

Leptin Tedavisi Yeni Doğan Rat İncebarsağında Hipoksi/Reoksijenasyon Hasarına Karşı Koruyucu mudur?

Keremettin Uğur ÖZKAN^{a,1}, Fatma İNANÇ², Metin KILINÇ², Çetin BORAN³

¹Kahramanmaraş Sütcüimam Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı,

²Biyokimya Anabilim Dalı,

³Patoloji Anabilim Dalı, KAHRAMANMARAŞ

ÖZET

Amaç: Hipoksi reoksijenasyonun neden olduğu yenidoğan rat incebarsak hasarına leptin'in etkinliğini araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Doğum sonrası rastgele seçilmiş 30 adet yavru rat kendi aralarında üç eşit gruba bölünerek deneysel gruplar oluşturuldu. Grup 1 kontrol, Grup 2 hipoksi-reoksijenasyon, Grup 3 leptin hipoksi-reoksijenasyon grubu olarak belirlendi. Grup 3 deki yavru ratlara deneysel işlemden 1 saat önce ciltaltı enjeksiyonla 20 mikrogram/kg leptin verildi. Bu gruplardaki yavrular bir cam kavanoz içerisine koyuldular. Kavanoz içerisindeki hava aspiratör yardımı boşaltılıp tekrar karbon dioksit ile dolduruldu. Yavruların 10 dk bu ortamda solumaları sağlandı ve ardından kavanoz oksijen ile dolduruldu. Böylece reoksijenasyon yapılmış oldu. Onuncu dakikadan sonra yavrular tekrar dışarı alındı ve 10 dakika soğuğa maruz bırakıldı. Bu işlem birkez daha baştan sona tekrarlandı. Uygulanan bu işlemler serisi 2. ve 3. günlerde de tekrarlandı. Üçüncü günü yavrular dekapite edildi ve gastrointestinal sistemleri çıkarıldı. Histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için terminal ileumdan 3 cm uzunluğunda ince barsak dokusu alındı. Histopatolojik incelemede ileum hasarı bakıldı ve immunhistokimyasal boyama ile epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EBFR) araştırıldı. Kalan barsak dokularında malondialdehit (MDA), ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Grup 2 ve grup 3 de tipik NEK bulguları gözlemlendi. Histopatolojik incelemelerde gruplar farksızdı ($P>.05$) Yine grup 2 ve grup 3 de MDA düzeyleri farksızdı ($p>.05$) Ancak bu grupların NO düzeyleri birbirinden farklıydı. NO Grup 2 de yüksek ve Grup 3 de kontrol grubu ile aynıydı ($P>.05$)

Sonuç: Leptin'in NO düzeylerini değiştirmesine rağmen yeni doğan ratlarda hipoksi reoksijenasyonun neden olduğu barsak hasarını önleyici etkisi yoktur. ©2005, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Anahtar kelimeler: Leptin, hipoksi/reoksijenasyon, nekrotizan enterokolit

ABSTRACT

Effect of Leptin Treatment on Small Intestinal Damage Induced by Hypoxia Reoxygenation in Newborn Rats

Objective: To evaluate whether leptin has a protective effect on small intestinal damage induced by hypoxia reoxygenation in newborn rats.

Materials and Methods: There were three equal Groups each consisted of 10 newborn rats. Group 1; control, Group 2; hypoxia-reoxygenation, Group 3; leptin-hypoxia-reoxygenation. The rats of Group 3 were pretreated with leptin (20 microgram/kg) one hour before experiments then rat pups in Group 2 and Group 3 were stressed twice daily with asphyxia followed by cold (+4 °C for 10 min). Breathing 100% CO₂ for ten minutes in a chamber followed 10 minutes 100% O₂ breathing was the asphyxia model. This protocol was repeated for the following two days and the rat pups were decapitated on the third day. The entire gastrointestinal tract was removed. A 3-cm section of distal ileum from each animal was taken. Histopathological damage and epidermal growth factor receptors (EGFR) are evaluated. For biochemical evaluation, tissue malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels were measured.

Results: In Group 2 and Group 3 macroscopic intestinal injuries were observed. Histopathological grading and immunohistochemical EGFR evaluation showed similar damage in the Group 2 and the Group 3. In these Groups tissue MDA levels were also in the same ranges but NO levels were different each other with the higher levels of Group 2. Group 3 had same NO levels with control Group.

Conclusions: Leptin pretreatment has no protective effect on hypoxia reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats although it changes NO levels in the injured intestine. ©2005, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Key words: Leptin, hypoxia reoxygenation, necrotizing enterocolitis

Yeni doğan ünitelerine yatırılan özellikle prematüre bebeklerin edinsel gastrointestinal hastalıklarından en önemlisi olan nekrotizan enterokolit (NEK), etyolojisi tam aydınlatılmamış ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. (1). Hastalık bebeklerde yerleştikten sonra hızla ilerleyebilmekte ve tüm sistemleri etkileyerek organ yetmezliklerine sebep olabilmektedir (2). Patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen hastalığın etiyolojisinde prematürite, hipoksi,

formüla mama ile beslenme, bakterial infeksiyon, intestinal iskemide ve gastrointestinal distansiyon gibi risk faktörlerinin etkili olabileceği bilinmektedir (3-8). Yapılan bazı çalışmalarda serbest oksijen radikalleri, tümör nekrozis faktör, platelet aktive edici faktör ve lökotrienler gibi bazı inflamatuvar mediatörlerin hastalık patogenezinde rol oynadıkları da gösterilmiştir (9-12).

Hipoksinin NEK oluşumuna olan etkisi azalmış mukozal kan akımı ve artmış oksijen ihtiyacı üzerinden olmaktadır (13).

^a Yazışma Adresi: Dr. Keremettin U. ÖZKAN, Kahramanmaraş Sütcüimam Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, K.MARAŞ
Tel: 0344 2212337 Fax: 0344 2212371 e-mail: ozekan@hotmail.com

Aynı zamanda hipoksik stres platelet aktive edici faktör miktarını artırmakta ve serbest oksijen radikal hasarı yapmaktadır (10,14). Gastrointestinal sistem motilitesi üzerine hipoksinin olumsuz etkilere neden olduğu da bilinmektedir. Hayvanlarda hipoksi oluşturularak yapılan bazı deneysel çalışmalar da hipoksinin intestinal intirinsik ritmi ve mide boşalmasını geciktirdiği, spontan incebarsak ve mide kontraksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir (15-18). Hipoksinin neden olduğu gastrointestinal sistem kontraksiyon azalması indirekt olarak da bakteri translokasyonu riskini artırmaktadır. Hipoksinin neden olduğu gastrointestinal sistem motilite azalması hayvan deneylerinin yanı sıra izole insan barsağında da gösterilmiştir (19).

Enerji metabolizması ve gıda alınan düzenlenmesinde etkili olan Leptin 16-k D ağırlığında bir proteindir ve özellikle adipozit hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Rat ince barsağında çok sayıda leptin reseptörlerinin varlığını göstermiştir (20). Yapılmış bazı çalışmalar leptinin ratlarda ince barsak boyunu uzattığını, mukozal kütleyi artırdığını ve ince barsaklarda emilim fonksiyonlarını geliştirdiğini göstermiştir (21,22). Leptin bu özellikleri nedeniyle ince barsak için yeni bir büyüme faktörü olarak adlandırılmıştır. Ayrıca kedilerde yapılan bir deneysel çalışmada leptinin kolesistokinin varlığında barsak kontraksiyonlarını artırdığı da gösterilmiştir (23). Leptin yine kısa barsak sendromunda kalan barsak segmentinde emilim fonksiyonlarını artırarak yeni bir kullanım alanı daha bulmuştur (24). Bunlarla birlikte leptin büyüme hormon düzeylerini artırmakta ve ince barsaklarda büyüme hormonunun mukoza üzerindeki bariyer koruyucu etkisine sebep olmaktadır (25).

Bu sebeple yeni doğan ratlarda incebarsak hipoksi-reoksijenasyon hasarına karşı leptinin etkilerini araştırmak istedik.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ağırlıkları 180-210 gr arasında değişen Sprague-Dawley cinsi 7 ayı rat gebe bırakıldıktan sonra normal şartlar altında (21-23°C) ayrı ayrı kafeslerde takibe alındı. Doğum zamanı yaklaştığında habersiz doğumlara engel olmak için takip sıklığı artırıldı. Bakıcı kontrolünde doğumların gerçekleşmesi sağlanarak yavruların doğar doğmaz anne sütü almalarına engel olundu. Doğum sonrası rastgele seçilmiş 30 adet yavru rat kendi aralarında üç eşit gruba bölünerek deneysel gruplar oluşturuldu. Grup 1 kontrol grubu olurken Grup 2 hipoksi-reoksijenasyon grubu, Grup 3 ise leptin hipoksi-reoksijenasyon grubu olarak belirlendi. Gruplarda yavru ağırlıkları ortalama olarak Grup 1 de: 5.-5.2 gr, Grup 2 de: 5.1 -5.2 gr ve Grup 3 de: 4.9-5.1gr idi. Anne sütü almadan ayrılmış olan Grup 2 ve Grup 3 yavruları doğumdan hemen sonra deneysel işleme tabi tutuldular. Grup 3 deki yavru ratlara deneysel işlemden 1 saat önce ciltaltı enjeksiyonla 20 mikrogram/kg leptin verildi. Bu gruplardaki yavrular bacaklarına konulan işaretler ile bir cam kavanoz içerisine koyuldular. Kavanoz içerisindeki hava aspiratör yardımı ile boşaltıldıktan sonra kavanoz tekrar karbondioksit ile dolduruldu. Yavruların 10 dk bu oksijensiz yoğun karbondioksitli ortamda solumaları sağlandı. 10. dakikada karbondioksit aspire edildi ve kavanoz oksijen ile dolduruldu. Böylece yoğun oksijen ile reoksijenasyon yapılmış oldu. Onuncu dakikadan sonra yavrular tekrar dışarı alındı ve 10 dakika soğuğa maruz bırakıldı. Bu işlem bir kez daha baştan sona tekrarlandıktan sonra yavrular annelerine verildi ve anne sütü almaları sağlandı. Uygulanan bu işlemler serisi 2. ve 3. günlerde de tekrarlandı. Üçüncü günü yavrular dekapite

edildi ve gastrointestinal sistemleri çıkarıldı. Tüm barsak sistemi makroskopik NEK bulguları açısından incelendikten sonra terminal ileumdan 3 cm uzunluğunda ince barsak dokuları alındı. Barsakta renk değişimi, barsakta kanama, ileal distansiyon, ve/veya ileal darlık makroskopik NEK değerlendirme kriterleri olarak alındı. Terminal ileumdan alınan doku örneklerinde histopatolojik olarak 1 den 5 e kadar derecelendirme ile ileum hasarı ve immunhistokimyasal boyama ile epidermel büyüme faktör reseptörleri (EBFR) bakıldı ve bir kısım doku biyokimyasal inceleme için ayrıldı. İleum yapısındaki değişiklikler gruplardan habersiz bir araştırmacı tarafından tipik NEK bulguları açısından derecelendirildi. Hemotoksilen&Eozin ile yapılan bu incelemede değerlendirme Grade 1; normal histoloji, Grade 2 ; hidropik dejenerasyon ve/veya yüzeysel epitelial hücrelerin lamina propriadan ayrılması, Grade 3 ; villus uçlarına sınırlı epitelial hücre nekrozu, Grade 4 ; villus nekrozu, Grade 5; tam kat nekroz olacak şekilde yapıldı. İmmün boyama ile yapılan incelemede genel boyanma paterni saptanabilir boyanma yok (-), hafif şiddette boyanma (+), orta şiddette boyanma(++), kuvvetli boyanma (+++), çok yoğun boyanma(++++) olacak şekilde sınıflandırıldı.

Biyokimyasal incelemede; dokularda malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) yan ürünü olan nitrit ölçüldü (Griess yöntemi) (26). Biyokimyasal değerler için önce Kruskal-Wallis testi uygulandı, gruplar arasında fark olduğu görülünce gruplar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Histopatolojik inceleme sonuçları x2 testi ile değerlendirildi. P<.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

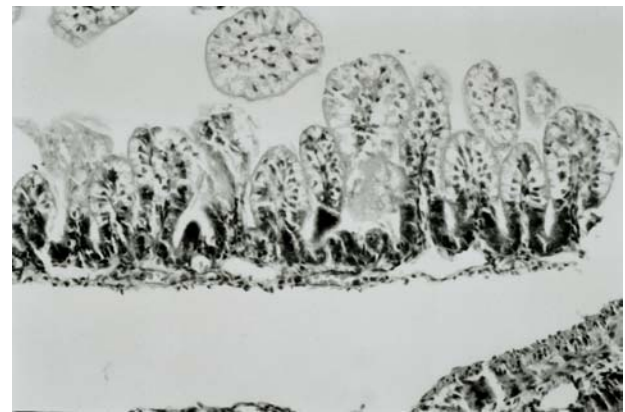
BULGULAR

Grup 2 ve Grup 3 deki hayvanlarda makroskopik NEK bulgularına rastlandı. H&E boyama ile yapılan histopatolojik incelemede Grup 2 ve Grup 3 de Grade 2 ve Grade 3 hasarlar gözlemlendi (Tablo 1)(Resim 1).

Tablo 1. Dokularda histopatolojik hasar derecelemesi

Gruplar	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Grup 1 (n=10)	10	-	-	-	-
Grup 2 (n=10)	-	8	2	-	-
Grup 3 (n=10)	-	9	1	-	-

Grup 2 ve Grup 3, Grup 1 den farklı p<.05



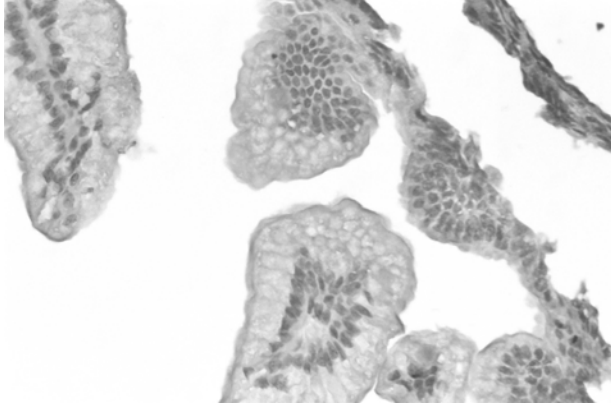
Şekil 1. Hafif hasar, yüzeysel epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon (hematoxilen-eozin x200) (Grade 2 barsak hasarı)

Grup 2 ve Grup 3 de histopatolojik olarak hasar farksızdı ($p > .05$). İmmunhistokimyasal incelemede Grup 2 ve Grup 3 de kontrol grubuna göre daha az immün boyanma görüldü ($p < .05$) (Tablo 2) (Resim 2, Resim 3). Grup 2 ve Grup 3 de immunhistokimyasal olarak EBFR boyanması da farksızdı ($p > .05$). Grup 2 ve Grup 3 de barsak dokusu MDA seviyeleri kontrol grubuna göre artmış ($p < .0001$) ve birbirinden farksızdı. ($p > .05$) (Tablo 3). İnce barsakların nitrit düzeyleri Grup 2 de diğer gruplardan yüksek bulundu ($p < .001$). Grup 3 de nitrit düzeyleri kontrol grubundan farksızdı ($p > .05$) (Tablo 4).

Tablo 2. Dokularda EGFR immunhistokimyasal boyanması

Gruplar	-	+	++	+++	++++
	EBFR	EBFR	EBFR	EBFR	EBFR
Grup 1 (n=10)	-	-	-	9	1
Grup 2 (n=10)	-	7	3	-	-
Grup 3 (n=10)	-	8	2	-	-

Grup 2 ve Grup 3, Grup 1 den farklı $p < .05$

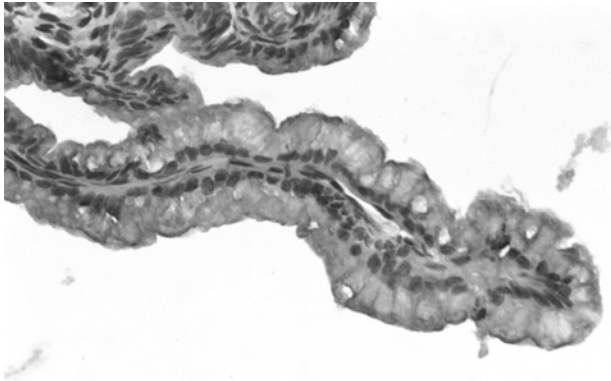


Şekil 2. EBFR için hafif immünohistokimyasal boyama. (immunperoxidase boyası, x400). (+ EBFR boyanması)

Tablo 3. Gruplarda doku MDA (nmol/mg prot) analiz sonuçları

Gruplar	Ortanca	En Düşük	En Büyük
Grup 1 (n=10)	0.31	0.14	0.44
Grup 2 (n=10)*	2.18	0.99	3.89
Grup 3 (n=10)*	1.86	1.64	2.80

* Grup 2 ve Grup 3, Grup 1 den farklı $p < .000$
Grup 2, Grup 3 den farksız $p > .05$



Şekil 3. EBFR için şiddetli immünohistokimyasal boyama. (immunperoxidase boyası, x400). (+++ EBFR boyanması)

Tablo 4. Gruplarda doku Nitrit ($\mu\text{mol/mg prot}$) analiz sonuçları

Gruplar	Ortanca	En Düşük	En Büyük
Grup 1 (n=10)	0.18	0.08	1.14
Grup 2 (n=10)*	2.24	0.10	4.71
Grup 3 (n=10)	0.19	0.05	0.88

*Grup 2, Grup 1 ve Grup 3 den farklı $p < .001$
Grup 3, Grup 1 den farksız $p > .05$

TARTIŞMA

Serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu lipid peroksidasyon hasarında MDA ölçümü geleneksel olarak kullanılmaktadır. NEK patogenezinde serbest oksijen radikallerinin etkileri, asfiksi-NEK ilişkisi ve deneysel intestinal iskemi ve NEK ilişkileri ile ileri sürülmüştür (27,28). Hipoksinin neden olduğu NEK etiyojisini açıklayabilmek amacıyla ciddi anoksik epizotlar geçiren yeni doğanlarda 'diving reflex' diye tabir edilen bir mekanizma tarif edilmiştir (29). Bu görüşe göre hipoksik veya ciddi anoksik durumlarda kan beyin ve kalp gibi hayati organlara gitmekte ve bu olaylar esnasında barsaklar da hipoksiye maruz kalmaktadırlar. Bu çalışmamızda Grup 2 ve Grup 3 de MDA değerlerimiz arasında bir fark bulunmadı. Histopatolojik incelemede yine bu iki grup arasında doku hasarının farklı olmaması leptin tedavisinin yenidoğan ratlarda hipoksi-reoksijenasyonun neden olduğu incebarsak hasarına olumlu etki etmediğini göstermiştir.

Nadler ve arkadaşları formüle besleme ve hipoksi uygulaması ile rat yavrularında deneysel olarak NEK oluşturmuşlar ve hasarlı incebarsaklarda nitrik oksit sentaz-mRNA (iNOS mRNA) artışı tespit etmişlerdir (30). Bu bulgu deneysel NEK modellerinde barsak hasarı oluşumuna nitrik oksitin de etki ettiğini göstermektedir. Zhang ve arkadaşları incebarsak hasarı oluşturmuşlar ve hasarlı ince barsak dokusunda iNOS artışı olduğunu göstermişlerdir (31). Bizim çalışmamızda da NEK sadece hipoksi ve soğuk uygulaması ile oluşturuldu ve iNOS artışını değerlendirmek için dokularda nitrik oksit (NO) yan ürünü olan nitrit bakıldı. Grup 3 de dokuların nitrit düzeyleri Grup 2 den daha düşüktü ve kontrol grubu ile aynıydı. Leptinin sistemik NO miktarını ve gastrik ülser iyileşmesinde ülser kenarında iNOS aktivitesini artırdığı bilinmektedir ancak ince barsakta NO sentezini azalttığı henüz bildirilmemiştir. Bizim çalışmamızda nitrit seviyeleri Grup 3 de Grup 2 den daha az olmasına rağmen doku hasarı her iki grupta farksızdı. Grup 3 deki bu NOS aktivite azalması muhtemelen nonspesifiktir (cNOS ve iNOS azalması) çünkü faydalı etkilere sahip cNOS azalmamış olsaydı hipoksi-reoksijenasyon sonrası iNOS aktivite azalması doku hasarını azaltabilirdi.

Leptin barsak boyunu büyütüp, barsak mukozal yüzey kütlesini artıran bir hormon olarak tariflenmiştir. Bu etkilere barsakta neden olurken hangi mekanizma üzerinden etkili olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Epidermal büyüme faktörün barsakta önemli bir büyüme faktörü olduğu bilindiği için biz burada leptinin muhtemel etkisini EBFR ile araştırmak istedik. Bu nedenle bu çalışmada dokularda EBFR reseptör dağılımına immünohistokimyasal boyama ile baktık. Deneysel işlem uygulanan Grup 2 ve Grup 3 de kontrol grubuna kıyasla daha az immün boyanma görülmesine rağmen bu iki grup arasında immün boyanma farkı gözlemlenmedi. Bu sonuç da MDA ve H&E boyama ile yaptığımız ileum hasar

derecelemesi sonuçlarımızla uyumlu olarak leptinin yeni doğan rat incebarsak hipoksi reoksijenasyon hasarına ve hasar sonrası iyileşme sürecine olumlu etki etmediği sonucumuzu destekler özelliğindedir.

Bu çalışmada uyguladığımız NEK modeli Okur ve arkadaşlarının uyguladıkları NEK modelinin bir modifikasyonudur (32). Aynı modeli NEK etyolojisinde distansiyonun rolünü çalışan Kazez ve arkadaşları da kullanmışlardır (8). Biz burada barsaklarda daha ileri dereceli hasar oluşturmak için hipoksi süre ve sayısını artırdık ve soğuk stres uygulamasını ilave ettik. Literatürde bildirilen ve formüle mama uygulaması ile yapılan bir NEK modelini sadece hipoksinin neden olduğu incebarsak hasarı üzerinde çalışmak istediğimizden tercih etmedik. Aynı zaman da bu yöntemin

uygulanabilirliğinin kolay olması da tercih nedenlerimizden bir tanesi olmuştur. Deneysel metodu üç gün tekrar etmemizdeki neden ise ön çalışmalarımız esnasında barsaklarda yeterli hasar oluşturabilmek için işlemin en az üç gün tekrar edilmesi gerektiğini belirlememizdir. Bu yöntemin üç günlük tekrar ile uygulanması aynı zamanda hipoksik stresler arasında bir barsak rejenerasyon sürecine fırsat tanımıştır ki bu rejenerasyon süreci ile leptinin barsak mukozasına olabilecek muhtemel olumlu etkileri için süre tanımıştır.

Sonuç: Leptin hipoksi-reoksijenasyonun neden olduğu yenidoğan rat ince barsak hasarını azaltmamış ve tekrarlayan hasarlanma periyodları arasında barsakda mukozal rejenerasyonu hızlandırmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 409-432.
2. Morecroft JA, Spitz L, Hamilton PA, Holmes SJ. Necrotizing enterocolitis--multisystem organ failure of the newborn ? *Acta Paediatr Suppl* 1994; 396: 21-23.
3. Wilson R, Kanto WP Jr, McCarthy BJ, Feldman RA. Age at onset of necrotizing enterocolitis. Risk factors in small infants. *Am J Dis Child* 1982; 136: 814-16.
4. Kliegman RM. Models of the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990; 117: 2-5.
5. Go LL, Albanese CT, Watkins SC, Simmons RL, Rowe MI. Breast milk protects the neonate from bacterial translocation. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 1059-1063; discussion 1063-1064.
6. Scheifele DW. Role of bacterial toxins in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990; 117:44-46.
7. Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 1995; 4: 200-206.
8. Kazez A, Küçükaydın N, Küçükaydın M et al. A model of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis: the role of distension. *J Pediatr Surg*. 1997; 32: 1466-1469.
9. Caplan MS, Sun XM, Hseuh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990; 116: 960-964.
10. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W. Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: the role of platelet-activating factor (PAF-acether). *Gastroenterology* 1990 ; 99 : 979-986
11. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W. Hypoxia, PAF, and necrotizing enterocolitis. *Lipids* 1991; 26: 1340-1343.
12. Furukawa M, Lee EL, Johnston JM. Platelet-activating factor-induced ischemic bowel necrosis: the effect of platelet-activating factor acetylhydrolase. *Pediatr Res* 1993; 34: 237-241.
13. Topalian SL, Ziegler MM. Necrotizing enterocolitis: a review of animal models. *J Surg Res* 1984; 37:320-336.
14. Saugstad OD. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res* 1988; 23:143-150.
15. Hebra A, Brown MF, McGeehin K, Broussard D, Ross AJ 3rd. The effects of ischemia and reperfusion on intestinal motility. *J Pediatr Surg* 1993; 28: 362-365; discussion 365-366.
16. Szabo JS, Stonestreet BS, Oh W. Effects of hypoxemia on gastrointestinal blood flow and gastric emptying in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1985; 9: 466-471.
17. Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 878-884.
18. Kowalewski K, Zajac S, Kologej A. Effect of ischemic anoxia on electrical and mechanical activity of the totally isolated porcine stomach. *Eur Surg Res* 1976; 8: 12-25.
19. Hayashi S, Gleason WA, McFee AS, Park MK. Effects of pH alterations and hypoxia on isolated human intestine. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 9-15.
20. Hill RA, Margetic S, Pegg GG, Gazzola C. Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 765-770.
21. Wolinski J, Biernat M, Guilloteau P, Westrom BR, Zabielski R. Exogenous leptin controls the development of the small intestine in neonatal piglets. *J Endocrinol* 2003; 177: 215-222.
22. Alavi K, Schwartz MZ, Prasad R, O'connor D, Funanage V. Leptin: a new growth factor for the small intestine. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 327-330.
23. Gaige S, Alysique A, Bouvier M. Effects of leptin on cat intestinal motility. *J Physiol* 2003; 546: 267-277.
24. Pearson PY, O'Connor DM, Schwartz MZ. Novel effect of leptin on small intestine adaptation. *J Surg Res* 2001; 97: 192-195.
25. Saleri R, Giustina A, Tamanini C, et al. Leptin stimulates growth hormone secretion via a direct pituitary effect combined with a decreased somatostatin tone in a median eminence-pituitary perfusion study. *Neuroendocrinology* 2004; 79: 221-228.
26. Green LC, Wagner DA, Glogowski J et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
27. Crissinger KD, Granger DN. Mucosal injury induced by ischemia and reperfusion in the piglet intestine: influences of age and feeding. *Gastroenterology* 1989; 97: 920-926.
28. Santulli TV, Schullinger JN, Heird WC et al. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics* 1975; 55: 376-387.
29. Nowicki P. Intestinal ischemia and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990; 117: 14-19.

30. Nadler EP, Dickinson E, Knisely A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. J Surg Res 2000; 92: 71-77.
31. Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. Regul Pept 2003; 15: 53-60.
32. Okur H, Kucukaydin M, Kose K, et al: Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. J Pediatr Surg 1995; 30: 1416-1419.

Kabul Tarihi:09.03.2005