizedir. Fakat kan pH'sı. vücut ısısı ve protein konsantrasyonuna bağlı olarak daha düşük değerlerde de vizkozite artışı meydana gelebilir. Hiperviskozite yenidoğan dönemde daha sık görülür ve mikrosirkülasyonda azalmaya yol açar. İntestinal kan akımının azalmasıyla NEK'in etyolojisinde önemli bir faktör olabilir. Yapılan çalışmalarda bunu destekleyen bulgular mevcuttur[57]. 1500 grdan düşük ağırlıklı, ağır NEK'li bebeklerde polisitemi insidansını %28 kontrol grubunda % 10 bulundu[60].

İskemi reperfüzyon hasarı: İskemik dokuda reperfüzyon sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücresel yapılara son derece toksiktir. Hücre zarını, lizozom ve mitokondri gibi hücre yapılarını tahrip eder. Kısa süreli iskemiyi takipeden reperfüzyon durumunda bile mukoza bariyeri değişebilmekte, öyle ki mukozal permeabilite belirgin şekilde artmaktadır. Bu artışa başta serbest 0^2 radikalleri olmak üzere, eikosanoidler, Prostoglandin-E2 ve nötrofiller yol acar[61].

Son yapılan çalışmalarda distansiyonun barsak duvar kan akımını azaltarak, beslenmesini bozduğu için NEK gelişimi ve prognozunu kötü yönde etkilediği tespit edilmiştir[62].

2.1.4. PATOLOJİ:

Makroskopi: NEK primer olarak mukozanın bir hastalığıdır[63]. Seroza yüzeyine kadar ilerleyebilir. En sık olarak etkilenen bölüm sıra ile terminal ileum, çıkan ve transvers kolondur. İnen kolon ve nadir olarak mide ve incebarsakların büyük kısmı da etkilenebilir[63].

Çok şiddetli vakalarda ödem, mukozal yüzeyel ülserasyonlar ve hemoraji mevcuttur. Serozal yüzey tutulabilir. Ödem ve subserozal hemoraji olabilir. Vakaların çoğunda pnömatozis intestinalis vardır ve bu sıklıkla mezenter içine yayılır. Hasta dikkatli olarak değerlendirildiğinde transmural infarkt vardır. Genellikle antimezenterik yüzeyde oluşur ve perforasyon meydana gelir. Yaygın peritonit, lokal abse, kitle formasyonları görülür. Nekroz barsağın tek bir segmentini (%50) veya multipl segmentlerini tutabilir[63]. İlerleyici NEK'de ise olguların yaklaşık % 20'de barsağın en az % 75'ini tutan pannekrozis görülebilir.

Mikroskopi: Olgularda intestinal Paneth hücrelerinin azaldığı ve bunlardan salgılanan lizozim (müramidaz) enziminin yokluğu dikkati çekmektedir. Mukoza koruyucu bir özelliği olan lizozim aynı zamanda flora düzenini sağlamaktadır[64]. Hastalığın erken döneminde inflamatuvar hücrelerin henüz duvar infiltrasyonu yoktur

ancak bakteriler özellikle mukoza ve submukozada gözlenir. Mukozada ödem ve hemoraji vardır. Submukozada kapiller yatakta trombosit agregasyonuna bağlı tıkaç oluşumu görülür. Tromboz genellikle kapiller yatağın distal venöz boşluğuna doğru uzanım gösterir ve sıklıkla bu bölgelerde mukoza ülserasyonu vardır. Barsak duvarının seroza yüzeyine doğru derin tabakaları da tutabilir ve şiddetli hastalıkta transmural infarkt oluşumu vardır. Bu süreç primer olarak mikrovasküler bir hastalıktır ve ana mezenterik damarlar genellikle açıktır.

İnterstisyel dokuda ve barsak duvarının lenfatiklerinde gaz görülebilir[65]. Bu gazın infarktla bağlantılı olması gerekmez. Pnömatozis mezentere uzanabilir ve NEK de patognomonik olan röntgen bulgusu oluşturur.

Nekroz nedeniyle belirgin doku kaybı olduğunda tamir olayı çoğunlukla fibrozisle sonuçlanır ve kas tabakasının tutulduğu ciddi olgularda lümenin darlığıyla sonuçlanır.

2.2. NEK VE NO

NO yüksek derecede aktif bir moleküldür. İntraselüler ve extra selüler bir çok regülatuar fonksiyonu vardır. NOS tarafından arjinin ve sitrüllinden sentezlenir PAF'ın vazokonstriktör ve trombojenik etkisine karşı koyar. NO iki izoform enzim tarafından kontrol edilir[66].

1- cNOS(Constitutive):Kalsiyuma bağlıdır ve NO'i pikomolar seviyesinde yükseltir.

cNOS'un pozitif etkisi 3 mekanizma ile açıklanabilir:

a. NO endotel relaksasyonu ile mikrosirkülasyonun düzenlenmesi, bu şekilde iskeminin düzeltilmesini sağlar[67]. Böylece dokuda hipoksik değişiklikler önlenir.
b. NOS inhibitörleri verilerek NO'nun ortamda azaltılması P-selectin, CD11-CD18 gibi adezyon moleküllerini artırır. Bu göstermektedir ki, NO serbest kalırsa lökositlerin endotele adezyonu engellenir[68,69].
c. NO nonadrenerjik nonkolinerjik transmitterdir[70,71] ve VIP ile beraber barsak hareketlerini regüle eder.

2-iNOS(İnducibl):Normal dolaşımda oldukça az miktarda bulunur fakat immun reaksiyonla ortamda hızlı şekilde artar. Dolaşımdaki NO miktarını hızlı ve güçlü şekilde artırır. NO biyolojik olaylarda görev aldıktan sonra hızla metabolize olur. Dokularada toksik etkili olan serbest oksijen radikallerinden olan Peroxynitrit iyonları

oluşur. Bu iyon demirin subhydril grubuna bağlanır Elektron transport zincirinin bozulmasına neden olur. Hücre ölümü olur[72].

Her iki enzim GİS boyunca bulunur[73,74]. GİS de barsak yaralanması ve bariyer bozulmasına bağlı sitokin artışı iNOS'u artırır ve NO yapımı artar[47,75].

NO GİS'de mukozal bütünlük, permeabilitenin düzenlenmesi, motilite ve defans mekanizmalarının düzenlenmesi gibi bir çok fonksiyona sahiptir[76,77,78,79]. Bu olaylarda asıl etki cNOS tarafından gerçekleştirilmektedir[80].

İNOS barsakta apikal vililerde bulunmaktadır, NO'nun antimikrobiyal özelliği (mukoza bariyerine mikroorganizma invazyonunu engellemektedir) burdan gelmektedir. İNOS yapımı intestinal hasarda artmaktadır, NO'nun aşırı yüksekliği barsak fizyolojisi ile paradoksal rol oynamaktadır. NO barsak motilitesi ve permeabilitesini düzenlemektedir[81,77]. NO yapımı inhibisyonu barsak permeabilitesini artırmaktadır[81,82]. Yine endotoksin(LPS) verilmesi ile GİS te iNOS gen expresyonunda artma gözlenmiştir[83]. NO'in aşırı yapımı bakteriyell invazyonu kolaylaştırmaktadır, barsak bariyer yetmezliğini artırmaktadır[84].

NO makrofajlarda[85], dalak hücrelerinde[86], timositlerde[87] apoptozise neden olmaktadır, apikal vililerde İNOS gen ekspresyonunun artması ile apoptozisin arttığı tespit edilmiştir[84]. İNOS gen ekspresyonunun artması ile aynı zamanda lamina propriada NO metaboliti olan nitrotirosin de artmıştır[84]. NO'nun NEK de mukozal hasara sebep olması $ONOO^-$ ile olmaktadır. Bu bilgiler çalışmalarla desteklenmiştir[88]. İNOS immunoreaktivasyonu ve nitrotirozin birikimi ile $ONOO^-$ formasyonu oluşması ve mukozal hasar gösterilmiştir[85]. $ONOO^-$ hemolitik ve reaktif nitrojen deriveleri tarafından oluşturulan nitrojen dioksit (ve hidroksil radikal) iyonu ve nitrasyon ile tirosin proteinleri indirgemektedir. NO veya $ONOO^-$ metalloproteinlerle reaksiyona girerek nitrosonium oluşur oksidize olarak S-nitrosotiol gibi reaktif nitrojenler oluşur[88]. Bu olayda NO (veya $ONOO^-$) barsak bariyerini zayıflatarak etkili olmaktadır. NEK'li hastalarda iNOS gen expresyonu apikal enterositlerde oluşmaktadır. Sonrasında NO yapımı artarak güçlü oksidan olan $ONOO^-$ formasyonu ile enterosit apoptozisi, barsak bariyer bozukluğu, bakterial invazyon ve intestinal duvar hasarı oluşmaktadır. Bu kaskad tam kat nekroz ve intestinal perforasyon ile sonuçlanmaktadır[84].

Sitokin profiline göre NEK'li %50 hastada oluşan septik şokta, TNF alfa sorumludur. Proinflamatuar sitokinlerin pik yapmasında İNOS gen ekspesyonunun sorumlu olduğu hepatosit çalışmasında gösterilmiştir[89]. Buna ilaveten İFN gama

NEK'de genellikle yüksektir; intra epitelyal veya lamina propriadaki lenfositler tarafından sentezlenmektedir, barsak permeabilitesini doğrudan etkilemektedir[90,91]. Dolaylı olarak NOS stimülasyonu yapmaktadır[92]. LPS ve İNF gama İNOS'ın promoter bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu artırır[93].

NEK ile NO arasındaki yakın ilişkiyi destekleyen diğer mekanizma şu şekildedir: İNOS tarafından sentezlenen bol miktarda NO asıl patolojik role sahiptir. İNOS NO yapımını aşırı artırarak düz kas kontraktilitesini bozar intrakolonik basıncın artmasına sebep olur. Bu şekilde toksik dilatasyondanda sorumlu olabilir. iNOS'ın feçes ve serum konsantrasyonları aktif kolitte artmaktadır. Başarılı tedavi edildiği zaman normale dönmektedir[94].

2.3. LNAME VE AMİNOGUANİDİNE

LNAME, l-arjinin amino asidinin metil esteridir. NOS enziminin tüm izoformlarının nonspesifik inhibitörüdür. L-arjinin ile yarışmaya girerek NOS enzimini inhibe eder. NOS inhibitörü olarak kullanılan başka metilenmiş l-arjininler de bulunmaktadır. Bunlar: N-nitro-L-Arjinin(LNMA) ve N-Monometil-L-Arjinin(LNMMA)'dir. Metilenmiş arjininler doğal maddelerdir ve normalde organizmada bulunmaktadır[95]. LNAME uygulamalarında özellikle uzun süreli uygulamalarda kardiovasküler yan etkileri olduğu bilinmektedir. Bunlar: Hipertansiyon, serebral[96] ve mezenterik[97] arteriollerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklerdir.

AG, 100 yıldır bilinen bir moleküldür. Nitroguanidinin redüksiyonu ile oluşturulmuştur[98]. Son 10 yılda ilgi çekici etkileri bulunarak kullanım alanı ve üzerinde yapılan deneyler artmıştır. Bu etkiler glikolizasyonu engellemesi ve diabet'in kardiovasküler komplikasyonlarını önlemesi[99,100], bizim kullandığımız selektif iNOS inhibisyonu yapması[101] ve Diamin Oksidaz enzimini inhine etmesidir[102]. Bu enzim Histamin ve Putrescin'in azaltılmasını katalize etmektedir. AG'nin LNAME kadar kardiyak ve vasküler yan etkileri bulunmamaktadır. AG, iNOS için LNAME'ye göre 10-100 kat daha fazla selektiftir[103,104].

3. MATERYAL VE METOD:

3.1. Deneysel Çalışma:

Deneysel metod uygulaması Selçuk Üniversitesi Hayvan Araştırma Laboratuvarı'nın denetimi altında gerçekleştirilmiştir. Gebe Sprague-Dawley cinsi ratlara gebeliğin 20. gününde Pitocin (1 U sc.) enjeksiyonu yapılarak doğum sağlandı. Yenidoğan ratlar doğar doğmaz anne ratın yanından alınarak doğum ağırlığı tartıldı. Kontrol grubunu oluşturan yenidoğanlar anne ratın yanında bırakılırken, çalışma gruplarını oluşturacak olanlar anne rattan ayrı olarak 36 ^{0}C'de beslenme ve bakım sağlanmak üzere inkübatöre yerleştirildi.

3.2. NEK oluşturulması:

Nadler ve arkadaşlarının tarif ettiği deneysel NEK metodu model olarak alındı. NEK modeli çalışmaya uygun şartlar hazırlanarak, tarif edildiği üzere yenidoğan ratlara aynen uygulandı[48]. Hiç anne sütü almamış yenidoğan ratlar formüle mama ile beslendi. Formüle mama 75 ml. Pupy-milk canine milk replacement (Beaphar-bogena, B.V. Sedel, Nederland) içinde 15 gr. Similac 60/40(Ross Pediatrics, Columbus, OH) içermektedir. Bu karışım protein ve kalori olarak rat anne sütüne benzemektedir[15].

3.3. Çalışma grupları:

Yenidoğan ratlar her grupta 10 adet olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

1. Grup (Kontrol Grubu-K) : Bu grupta yer alan yenidoğan ratlar tartıldıktan sonra annesinin yanında bırakıldı. Anne sütü ile beslenmeleri sağlandı.

2. Grup (NEK Grubu-N) : Bu gruptaki denekler doğar doğmaz, hiç anne sütü almadan annelerinin yanıdan ayrıldı ve daha önce belirtildiği gibi formul mama ile beslendi.

3. Grup (NEK Şem Grubu-NŞ) : Bu gruptaki denekler NEK grubunda olduğu gibi, annesinin yanından doğar doğmaz hiç beslenmeden alındı, formüle mama ile beslendi ve formüle mamaya ilaveten 0.1 ml/gün izotonik NaCl verildi.

4. Grup (Aminoguanidine Grubu-AG): Annesinin yanından doğar doğmaz hiç beslenmeden alındı, formüle mama ile beslendi. Ek olarak 0.1 ml. İzotonik içinde 10 mg/Kg/gün dozunda Aminoguanidine HCl verildi.

5. Grup (LNAME Grubu-L) : Annesinin yanından doğar doğmaz hiç beslenmeden alındı, formüle mama ile beslendi. Ek olarak 0.1 ml izotonik NaCl içinde 10 mg/Kg/gün LNAME verildi.

Tüm gruplardaki ratlar 4. gün tartılarak, öldürüldü. Barsaklar inceleme için ileoçekal valvin 1 cm proksimalinden 2 cm. lik kısım mikroskopik inceleme için geri

kalan yaklaşık 10 cm. kısım biyokimyasal inceleme için ayrıldı. Mikroskopik inceleme için ayrılan barsak dokusu %4'lük formol içeren cam tüp içinde saklandı. Biyokimyasal incelemede kullanılacak doku taze olarak inceleme maksadı ile cam tüplere alındı. Tüpler kodlanarak etiketlendi.

3.4. Değerlendirme:

Çalışmada sağ kalım oranları, ağırlık değişimi, barsakta makroskopik olarak kolit görünümü, mikroskopik inceleme sonrası elde edilen morfolojik skorlama, doku iNOS aktivitesi (Nitrit+Nitrat)[76] değerlendirme kriteri olarak belirlendi.

3.4.1. Morfolojik çalışma: İntestinal parçalar formolde iki gün bekletildikten sonra, ototeknikonda takibe alınarak parafine gömüldü ve bloklar hazırlandı. 5 mikron kalınlığında kesitler yapıldı. Yapılan kesitler hemotoksilen ve eozin ile boyandı[16], ışık mikroskopide değerlendirildi. Morfolojik değişiklikler barsak duvarındaki hasara göre 0-3 arasında skorlama yapıldı[48].

0-Normal (Resim 1-a).

1-Hafif: Villus tepelerinde parçalanma(Resim 1-b).

2-Orta: Villuslarda parçalanma, submukozada ödem, epitelde dökülme(Resim 1-c).

3-Şiddetli: Epitelde soyulma, villuslarda kayıp, tam kat nekroz veya perforasyon(Resim 1-d).

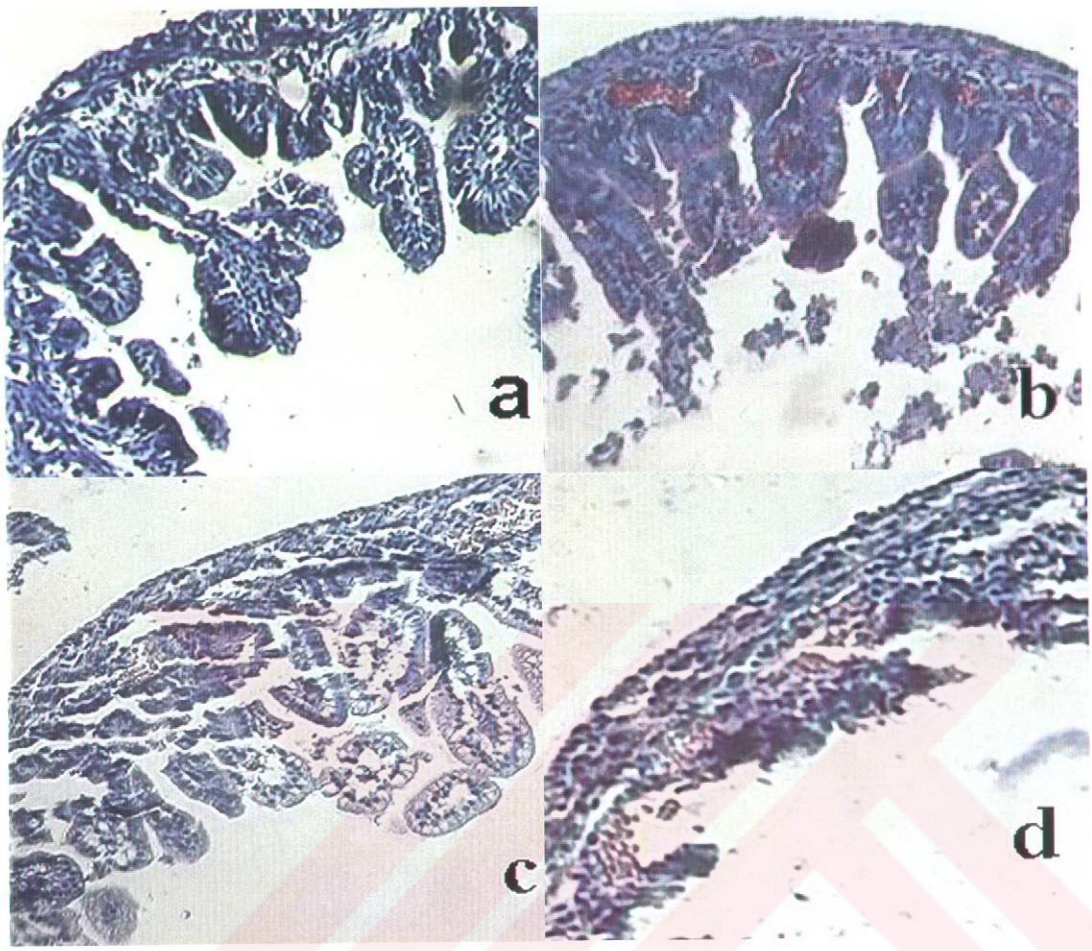
3.4.2. Nitrit ve nitrat ölçümü[105]:

Nitrit ölçümü: Dokular tartıldıktan sonra pH:7,4 10 mM Hepes tamponu ile (150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl2, 1 mmol/L MgCl2, 5 mmol/L glukoz) homojenize edildi[106]. Ölçüm için Griess Reaksiyonu kullanıldı. Bu ölçümü yapmak için doku örneği 4 kez distile su ile dilüe edildi, çinko sülfat 300 g/dl 1/20 ilave edilerek deproteinize edildi, 15 gr/dl olarak son konsantrasyon hazırlandı. 10000 devirde 5 dk (veya 1000 devirde 15 dk.) santrfüje edildikten sonra süpernatandan mikropipetle 100 mikrolitre alındı. Alınan süpernatana 100 mikrolitre Griess Reaktanı eklendi (1 gr/L Sülfanilamid, 25 gr/L Fosforik asit, 0,1g/L N-1-naftiletilenediamin). 10dk oda sıcaklığında renk değişimi gözlendi. Absorbanstan mikroplate ile 540 nm dalgaboyunda ölçüm yapıldı (Titartek Multiscan MCC/340;Flowlab, McLean, VA). Her bir örnek iki kez ölçüldü. Kalibrasyon materyali olarak distile su içinde Sodyum nitrit ve potasyum nitrat kullanıldı (Aralık 0-100 mikromol/L olmalıdır). Bütün bu spesmenler 540 nm de gözlendi. Renk değişimi olan ürünün molar absorbtivitesi 39500 $Lmol^{-1}cm^{-1}$ dir.

Nitrat ölçümü: Bu ölçüm Nitrat Redüktaz ile enzimatik dönüşüm sağlanarak yapıldı[105]. Kısaca anlatacak olursak: Örnekten 100 mikroL 4 kez distile su ile dilüe edildi. NADPH 50 mikromol/l, FAD 5 mikromol/l, Aspergillus spp. den Nitrat Redüktaz 200 U/L sırasıyla ilave edildi (Boehringer Manheim,Almanya). Ürün 37 derecede 20 dk bekletildi. Tavşan kasından elde edilen 10 mg/L Laktat Dehidrogenaz (Boehringer Manheim) ve sodyum pirüvat 10 mmol/L eklendi. 37^0C de 5 dk beklenerek deproteinize ve NADPH oxidasyonu sağlanarak Griess Reaktanı ilave edildi. Bu son ürün Nitrit ve Nitratı ihtiva eder. Bütün bu spesmenler 540 nm de gözlendi. Sonuçlar nmol.mg.protein^{-1} olarak ölçüldü.

3.5. İstatistik analizi:

Veriler kodlanarak bilgisayar ortamına aktarıldı. İstatistik analizi SPSS for Windows 10.0 paket programı yardımı ile yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ve % olarak özetlendi. Gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arası fark tespit edilen değişkenler Post Hoc Tukey HSD testi ile değerlendirildi. Kategorik veriler Ki-kare testi ile değerlendirildi. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alındı.



Resim-1. Barsak hasarının mikroskopik olarak gösterilmesi ve skor tablosu. 1-a: Normal barsak görünümü, 1-b. Hafif hasar: Villus tepelerinde parçalanma, 1-c. Orta derecede hasar: Villuslarda parçalanma, submukozada ödem, epitelde dökülme, 1-d. Şiddetli hasar: Epitelde soyulma, villuslarda kayıp, tam kat nekroz veya perforasyon (H&E, x40)

4. BULGULAR:

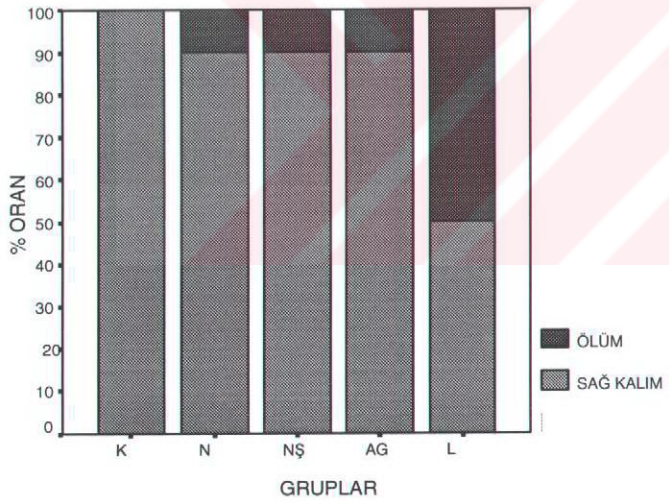
4.1. Sağ kalım oranları:

Kontrol grubundaki tüm ratlar yaşarken, N, NŞ, AG gruplarında 1'er rat öldü. L grubunda ise 2. Günde 3 rat ve 3. Günde 2 rat olmak üzere toplam 5 rat öldü. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında L grubunda mortalite oranı kontrol grubu ve diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0,05$). K, N, NŞ, ve AG grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Bütün gruplardaki sağkalım oranları ve anlamlılık derecesi Tablo-1 de gösterilmiştir. Sağkalım oranları grafik olarak Grafik-1'de gösterilmştir.

Tablo-1: Tüm grupların sağ kalım oranları

GRUPLAR	K	N	NŞ	AG	L
SAĞKALIM ORANLARI	10/10	10/9	10/9	10/9	10/5
%	100	90	90	90	50 *

*P<0,05: K, N, NŞ, AG Grupları ile karşılaştırıldığında



Grafik-1: Tüm grupların sağ kalım oranları

4.2. Ağırlık değişimi:

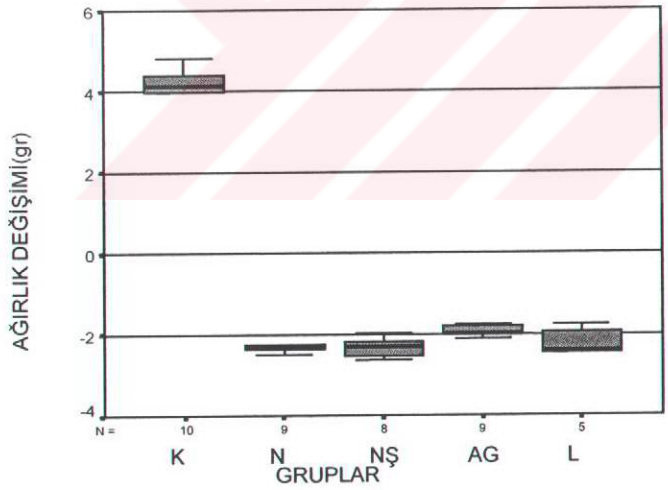
Anne sütü ile beslenen kontrol grubundaki ratlarda ortalama 4,02+- gram ağırlık artışı olurken, N grubunda ortalama 2,34gr, NŞ grubunda ortalama 2,3 gr, AG grubunda ortalama 1,89 gr, L grubunda ortalama 2,21 gr ağırlık azalması gözlendi. K, N, NŞ, AG, L grupları karşılaştırıldığında ilk ağırlık arasında fark bulunmadı. Son ağırlıklar karşılaştırıldı, kontrol grubu diğerlerinden anlamlı derecede farklı idi

(P<0,05). N, NŞ, AG, L grupları kendi aralarında anlamlı farka sahip bulunmadılar. Bütün gruplara ait ağırlık ortalamaları ve anlamlılık derecesi Tablo-2'de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Grafik-2'de gösterilmiştir .

Tablo-2:Tüm grupların ağırlık ortalamaları, ağırlık değişimi ve standart sapmaları.

GRUPLAR	İLK AĞIRLIK (gr.)	SON AĞIRLIK (gr.)	AĞIRLIK DEĞİŞİMİ
K	5,70±0,19	9,72±0,51*	4,02±0,6*
N	5,84±0,25	3,53±0,57	-2,34±0,2
NŞ	5,86±0,18	3,54±0,76	-2,33±0,22
AG	5,60±0,31	3,68±0,25	-1,89±0,22
L	5,70±0,25	3,55±0,83	-2,21±0,32

*P<0,05 K, N, NŞ, AG Grupları ile karşılaştırıldığında (Not: değerler ortalama± standart sapma olarak verildi).



Grafik 2: Deneklerdeki ağırlık degişimi

4.3. Makroskopik bulgular:

Çalışma sonrası alınan barsakların makroskopik incelemesinde, kontrol grubunda bütün ratların barsakları normaldi. N grubunda 4, NŞ grubunda 4, AG grubunda 2, L grubunda 5 ratta barsaklarda mavi-siyah renk değişikliği ve nekroz gözlendi. Nekrotik ve normal barsak Resim-3 ve Resim-4 de görülmektedir.

4.4. Mikroskopik bulgular:

Standart H&E boyama ile incelenen preparatlarda kontrol grubundan alınan örneklerden 8'i normal morfolojiye sahip olduğu, 2'sinde hafif hasar olduğu gözlendi. N grubunda alınan örneklerde 2 preparatta orta derecede, 7 preparatta şiddetli hasar tespit edildi. NŞ grubunda alınan örneklerde 3 preparatta orta derecede, 6 preparatta şiddetli hasar tespit edildi. AG grubunda alınan örneklerde 1 preparatta normal morfoloji, 2 preparatta hafif hasar, 5 preparatta orta derecede, 1 preparatta şiddetli hasar tespit edildi. L grubunda alınan örneklerde 1 preparatta orta derecede, 4 preparatta şiddetli hasar tespit edildi. N, NŞ, L gruplarında şiddetli hasara daha fazla rastlanırken AG grubunda hafif ve orta derecede hasar daha fazla gözlenmiştir. Normal histopatolojik görünüm gözönüne alındığında, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark mevcuttu ($P<0,05$). Hafif ve orta derecede hasar gözönüne alındığında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. AG grubunda şiddetli hasara daha az rastlandı ve istatistisel olarak N, NŞ, L grupları ile AG grubu arasında anlamlı farklılık gözlendi. Yine şiddetle hasar gözönüne alındığında L, N, NŞ grubları ile K grubu arasında anlamlı fark gözlendi. Gruplar arasındaki skorlamalar aşağıdaki Tablo-3'de gösterilmiştir.

Tablo-3: Tüm grupların mikroskopik inceleme skorlaması.

GRUPLAR	**K(n=10)**	**N(n=9)**	**NŞ(n=9)**	**AG(n=9)**	**L(n=5)**
NORMAL(0)	8 %80	0!	0!	1! %11,11	0!
HAFİF(1)	2 %20	0	0	2 %22,22	0
ORTA(2)	0	2 %22,22	3 %33,33	5 %55,55	1 %20
ŞİDDETLİ(3)	0	7 %77,77	6 %66,66	1* %11,11	4# %80

!: $P<0,05$ K grubu ile karşılaştırıldığında

*:$P<0.05$ N, NŞ ve L grupları ile karşılaştırıldığında

#:$P<0.05$ K grubu ile kaşılaştırıldığında (Post Hoc Tukey HSD testi)

4.5. Nitrit +Nitrat seviyeleri:

Doku iNOS aktivitesinin ve NO üretiminin değerlendirilmesi doku örneklerinde ölçülen Nitrit+Nitrat seviyeleri ile yapılmıştır. Çalışmada kontrol grubunda Nitrit+Nitrat seviyesi ortalama 24,28±2,9 bulundu. N grubunda bu ortalama 33,63±3,47, NŞ grubunda ortalama 33,82±2,91, AG grubunda ortalama 27,57±1,88, L grubunda ortalama ise 18,82±1,99 bulundu. Nitrit+Nitrat seviyeleri karşılaştırıldığında N ve NŞ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu, L grubunda ise anlamlı azalma olduğu tespit edildi($P<0,05$). AG grubunda Nitrit+Nitrat seviyesi kontrol grubuna göre bir miktar artmış olmasına rağmen istatiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. AG grubunda Nitrit+Nitrat toplamı L grubuna göre artmış, N, NŞ gruplarına göre azalmış olarak bulundu($P<0,05$). Ortalamalar ve standart sapmalar Tablo-4'de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki Nitrit+Nitrat seviyeleri farklılığı Grafik-3'te gösterilmiştir.

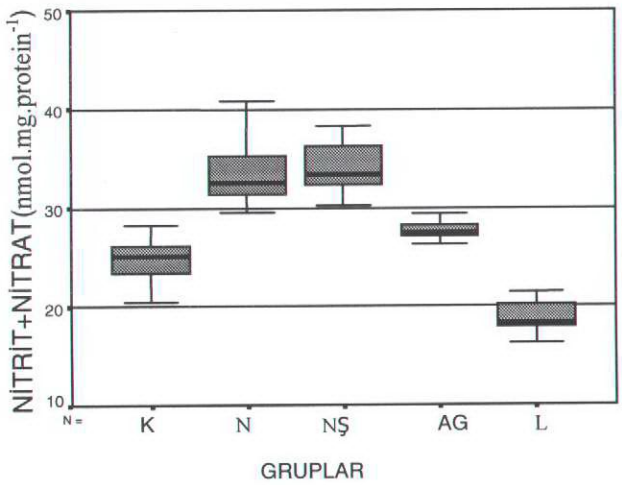
Tablo-4: Tüm gruplardaki Nitrit+Nitrat seviyelerinin ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	K	N	NŞ	AG	L
NİTRİT+NİTRAT ($nmol.mg.protein^{-1}$)	24,28±2,9#	33,63±3,47	33,82±2,91	27,57±1,88#	18,82±1,99*

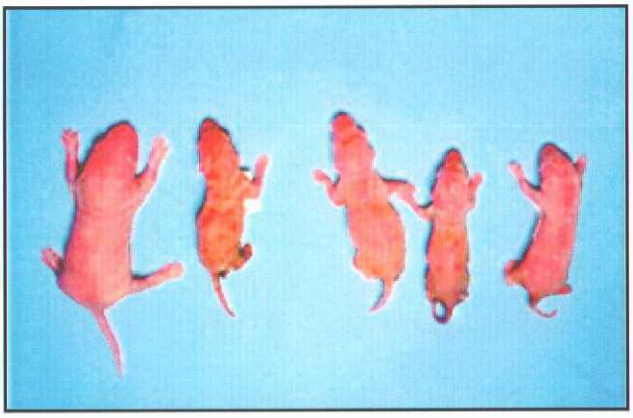
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmştir.

*:$P<0,05$: L grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında

#:$P<0$, #:$P<0,05$:AG ve K diğerleri ile karşılaştırıldığında

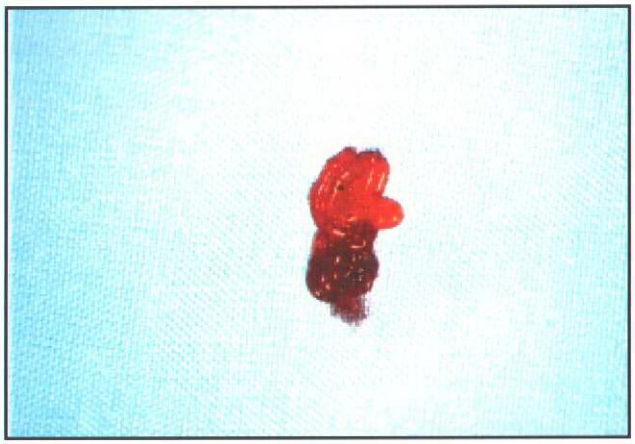


Grafik-3: Tüm gruplardaki Nitrit+Nitrat seviyelerinin farklılık tablosu.



Resim-2: K grubu ile N, NŞ, AG, L grupları arasındaki gelişme geriliği görülmekterdir.

Resim-3- Makroskopik olarak normal görünümdeki barsak.



Resim-4- Makroskopik olarak nekroze görünümdeki barsak.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ:

Çalışmamızda ticari mama ile beslenen yenidoğan ratlarda NEK'in klinik tablosuna benzer intestinal hasarla beraber NO üretiminin de arttığı gözlenmektedir. NO yapımı hem AG, hem de LNAME uygulaması ile azalmıştır. NO yapımı azaltılan iki grupta AG verilen ratlarda intestinal hasarda azalma tespit edilirken, LNAME verilenlerde değişiklik gözlenmemiştir.

NEK yenidoğanın gastrointestinal sistemini tutan oldukça letal seyreden bir hastalıktır. Son 30 yılda gittikçe artan sıklıkta görülmektedir. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde son dönemde tetkik ve tedavi metodlarının gelişmesi, prematüre bebek bakımındaki başarı ile NEK teşhis ve tedavisi büyük aşamalar kaydedilmiştir. Etyopatogenezden sorumlu olabilecek birçok risk faktörü bulunmasına rağmen halen etyopatogenezi kesin tespit edilememiştir.

Etyolojide oral beslenme, perinatal asfiksi ve enfeksiyöz ajanlar suçlandığından, son dönemde deneysel çalışmalarda özellikle hipoksi ve oral beslenme ile ilgili hayvan modelleri oluşturulmuş. Bu modellerde histopatolojik ve biyokimyasal olarak NEK benzeri değişiklikler gözlenmiştir. Barlow ve ark. yenidoğan ratları 7 gün hipokside bırakarak histopatolojik olarak NEK benzeri intestinal hasar oluşturmuşlar[15]. Bu modelde araştırmacılar hipoksi ile beraber oral formüle mama ile beslenmenin daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Yine diğer çalışmalarında hipoksi ile beraber soğuk travmanın hasarı artırdığını kanıtlamışlar[96]. Çalışmamızda model olarak kullandığımız formül mama ile beslemeye bağlı gelişen NEK Nadler ve ark.[48] tarafından tanımlanmıştır. Yapılan bu çalışmada, iNOS aktivitesi, histopatoloji, enterosit apoptozisi, İL-12 kriterlerine göre hipoksi eşlik etsin yada etmesin formül mama ile beslenen yenidoğan ratlarda NEK benzeri hasar oluştuğu ortaya konmuştur.

NEK'e benzer intestinal hasar başka deneysel çalışmalarda da gösterilmiştir. Kazein verilerek oluşturulan modelde: laparatomi yapılarak yenidoğan domuzların barsak lümenine kazein verilmektedir[21]. Kazein lüminal asiditeyi artırmakta ve NEK benzeri hasar oluşturmaktadır. NEK'de lüminal asiditenin değişimine dair bilgi mevcut değildir, üstelik yalnızca asiditenin artması başlı başına hasara sebep olabilmektedir. Ayrıca yapılan laparatomi denek üzerinde travma oluşturmaktadır. Bu nedenle model NEK'in kliniği ile tam olarak bağdaşmamaktadır.

LPS ve PAF verilerek oluşturulan NEK modellerinde primer inflamasyon sistemik olarak başlamaktadır, barsak daha sonra etkilenmektedir. Barsak hasarının sepsise sekondermi yoksa NEK'e bağlı mı geliştiğini ayırmak güçtür. Hipoksi

modelinde ise oluşan hasar iskemiye bağlıdır, histololojik olarak da hasar iskemik barsak hasarı oluşmaktadır. NEK etyopatogenezine bakacak olursak mekanizmayı sadece hipoksiye veya iskemiye bağlamak uygun olmaz. Çalışmamızda model tespiti yaparken bu metodlar gözden geçirilerek klinik açıdan en uygun model seçilmiştir. Bizim kullandığımız formüle mama ile beslenmeye bağlı gelişen NEK modeli klinik açıdan ve hasarın histopatolojisi açısından NEK'e daha fazla uymaktadır.

İntestinal hasar üzerine etkisini ortaya koymaya çalıştığımız NO, yarı ömrü oldukça kısa olan(saniyelerle sınırlı) bir moleküldür. Bu sebeple teknik olarak ölçümü mümkün değildir[107]. NO üretiminin tespiti için ya dokuda iNOS aktivitesinin saptanması veya indirekt metodlara başvurmak gerekmektedir. iNOS enzimi aktivitesinin tesbiti mRNA gen expresyonu ile yapılmaktadır ve oldukça güvenilir sonuç vermektedir[84]. İndirekt metodlar ise iNOS enzimi prekürsörünün ve aktivite sonucu oluşan metabolitlerin ölçümü ile yapılmaktadır. Bu işlemler aminoasit kromotografi yöntemi ile NO yapımında kullanılan Arjinin ve son ürün olan sitrüllin oranları ölçümüdür. NO seviyesinin indirekt tesbiti için NO metabolizmasının son ürünleri olan Nitrit ve Nitrat seviyelerinin tespiti gereklidir. Bizim elimizdeki teknik şartlar iNOS mRNA ekspresyonun ölçmeye değil, sadece Nitrit ve Nitrat seviyelerinin tespitine olanak vermektedir. Bu sebeple doku düzeyinde Nitrit+Nitrat oranını tespit ettik.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; NO yapımının enzimatik olarak kontrolü GIS sağlığı açısından önem arz etmektedir. NO nun bazal seviyesi cNOS izoformu tarafından kontrol edilmektedir ve bu enzim nöronal elementlerde; vasküler endotel duvarında bulunmaktadır[108]. Bu enzim NO'nun kısa sürede az miktarda yapımından sorumludur, hücre içi kalsiyum artması ile fonksiyon görür. GIS' ın asıl fizfolojik görevlerinden sorumlu olan NO kontrol sistemi bu enzim tarafından regüle edilir. Bu fizyolojik olaylar; akut inflamatuar reaksiyonda sitoproteksiyon[109], intestinal motilite düzenlenmesi[76], sekresyon[110], splanknik kan akımı[111,112], vasküler endotelde trombosit[113] ve lökosit adezyonunun inhibisyonudur[114]. İskemi, kimyasal ajanlar, hipoksi, platelet aktive edici faktöre bağlı intestinal hasarda cNOS'un inhibe edilmesi yoluyla NO yapımının azaltılması zararlı bulunmuştur. Exojen olarak NO prekürsörlerinin verilmesi bu hasarı azaltmaktadır[115]. Klinik çalışmada NEK'e aday olan prematüre infantlarda plasma l-arjinin düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir[116]. Yenidoğan domuzlarda bir çalışmada l-arjinin verilmesi ile NEK' in azaldığı gözlenmiştir[117]. l-arjinin NO için prekürsör olarak bilinmektedir. Yukarda bahsedilen

olaylarda cNOS l-arjinini kullanarak NO yapımını normal düzeylerde tutarak intestinal hasara karşı koruma mekanizmasını düzenlemektedir. Prematüre infantlarda hem enzim aktivitesi hem de plasma l-arjinin seviyesi normal infantlara göre düşüktür[116]. Bu sebeple oral beslenmeye toleransları azdır ve NEK' e adaydırlar.

Buna karşılık intestinal inflamasyonda iNOS expresyonu ile, NO bazal seviyeden çok daha fazla yükselmektedir. Bu izoform, NO yapımını cNOS' a göre çok daha fazla ve uzun süreli olarak yükseltmektedir. Ayrıca hücre içi kalsiyuma bağımlı değildir. iNOS barsakta immunohistokimyasal olarak birçok hücrede gösterilmiştir. Bunlar; makrofaj, nötrofil, epitel, nöronal hücrelerdir[118,119]. NO'nun iNOS tarafından salınımı serbest radikal mekanizmasının sitotoksik veya sitostatik rolü ile sağlanmaktadır[120]. Bununla birlikte NO' nun bu toksik özelliği inflamatuar hadisede ayrım yapmaksızın intestinal hasara katkıda bulunmaktadır. Gerçekten iNOS etkisi ile NO' nun intestinal inflamasyonda aşırı yapımı birçok hayvan çalışmasında gösterilmiştir[48,72,84,121,122,123,124].

Kemirgenlerde yapılan bir çalışmada bizim bulgularımızı destekleyecek şekilde barsak inflamasyonunda NO salınımı artmasına karşılık LNAME ve AG gibi NOS inhibitörleri verilerek intestinal hasarda azalma olduğu rapor edilmiştir. Patolojik gösterge olarak intestinal duvarda incelme, hücre infiltrasyonunun, submukozal fibrozisin engellenmesi görülmüştür[125,119,126].

Bunlara ilaveten, inflamatuar barsak hastalıklarında da NO seviyesi belirgin olarak artmaktadır, bununla beraber NO'in patogenezdeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Ülseratif kolitte aktif hastalıkta lüminal NO seviyeleri[127] ve enzim aktivitesi artmaktadır[126,128,129,130]. Buna karşılık Crohn hastalığında NO ile ilgili değişiklik tespit edilememiştir[126,130].

NO kendisi oldukça zayıf sitotoksik özelliğe sahiptir. Sitotoksisiteden demir-nitrojen bileşikleri gibi toksik nitrojen aramaddeleri sorumludur[131]. Bununla beraber superoksit ile etkileşime girerek oldukça reaktif iyon olan peroksinitrite[132] dönüşür, lipit peroksidasyonunu başlar ve hızlı oksidize sülfidril[133] grubları oluşur. Peroksinitritin intestinal inflamasyonda arttığı; immunohistokimyasal tetkiklerle TNB ve buna benzer maddelerle oluşturulan ileitlerde iNOS ve nitrotirosin metabolitlerinin (peroksinitritin göstergesi) artması ile desteklenmiştir[88,124]. Bununla beraber toksik olarak bilinen diğer nitrojen reaktif metaboliti nitrat tirosin artıklarıdır. Peroksinitritin toksik özelliği bir deneysel çalışmada intra lüminal verilmesi ile gösterilmiştir[134]. Peroksinitrit asıl olarak

intestinal hücrelerde apoptozise neden olarak apikal viluslarda soyulma ile birlikte bakteriyel penetrasyon ve adherensini kolaylaştırmaktadır. NO'in İL-12 expresyonunun azaltarak T hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir, bunun sonucu olarak intestinal epitel ve lamina propriada T hücre azalır. Bu azalma intestinal immun fonksiyonu bozarak bakterilerin koruyucu defans mekanizmalardan kurtulup NEK'deki gibi epitelyal hasara neden olmalarına zemin hazırlamaktadır.

İNOS tarafından sentez edilen NO kolonda düz kas kontraktilitesini bozarak motiliteyi azaltmakta ve intrakolonik basıncı artırarak kolonun toksik dilatasyonunada zemin hazırlamaktadır.

Bu olay bizi şu sonuca götürür; ortamdaki NO'i azaltan özelliklede iNOS'u çok spesifik olarak inhibe eden AG gibi ajanlar kullanılırsa, nitrosatif etkiler ve enterosit apoptozisi azaltılır bu şekilde intestinal hiperpermeabilite bakteriyel translokasyon engellenir.

Yapılan çalışmalarda AG selektif iNOS inhibitörü olarak experimental kolit modelinde mukozal hasarı LNAME'ye oranla daha iyi düzeltmiştir[135]. Çalışmamızda AG uygulaması NO yapımını orta derecede azaltırken, intestinal hasarı belirgin azaltmıştır.

Çalışmamızda LNAME uygulaması etkili şekilde NO yapımını inhibe etmiş olmasına rağmen intestinal hasarda azalma sağlayamamıştır. LNAME damar duvarındaki NO'yu da azaltarak vazokonstriksiyon sonucu intestinal mukoza beslenmesini de bozmuş olabilir. Yani intestinal mukozadaki lezyonlar, cNOS'un inhibisyonu ile mukozal kan akımı bozulması sonucu oluşan hasardır.

NO dokuda süperoksitlerle reaksiyona girerek onları inhibe eder, reaksiyon sonucunda daha az toksik olan aktif metabolitlere (Nitrit ve Nitrata) dönüşmektedir. AG, NO yapımını zayıf inhibe ederek, süperoksitleri temizleyecek kadar NO'yu ortamda bulundururken, LNAME kuvvetli inhibe ederek ortamda yeterli miktarda NO bırakmamaktadır[76]. Böylelikle süperoksitlerin sitotoksik etkisi devam etmektedir.

Buna ek olarak LNAME, NEK'de mortaliteyi artırmaktadır. Çalışmamızda kardiyopulmoner etkiler öncelikli olarak ele alınmamıştır. İL-6, TNF, PAF gibi proinflamatuar sitokinlerin prematüre bebeklerde full termdeki bebeklere oranla artması daha önce yapılmış olan NEK çalışmalarında rapor edilmiştir[29,47,43,49,136]. PAF'ın negatif inotropik etkili olduğu bilinmektedir. Basal NO yapımı vazodilatör etkilidir ve endojen NO yapımının inhibisyonu ratlarda kardiak outputda azalmaya neden olmaktadır[76]. LNAME ve PAF kardiak etki açısından birçok hayvanda sinerjistik etki göstermektedir.

Ölümlerdende bu etki sorumludur. Yapılan bir çalışmada LPS verilerek oluşturulan sepsis modelinde LNAME uygulaması ölüm oranlarını artırmıştır[137]. Ölümlerin LNAME de fazla olması bu yan etkilerle açıklanabilir.

Sonuç olarak, AG selektif iNOS inhibitörü olarak, formüle mama verilerek oluşturulan NEK modelinde iNOS indüksiyonunu ve intestinal hasarı azaltmaktadır. LNAME nonselektif NOS inhibitörü olarak, cNOS ve iNOS'u kuvvetli inhibe etmiş, ancak intestinal hasarı değiştirmemiş, üstelik mortaliteyi artırmıştır. AG'nin olumlu etkileri de göz önüne alınacak olursa, NEK'de iNOS aktivitesinin artışı barsak hasarını artırırken, cNOS tarafından sentezlenen NO barsak fizyolojisini koruyucu etkilere sahip görünmektedir.

6. SONUÇLAR

- Yenidoğan ratlarda formüle mama ile oral beslenme, deneysel NEK oluşturmak için uygun bir metoddur.
- Doku iNOS aktivitesindeki artış barsak duvarında NEK benzeri hasar oluşumu ile beraber seyretmektedir.
- Oral AG ve LNAME verilmesi NOS'u inhibe etmektedir.
- AG, iNOS'un selektif inhibitörü olarak doku NO seviyesini normale yakın seviyeye getirmekte ve barsak hasarını azaltmakatdır.
- LNAME, NOS için nonselektif inhibitördür ve NOS'u güçlü şekilde inhibe etmektedir.
- LNAME barsak hasarını azaltmamakta ve mortaliteyi artırmaktadır.
- cNOS barsakta normal fizyolojide rolü olan koruyucu bir enzimdir.
- Anne sütü ile beslenme yenidoğan rat gelişimi ve barsak histolojisi için olumlu etkilere sahiptir.

7. ÖZET

NO'nun NEK etyopatogenezinden sorumlu olabileceği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada NEK modeli üzerinde selektif ve nonselektif iNOS inhibitörlerinin etkisi araştırılmıştır. AG selektif, LNAME ise nonselektif iNOS inhibitörü olarak kullanıldı. Deneysel NEK oluşturmak için yenidoğan ratlar formül mama karışımı ile beslendi. Termdeki ratlara 1 Ü. Pitocin infilrasyonu yapılarak doğum sağlandı. Doğan ratlar 5 gruba ayrıldı. 1. grup Kontrol, olarak belirlendi anne ratın yanında bırakılarak anne sütü ile beslenmeleri sağlandı. 2. grup (NEK grubu), hiç anne sütü almadan anne ratın yanından alınarak formül mama karışımı ile beslendi. 3. grup (NEK Şem grubu), yine anne ratın yanından alınarak formül mama karışımı ile beslendi ek olarak o.1 ml %0,9 NaCl verildi. 4. grup (Aminoguanidine grubu), yine formül mama karışımı ile beslendi ek olarak 0,1 ml %0,9 NaCl içinde 10 mg/kg/gün Aminoguanidine HCl verildi. 5. grup (LNAME grubu), anne ratı yanından alınan yenidoğan ratlara formül mamaya ek olarak 0,1 ml %0,9 NaCl içinde 10mg/kg/gün LNAME verildi. Denekler 4. gün öldürülerek ileoçekal valvin 1 cm proksimalinden 2 cm lik kısım morfolojik inceleme için, geri kalan yaklaşık 10 cm lik kısım Nitrit+Nitrat ölçümü için cam tüplere alındı. Değerlendirme kriterleri olarak ağırlık değişimi, sağ kalım oranları, makroskopi, morfolojik inceleme, Nitrit+Nitrat değerleri incelendi. Ağırlık değişimi açısından Kontrol grubu ile diğerleri arasında anlamlı fark mevcut iken NEK, NEK Şem, Aminoguanidine, LNAME grupları arasında fark yoktu. Sağ kalım oranları LNAME grubunda mortalite fazla, NEK, NEK Şem, Aminoguanidine, Kontrol grupları arasında fark bulunamadı. Makroskopik incelemede Kontrol grubunda tüm barsaklar normaldi, NEK, NEK Şem'de 4, Aminoguanidine grubunda 2, LNAME grubunda 5 ratın barsaklarında mavi-siyah renk değişimi ve nekroz görüldü. Mikroskopik incelemede NEK, NEK Şem ve LNAME grublarında Kontrol grubuna göre siddetli hasar fazla görülürken, Aminoguanidine tedavisi hasarı azaltmıştır. NO üretimi (Nitrit+Nitrat seviyesi) NEK ve NEK Şem gruplarında kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Aminoguanidine ve LNAME gruplarında ise NO üretiminin azaldığı saptandı. Sonuç olarak Aminoguanidine NEK modelinde iNOS indüksiyonunu azaltarak intestinal hasarı azaltmıştır. LNAME iNOS ve cNOS inhibisyonu ile NO üretimini azaltmış, ancak lokal intestinal hasarda bir değişiklik göstermemiş, mortaliteyi ise artırmıştır. Buna göre iNOS indüksiyonu NEK'li barsakta hasarı artırırken, cNOS barsaklar için koruyucu ve normal fizyolojiden sorumlu NO üretimini sağlamaktadır.

8. SUMMARY

EFFECTS OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITION ON INTESTINAL DAMAGE IN RATS WITH EXPERIMENTAL NECROTIZING ENTEROCOLITIS:

In the inflamed intestinal mucosa of necrotizing enterocolitis (NEC), inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity increases. Nitric oxide generated by iNOS may contribute to the pathogenesis of local intestinal damage. To study the importance of iNOS on the pathogenesis of NEC, the effects of selective (aminoguanidine, AG) and nonselective (l-nitroarginine methyl ester, l-NAME) iNOS inhibitors on intestinal morphologic changes were assessed in neonatal rats with experimental NEC.

Immediately after birth, the neonatal rats were randomized into one of five treatment groups. Group 1 (control group) consisted of rats that were breast-fed. Group 2 (NEC group) consisted of neonates separated from their mothers, were gavaged with a special rodent formula thrice daily. Rats in group 3 (sham), group 4 (AG), and group 5(l-NAME) were treated in a similar fashion to those in group 2, additionally they were gavaged with 0.1 ml/day 0.9% saline alone, 10mg/kg/day AG in 0.1 ml saline, and 10 mg/kg/day l-NAME in 0.1 ml saline, respectively. The rats were sacrificed on day 4, and the last 4-cm of terminal ileum was harvested for morphological studies and detection of nitrite and nitrate levels in tissue.

Breast fed rats in control group had normal intestinal histology. In contrast, the animals in NEC and sham groups showed various degrees of inflammatory changes ranging from epithelial sloughing to frank bowel necrosis. The inflammatory changes of the intestine appeared to be attenuated in the AG treated animals compared to those in the NEC and sham groups, whereas l-NAME treatment did not improve the intestinal damage. The tissue levels of nitrate and nitrite were significantly increased in the NEC and sham groups (33,63±3,47and 33,82±2,91 nM/g protein, respectively) compared to the animals in the control group (24,28±2,9 nM/g protein). Both AG and l-NAME treatment decreased the tissue levels of these nitrogen oxides (27,56±1,88 and 18,82±1.99 nM/g protein)

AG significantly reduced both induction of iNOS activity and intestinal damage, which suggests that NO synthesized by iNOS, plays an important pathogenic role in formula-fed induced NEC. L-NAME did not change the severity of damage and increased mortality,raising the possibility,considering with the effect of AG,that the NO synthesized by constitutive NOS acts to conserve the physiologic functions of intestine.

9. KAYNAKLAR:

1. Kliegman RM, Panaroff AA. Necrotizing enterocolitis. N Engl J Med 310:1093-1103, 1984.
2. Holman, RC, Stehr-Green, JK, Zelasky, MT. Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979-1985. Am J Public Health 79:987, 1989.
3. Rowe MI, Reblock, KK, Kurkchubasche AG, Healey PJ. Necrotizing enterocolitis in the extremely low birth weight infant. J pediatr Surg.29:987, 1994.
4. Goldman AS, Thrope LW, Goldblum RM et al. Antiinflamatory properties of human milk. Acta Pediatr Scand 75:689-695, 1986.
5. Sheard NF, Walker WA. The role of breast milk in the development of gastrointestinal tract. Nutr Rev 46:1-8, 1988.
6. Siebold AE. Brand in der kleinen curvatur des magens eines atrophischen kindes. J Geburtsh 5:3, 1826.
7. Paltauf A. Die spontane dickderm ruptur der neugeborenen. Virchov Arch Pathol Anat 111:461, 1888.
8. Agerty HA, Ziserman AJ, Sollenberger CL. A case of perforation of the ileum in a newborn infant with operation and recovery. J Pediatr 22:233, 1943.
9. Kliegman RM, Fanaroff AA. Neonatal necrotizing enterocolitis: a nine years experience. Am J Dis Child 135:608, 1981.
10. Ricketts RR, Jerles ML. Neonatal necrotizing enterocolitis: Experience with 100 consecutive surgical patients. World J Surg 14:600, 1990.
11. Teasdale F. et al: Neonatal necrotizing enterocolitis: The relationship of age at time of onset and prognosis. Canad Med Assoc J 123:387, 1980.
12. Wilson R. et al: Short comminication: age at onset of necrotizing enterocolitis: an epidemiologic analysis. Pediatr Res 16:82, 1982.
13. Udal JN, Jr. Gastrointestinal host defense and necrotizing enterocolitis. J pediatr 117:33-43, 1990
14. Bauer CR, Morrison JC, Poole WK, Korones SB, Boehm JJ, Rigatto H, Zachman RD. A decreased incidence of necrotizing enterocolitis after prenatal glucocorticoid therapy. Pediatrics 73:682-8, 1984.
15. Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, ve Schullinger JN. An experimental study of acut neonatal enterocolitis: The importance of breast milk. J Pediatr Surg 9:587-595, 1974.
16. Dickinson EC, Gorga JC, Garrett M, Tuncer R, Watkins SC, Alber SM, Parizhskaya M, Truceo M, Rowe MI, ve Ford HM: Ig A suplementation abrogates bacterial translocation and preserves thearchitecture of the intestinal epitelium. Surgery 124:284, 1998.
17. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in tha breast-fed and bottle-fed infants. Pediatrics 72:317-321, 1983.
18. Moriaritey RR, Finer NN, Cox SF, et al. Necrotising enterocolitis and human milk. Journal of pediatrics 94:295-296, 1979.
19. White KC, Harkavy KL. Hipertonic formula resultingfrom adding medication. Am J Dis Child 136:931, 1982.
20. Martin DM, Goldman JA, Gilliam J, Nasrallah SM. Gold-induced eosinophilic enterocolitis: response to oral cromolyn sodium. Gastroenterol 80:1567-70, 1981.
21. Clark DA, Thompson JE, Weiner LB, ve ark. Necrotizing enterocolitis: Intraluminal biochemistry in human neonates and rabbit model. Pediatr Res 16:919-921, 1985.
22. Kliegman RM. Neonatal necrotizing enterocolitis:Implication for an infectious disease. Pediatr Clin North Am 26:327-44, 1979.
23. Kosloska AM, Ulrich JA. A bacteriologic basis for the clinical presentation of necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 15:558-64, 1980.
24. Rotbart HA, Levin MJ: How contagious is necrotizing enterocolitis? Pediatr J İnfect Dis 2:406, 1983.
25. Book LS et al. Clustering necrotizing enterocolitis:interruption by infection-control methods. N Eng J Med 297:984, 1977.
26. Lawrence G,Bates J, Gaul A. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. Lancet 72:317, 1982.
27. Engel RR et al. Origin of mural gas in necrotizing enterocolitis. Pediatr Res 7:292, 1973.
28. Kosloske AM, Musemeche CA. Necrotizing enterocolitis of the neonate. Clin Perinatol 16:97, 1989.
29. Harris MC et al. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. J Pediatr 124:105, 1994.
30. Han VK, Sayed H, Chance GW, Brabyn DG, Shaheed WA. An outbreak of Clostridium difficile necrotizing enterocolitis: a case for oral vancomycin therapy? Pediatrics Jun;71(6):935-41, 1983.

31. Rotbart HA, Nelson WL, Glode MP, Triffon TC, Kogut SJ, Yolken RH, Hernandez JA, Levin MJ. Neonatal rotavirus-associated necrotizing enterocolitis: case control study and prospective surveillance during an outbreak. J Pediatr. 112(1):87-93, 1988.
32. Rousset S, Moscovici O, Lebon P, Barbet JP, Helardot P, Mace B, Bargy F, Le Tan Vinh, Chany C. Intestinal lesions containing coronavirus-like particles in neonatal necrotizing enterocolitis: an ultrastructural analysis. Pediatrics Feb; 73(2):218-24, 1984.
33. Robinson MJ , Clayden GS, Smith MF. Xantines and necrotizing enterocolitis. Arch Dis Child 55:494, 1980.
34. Johnson L et Al. Relationship on prolonged pharmacologic serum levels of vitamin E to incidence of sepsis and necrotizing enterocolitis in infants with birth weight 1500 gr. or less. Pediatrics 75:619, 1985.
35. Norton ME, Merrill J, Cooper BAB, et al. Neonatal complications after administration of indomethacin for preterm labor. N Eng J Med 329:1602-1607, 1993.
36. Czyrko C, DelPin CA, O'Neill JA, ve ark. Maternal cocaine abuse and necrotizing enterocolitis: Outcome or survival. J Pediatr Surg 26:414-421, 1991.
37. Scheifele DW, Olsen E, Fussell S, Pendray M. Spontaneous endotoxinemia in premature infants:Correlations with oral feeding and bowel dysfunction. J Pediatr Gastroenterol Nutr 4:67-74, 1985.
38. Terashita ZI, Imura Y, Nishikawa K, Sumida S. Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock? Eur J Pharmacol 109:257-61, 1985.
39. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF ve ark. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 234:470-474, 1986.
40. Okusawa 5, GelfandJA, Ikejima T, Conolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. J Clin Invest 8l:1l62-1172, 1988.
41. Sun XM, Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. J Clin Invest 81:1328-1331, 1988.
42. Caplan MS, Kelly A, Hsueh W Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: The role of platelet activating factor. Pediatr Res 31 :428-434, 1992.
43. Muguruma K, Gray PW, Tjoelker LW. The central role of PAF in necrotizing enterocohitis development. Adv Expl Med Biol 407:379-382, 1997.
44. Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis: The role of platelet-activating factor and endotoxin. Am J Pathol 112:127-135, 1983.
45. Hsueh W, Gonzalez-Crussi F, Arroyave JL. Platelet activating factor is an endogenous mediator for bowel necrosis in endotoxemia. FASEB J 1:403-405, l987.
46. Caplan MS, Sun SM, Hsueh W. Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: The role of platelet-activating factor (PAF-acether). Gastroenterol 99:979-986, 1990.
47. Caplan MS, Hsueh W. Necrotizing enterocolitis: Role of platelet activating factor. endotoxin, and tumor necrosis factor. J Pediatr. 117:47, 1990.
48. Evan P Nadler, Dickinson E, Knisely A, Zhang XR, Boyle P, Beer-stolz D, Watkins SC, ve Ford HR. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. J Surg Res 92:71-77, 2000.
49. Anane D, Sanquer S, Sebil V, Faye A, Djuranovic D. Compartmentalised Inducible Nitric-Oxidesynthase Activity In Septic Shock. Lancet 355:143, 2000.
50. Goldman AS, Smith CW. Host resistance factors in human milk. J Pediatr 83:1082-6, 1973.
51. McDonald MC, Henning SJ. Sinergistic effects of thyroksine and dexemethasone on enzyme ontogeny in rat small intestine. Pediatr Res 32:306-11, 1992.
52. Kedinger M, Simon PM, Raul F, Grenier JF, Haffen K. The effects of dexemethasone on the development of rat intestinal brush border enzymes in organ culture. Dev Biol 74:9-21, 1980.
53. Eibl MM, Wolf HM, Furnkranz HM, Rosenkranz HM. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by Iga-IgG feeding. N Eng J Med 319:1-7, 1988.
54. Rubaltelli FF, Benini F, Sala M. Prevention of necrotizing enterocolitis in neonates at risk by oral administration of monometric IgG. Dev Pharmacol Ther 17:138-143, 1991.
55. Lloyd JR: The etiology of gastrointestinal perforations in the newborn. J Pediatr Surg 4:77, 1969.
56. Martinez-Tallo E, Claure N, Bancalari E. Necrotizing enterocolitis in full-term or near-term infants. 71:292-298, 1997.
57. Touloukian RJ. Neonatal necrotizing enterocolitis: an update on etiology, diagnosis and treatment. Surg Clin North Am 56:281, 1976.
58. Hebra A, Brown MF, Hirschi RB. Mesenteric ischemia in hypoplastic left heart syndrome. J Pediatr Surg 28:606-611, 1993.

59. Colli AM, Perry SB, Lock JE, Keane JF. Balloon dilation of critical valvar pulmonary stenosis in the first month of life. Cathet Cardiovasc Diagn 34:23-8, 1995.
60. Yu VY, Joseph R, Bajuk B, Orgill A, Astbury. Perinatal risk factors for necrotizing enterocolitis. J Arch Dis Child 59:430-4, 1984.
61. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. Sungery 94:415, 1983.
62. Flores-Nava G, Joachin-Roy H, Rodriguez-Cueto G. Risk factors in neonatal necrotizing enterocolitis. Bol Med Hosp Infant Mex 50(9):645-9, 1993.
63. Ballance WA, Dahms BB, Shenker N. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis. J Pediatr 117:6-13, 1990.
64. Book LS ve ark. Necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants fed an elemental formula. J Pediatr 87:602, 1975.
65. Engel RR, Virnig NL, Hunt GE. Origin of mural gas in necrotizing enterocohitis. Pediatr Res 7:292-296, 1973.
66. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 6:3051-3064, 1992.
67. Furchgott RF. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. Acta Physiol Scand 139:257-270, 1990.
68. Davenpeck KIL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expres sion and actions in the rat microcirculation. Gastroenterology 107:1050-1058, 1994.
69. Kubes P, Kurose 1, Granger DN. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. Am J Physiol 267:931-937, 1994.
70. Burleigh DE. N^G-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. Gastroenterology 102:679-683, 1992.
71. Hata F, Ishii T, Kanada A, et al. Essential role of nitric oxide in descending inhibition in the rat proximal colon. Biochem Biophys Res Commun 172:1400-1406, 1990.
72. Czapski G, Goldstein S. The role of the reactions of NO with superokside and oxygen in bilogycal systems: A kinetic approach. Free Radic Biol Med 19:785-794, 1995.
73. Grisham MB. Nitric oxide production by intestinal epithelial cells. Gastroenterol 104:710, 1993.
74. Salzman AL. Nitric oxide in the gut. New Horizons 3:33-43, 1995.
75. Haris MC, Costarino AT, Jr. Sullivan JS, Dulkerian S, McCawley L, Corcoran L, Butler S, and Kilpatrick L. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. J Pediatr 124: 105, 1994.
76. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Phsiology, pathophsiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43:109-142, 1991.
77. Barry MK, Aloisi JD, Pickering SP, et all. Nitric oxide modulates water and electrolyte transport inthe ileum. Ann Surg 219:382-388, 1994.
78. Gianotti L, Alexander JW, Pyles T, et all. Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearence. The role of nitric oxide. Ann Surg 217:644-653, 1993.
79. Stark ME, Szurszewski JR. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. Gastroenterol 103:1928-1949, 1992.
80. Tepperman BL, Brown JF, Whittle BJ. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. Am J Physiol 265:214-8, 1993.
81. Caplan MS. Hedlund E, Hill N, et al. The role of endogenous nitric oxide and platelet-activating factor in hypoxia-induced intestinal injtıry in rats. Gastroenterol 106:346-352. 1994.
82. Kubes P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. AmJ Physiol 262:138-142. 1992.
83. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of $Ca2^t$ -dependent and $Ca2^t$ -independent nitric oxide synthases. FEBS Lett 29:145-149, 1991.
84. Ford HR, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenezis of necrotizing enterocolitis. J Ped Surg 32:275-282, 1997.
85. Albina JE. Cui S, Mateo RB. et al. Nitric oxide mediated apoptosis in murine perionteal macrophages. J Immunol 150:5080. 1993.
86. Cui S, Reichner JS, Albina JE. Nitric oxide (N0) induces apoptosis in Con A-stimulated splenocytes. Faseb J 8:4470, 1994.
87. Fehsel K. Kroncke KD, Mever KL, et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. J İmmunol 155:2858-2865, 1995.

88. Miller MJ, Thompson JH, Zhang XJ, Sadowska-Krowicka H, Kakkis JL, Munshi UK, Sandoval M, Rossi JL, Eloby-Childress S, Beckman JS. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. Gastroenterol 109(5):1475-83, 1995.
89. Curran RD, Biliar TR, Stuehr DJ, et al. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. Ann Surg 212:462-471, 1990.
90. Madara JL, Stafford J. Interferon-gama directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. J CIin Invest 83:724-727, 1989.
91. Adams RB, Planchon SM, Roche JK. IFN-gama modulation of epithelial barrier function. J Immunol 150:2356-2363, 1993.
92. Kaoutzani P, Colgan SP. Cepek KL, et al. Reconstitution of cultured intestinal epithelial monolayers with a mucosal-derived T lymphocyte cell hine. J Clin Invest 94:788-796. 1994.
93. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide svnthase confers inducibility by interferon-y and bacterial lipopolysaccharide. J Exp Med 177:1779-1784, 1993.
94. Mourelle M, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, Malagelada JR. Toxic dilatation of colon in a rat model of colitis is linked to an inducible form of nitric oxide synthase. Am J Physiol 270:G425-430, 1996.
95. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet 339:572, 1992.
96. Chillon JM, Baumbach GL. Functional and structural alteration of cerebral arterioles in chronic hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition. Br J Pharmachol 114:127, 1995.
97. Dowel FJ, Henrion D, Michel JB. The effect ofchronic nitric oxide synthase inhibition on vasoreactivity of rat mesenteric resistance arteries. Br J Pharmachol 115:40, 1995.
98. Lieber E, Smith GBL. The chemistry of aminoguanidine and related substances. Chem Rev 25:213-71, 1939.
99. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis diabetic complication. N Eng J Med 318:1315-21, 1988.
100. Li Y-M, Steffes M, Donnely T, Liu C, Fuh H, Basgen J, et all. Prevention of cardiovasculer and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine. Proc Natl Acad Sci USA 91:3902-7, 1996.
101. Hasan K, Heesen B-J, Corbett JA, Mcdaniel ML, Chang K, Allison W. Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. Eur J Pharmachol 246:101-6, 1993.
102. Sculer W. Zur Hemmung der Diaminoxydase (Histaminase). Experientia 8:230-232, 1952.
103. Wolff DJ and Lubeskie A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. Arch Biochem Biophys 316: 290-301, 1995.
104. Ruetten H and Thiemermann C. Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine or aminoethyl-isothiourea in macrophages and in the rat. Biochem Biophys Res Commun 225: 525-530, 1996.
105. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. Clin Chem 41:892-896, 1995.
106. Barlow B. and Santulli TV. Importance of rnultiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. Surgery 77: 687, 1975.
107. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: Actions and properties. FASEB J 3:31-36, 1989.
108. Nichols K, Staines W, Rubin S, Krantis A. Distribution of nitric oxide synthase activity in arterioles and venules of rat and human intestine. Am J Physiol 267:G270-5, 1994.
109. Granger, D. N., and P. Kubes. Nitric oxide as anti-inflammatory agent. Methods Enzymol. 269: 434-442, 1996.
110. Tamai H, Gaginella TS. Direct evidence for nitric oxide stimulation of electrolyte secretion in the rat colon. Free Radic Res Commun 19:229-39, 1993.
111. MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. Life Sci 45:1869-76, 1989.
112. Pizcueta MP, Pique JM, Bosch J, Whittle BJ, Moncada S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. Br J Pharmacol 105:184-90, 1992.
113. Cheung PY, Salas E, Schulz R, Radomski MW. Nitric oxide and platelet function. implications for neonatology. Semin Perinatol 21:409-17, 1997.
114. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. Am J Med 109:150-8, 2000.
115. Graf JL, VanderWall KJ, Adzick NS, et al. Nitroglycerin attenuates the bowel damage of necrotizing enterocolitis in a rabbit model. J Pediatr Surg 32:283-285, 1997.
116. Di Lorenzo M, Krantis A. Altered nitric oxide production in the premature gut may increase susceptibility to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 36:700-705, 2001.

117. Di Lorenzo M, Bass J, Krantis A. Use of L-arginine in the treatment of experimental necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 30:235-40, 1995.
118. Tracey WR, Xue C, Klinghofer V, Barlow J, Pollock JS, Forstermann U, Johns RA. Immunochemical detection of inducible NO synthase in human lung. Am J Physiol 266:722-7, 1994.
119. Seago ND, Clark DA, Miller MJ. Role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and peroxynitrite in gut inflammation. Inflamm Res 2:153-4, 1995.
120. Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol 3:65-70, 1991.
121. Miller MJS, Sadowska-Krowieka H, Chotinaruemol S. et al. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. J Pharm ExpTher 264:11-16, 1993.
122. Aiko S, Fuseler J, Grisham MB. Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibition or Sulfasalazine on the Spontaneous Colitis Observed in HLA-B27 Transgenic Rats. Pharmacol 284: 722-727, 1998.
123. Ribbons KA, Currie MG, Connor JR, Manning PT, Allen PC, Didier P, Ratterree MS, Clark DA and Miller MJS. The Effect of Inhibitors of Inducible Nitric Oxide Synthase on Chronic Colitis in the Rhesus Monkey. 280:1008-1015, 1997.
124. Aiko S ve Grisham MB. Spontaneous intestinal inflammation and nitric oxide metabolism in HLA-B27 transgenic rats. Gastroenterology 109: 142-150, 1995.
125. Grisham MB, Specian RD, Zimmerman TE. Effects of nitric oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in a model of chronic granulomatous colitis. J Pharmacol Exp Ther 271(2):1114-21, 1994.
126. Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. Gut 36:718-23, 1995.
127. Reynolds PD, Middleton SJ, Hansford GM, Hunter JO. Confirmation of nitric oxide synthesis in active ulcerative colitis by infra-red diode laser spectroscopy. Eur J Gastroenterol Hepatol 9:463-6, 1997.
128. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. Lancet 20;341:465-6, 1993.
129. Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJ, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. Lancet 7;342:338-40, 1993.
130. Oudkerk Pool M, Bouma G, Visser JJ, Kolkman JJ, Tran DD, Meuwissen SG, Pena AS. Serum nitrate levels in ulcerative colitis and Crohn's disease. Scand J Gastroenterol 30:784-8, 1995.
131. Lancaster, J. R., Jr. and Hibbs, J. B. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 87: 1223-1227, 1990.
132. Liu S, Beckman JS, Ku DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. J Pharmacol Exp Ther 268:1114-21, 1994.
133. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys 1;288:481-7, 1991.
134. Rachmilewitz D, Stamler JS. Karmeli F, et al: Peroxynitrite induced rat colitis-A new model of colonic inflammation. Gastroenterol 105:l68l-1688. 1993.
135. Yamaguchi T, Yoshida N, Ichiishi E, Sugimoto M, Naito Y, Yoshikawa T. Differing effects of two nitric oxide synthase inhibitors on experimental colitis. Hepato-gastroenterol 48:118-122, 2001.
136. Hsueh W, Caplan MS. Sun X. et al. Platelet-activating, tumor necrosis factor, hypoxia, and necrotizing enterocolitis. Acta Paediatr Supp1296:1-17. 1994.
137. Ou J, TM, Carlos SC, Watkins JE, Saavedra LK, Keefer YM, Kim BG, and Billiar TR. Differential effects of nonselective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia. Nitric Oxide 1: 404-416, 1997.