

Çinko tedavisi hipoksi reoksijenasyonun neden olduğu yenidoğan rat incebarsak hasarına karşı koruyucu mudur?*

K. Uğur ÖZKAN, Fatma İNANÇ, Çetin BORAN, Metin KILINÇ

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi, Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dalları, Kahramanmaraş

Özet

Amaç: Nekrotizan enterokolit (NEK) patogenezinde iskemi reperfüzyon sonrası oluşan serbest oksijen radikal hasarının önemli etiyolojik faktör olduğu düşünülmektedir. Metal aspartatların serbest oksijen radikal hasarını azaltıkları bir çok dokuda gösterilmiştir. Çalışmamızda, çinko aspartat tedavisinin (ÇA) deneysel hipoksi reoksijenasyonun neden olduğu yenidoğan rat ince barsak hasarına karşı etkisi araştırılmıştır.

Yöntem: Doğum sonrası anne sütü almadan annelerinden ayrılmış 30 adet yenidoğan Sprague Dawley cinsi rat yavrusu (yedi ayrı anneden) üç eşit gruba ayrıldı. Grup 1; kontrol, grup 2; hipoksi-reoksijenasyon, grup 3; çinko-hipoksi-reoksijenasyon grubu olarak düzenlendi. Grup 3'deki yavru ratlara her gün deneysel işlemden 1 saat önce cilt altı enjeksiyonla 50 mg/kg "zinc bis DL Hydrogen Aspartate" verildi. Grup 2 ve grup 3'deki yavrulara üç gün boyunca günde iki kez asfiksi (10 dk. % 100 CO₂ ve 10 dk. % 100 O₂ solutularak) ve 10 dk. +4 derece soğuk uygulaması ile hipoksik stres uygulandı. İşlem sonrasında yavrular annelerine geri verildi. Üçüncü günü yavrular dekapite edildi ve tüm gastrointestinal sistem çıkarılıp NEK bulguları yönünden makroskopik olarak incelendi. Histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için terminal ileumdan 3 cm uzunluğunda ince barsak ve 1 g karaciğer dokusu alındı. Histopatolojik araştırmada 1'den 5'e kadar derecelendirme ile ileum hasarı ve immunhistokimyasal boyama ile epidermal büyüme faktör reseptörleri (EBFR) bakıldı. Biyokimyasal incelemede barsak ve tüm karaciğer dokularında malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) yan ürünü olan nitrit ve atomik absorpsiyon spektrofotometrisi ile doku çinko düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Grup 2 ve grup 3'de makroskopik olarak tipik NEK bulgularına rastlandı. Histopatolojik derecelendirme ve EBFR incelemesi Grup 3'de grup 2'ye kıyasla daha az hasar olduğunu gösterdi (p<.05). Grup 2'de tüm dokuların MDA ve nitrit seviyeleri grup 3'den yüksek (p<.001) ve çinko düzeyleri düşük bulundu (p<.001).

Sonuç: Çinko tedavisi yenidoğan ratlarda hipoksi reoksijenasyonun neden olduğu ince barsak hasarına karşı koruyucudur.

Anahtar kelimeler: Nekrotizan enterokolit, hipoksi-reoksijenasyon, çinko

*XXII. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde sunulmuştur (8-11 Eylül 2004, Bursa).

Adres: K. Uğur Özkan, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, 46050, Kahramanmaraş

Yayına kabul tarihi: 25.4.2005

Summary

Does zinc pretreatment have a protective effect on the injury severity of the newborn rats small intestine subjected to hypoxia-reoxygenation injury?

Aim: It is thought that free radical damage following ischemia reperfusion injury is an important factor for the pathogenesis of necrotizing enterocolitis (NEC). It is demonstrated that metal aspartates reduce free radical damage in many tissues. Thus, in this study, we aimed to evaluate whether zinc pretreatment has a protective effect on injury severity the newborn rats small intestine subjected to experimental necrotizing enterocolitis.

Method: A total of 30 newborn Sprague-Dawley rats (from seven different mothers) collected immediately after birth to prevent suckling of maternal milk were divided into three groups. The groups were labeled as group 1, control; group 2, hypoxia-reoxygenation; and group 3, zinc-hypoxia-reoxygenation group. The rats of group 3 were pretreated with "zinc bis DL hydrogen aspartate" (50 mg/kg) one hour before experiments via subcuticular injection then rat pups in group 2 and group 3 were stressed twice daily with asphyxia followed by cold (+4°C for 10 min) to induce hypoxic intestinal injury which is relevant to human necrotizing enterocolitis. % 100 CO₂ inhalation for ten minutes in a chamber followed 10 minutes of % 100 O₂ inhalation was the asphyxia model repeated twice daily. After hypoxia-reoxygenation and cold stress, newborn rats were returned to their mother's cages. 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 and examined macroscopically. A 3-cm section of distal ileum and 1 g liver tissues from each animal was taken for histopathological and biochemical examinations. Histologic changes in ileal architecture were scored and graded from 1 to 5 and epidermal growth factor receptors (EGFR) were evaluated immunohistochemically. The remaining intestinal tissues and liver tissues of the animals were used to measure the levels of malondialdehyde (MDA) and nitrit. Also, zinc levels were measured in all tissues by atomic absorption spectrophotometry.

Results: Typical signs of hypoxia induced intestinal injury were observed in groups 2 and 3, macroscopically. Histopathological grading and immunohistochemical EGFR evaluation showed less damage in group 3 compared to group 2 (p<.05). In group 2, MDA and nitrit levels in all tissues were increased (p<.001) and zinc levels were decreased (p<.001) in comparison to group 3.

Conclusion: Zinc pretreatment has a protective effect on hypoxia reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats.

Key words: Necrotizing Enterocolitis, Hypoxia-reoxygenation, Zinc

Giriş

Nekrotizan enterokolit (NEK) tüm prematür infantların % 1-7'sini etkileyen ve ölümcül olabilen bir gastrointestinal sistem hastalığıdır. NEK hastalarında alta yatan neden her zaman aynı değildir. Prematürite, hipoksi, yapay mama ile beslenme, bakteriyel enfeksiyon ve intestinal iskemi gibi risk faktörlerinin bildirilmiş olmasına rağmen hastalığın patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (4). İskemi reperfüzyon ve serbest oksijen radikal hasarının en önemli etiolojik faktör olduğu düşünülmektedir (17). İntestinal mukozada kan akımını azaltan ve oksijen ihtiyacını artıran hipoksi, trombosit aktive edici faktör miktarını artırarak ve serbest oksijen radikal hasarı yaparak NEK oluşumuna sebep olmaktadır (6,27). Hipoksinin hayvanlarda intestinal intrinsek ritmi ve mide boşalmasını geciktirdiği, spontan incebarsak ve mide kontraksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir (3,13,16,28). Bakteri translokasyonu riskini artıracak şekilde hipoksinin neden olduğu kontraksiyon azalması aynı zamanda izole edilmiş insan ince barsağında da gösterilmiştir (12).

Metal aspartatların serbest oksijen radikal hasarını engelledikleri bilinmektedir. Bu etkilerini hem serbest oksijen radikallerinin oluşumlarını, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz aktivitelerini azaltıp engellerek, hem de oluşmuş radikalleri temizleyerek yaparlar (1). Çinko komplekslerinin mide ve diğer organlardaki iskemi reperfüzyon hasarında antioksidan etkisi gösterildikten sonra aynı etkinin başka patolojilerde de görülüp görülmeyeceği merak edilmeye başlanmıştır (33,29,23).

Bu bilgiler ışığında, deneysel olarak yenidoğan ratlarda hipoksi reoksijenasyon oluşturarak ince barsak hasarına karşı çinko tedavisinin etkinliğini araştırmak istedik.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları: Bu çalışma Sprague-Dawley cinsi yenidoğan rat yavrularında yapıldı. Çalışma protokolü Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi deneysel araştırma etik kurulunda onaylandı. Hayvanlar ayrı kafeslerde anneleri ile birlikte standart koşullarda barındırıldı.

Deney Grupları: Ağırlıkları 180-210 gr arasında değişen ve gebe kalım zamanı bilinen 7 aylık rat doğum öncesi takibe alındı ve son iki günde habersiz bir doğum olmaması için dikkatle izlendi. Doğum sonrası 30 adet yavru rat NEK için koruyucu bir faktör olan anne sütünü almadan annelerinden deneysel işlem için ayrıldı ve sayıları eşit üç gruba bölündü. Grup 1, kontrol grubu; grup 2, hipoksi-reoksijenizasyon grubu, grup 3 çinko-hipoksi-reoksijenizasyon grubu olarak belirlendi. Ağırlıklar; grup 1'de 5,0-5,3g, grup 2'de 5,0-5,2g ve grup 3'de 4,9-5,1g idi.

Deneysel NEK Modeli: Grup 2 ve grup 3'deki yavrulara NEK oluşturabilmek için günde iki kez 10 dk. % 100 CO₂ ve 10 dk. % 100 O₂ solutularak hipoksik stres uygulandı ve ardından yavrular 10 dk. soğuğa maruz bırakıldı. Grup 3'deki yavru ratlara her gün deneysel işlemden 1 saat önce cilt altı enjeksiyonla 50 mg/kg "zinc bis DL Hydrogen Aspartate" (ÇA) verildi. Bu yöntem Okur ve arkadaşlarının uyguladığı metodun bir modifikasyonudur (22). Hipoksi-reoksijenizasyon ve soğuk uygulamasından sonra rat yavruları annelerinin yanına verildi ve uygun şartlarda (21-23°C) korundu. Yavrular işlem öncesi anne sütü almadılar ancak işlem sonrası anneleri tarafından beslendiler. İşlem üç gün tekrarlandıktan sonra yavrular dekapite edildi ve tüm gastrointestinal sistem çıkarılarak tipik NEK bulguları açısından incelendi (barsakta renk değişimi, barsakta kanama, ileal distansiyon, velveya ileal darlık). Histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için terminal ileumdan 3 cm uzunluğunda ince barsak ve 1 g karaciğer dokusu alındı. Histopatolojik araştırmada 1'den 5'e kadar derecelendirme ile ileum hasarı ve immünohistokimyasal boyama ile epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EBFR) bakıldı. Biyokimyasal incelemede; barsak ve karaciğer dokularında malondialdehit (MDA), bir nitrik oksit (NO) yan ürünü olan nitrit ve atomik absorpsiyon spektrofotometrisi ile çinko düzeyi ölçüldü

Histopatolojik İnceleme: Hayvanlardan alınan distal ileum numuneleri % 10'luk tamponlu formalin solüsyonunda fikse edildi. Bu dokulardan hazırlanan parafin bloklardan rutin hematoksil-eozin ve immünohistokimyasal boyamalar için 4-6 mikrometrik kesitler alındı. Hematoksil-eozin ile yapılan incelemede; ileum yapısındaki değişiklikler gruplardan

habersiz bir araştırmacı tarafından tipik NEK bulguları açısından derecelendirildi. Değerlendirme: Derece 1; normal histoloji, Derece 2; hidropik dejenerasyon veya yüzeysel epitelial hücrelerin lamina propriadan ayrılması, Derece 3; villus uçlarına sınırlı epitelyal hücre nekrozu, Derece 4; villus nekrozu, Derece 5; tam kat nekroz olacak şekilde yapıldı. Bu histopatolojik inceleme Caplan ve arkadaşlarının yaptığı sınıflamanın bir modifikasyonudur (6).

İmmünohistokimyasal boyamada kesitler ksilen içerisinde deparafinize edildikten sonra gittikçe azalan konsantrasyonlardaki etil alkol solüsyonları içerisinde rehidrate edilerek su içerisine getirildi. Daha sonra % 1'lik hidrojen peroksit ile muamele edildi. Kesitler 10 dakika sitrat tampon içerisinde kaynatılıp soğutulduktan sonra "Ultra V block" (NeoMarkers, CA, USA) ile inkübe edildi. Takiben, EGFR primer antikor (sc-03, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) 1/100 oranında dilüe edilerek 30 dakika boyunca kesitlere uygulandı. Otuz dakika sonunda "primer antikor tris buffer" ile yıkandı. Bundan sonra kesitler biotin- streptavidin immunperoksidaz yöntemiyle (UltraVision Slide Kit, NeoMarkers, CA, USA) boyandı. Zemin boyası olarak Mayer hematoksilen kullanıldı. Skuamöz epitelin bazal hücreleri pozitif kontrolü olarak seçildi. Negatif kontrol olarak da primer antikor yerine TBS kullanıldı.

İmmün boyama sonuçları körlemesine değerlendirildi. Genel boyanma sonucu; saptanabilir boyanma yok (-), hafif şiddette boyanma (+), orta şiddette boyanma(++), kuvvetli boyanma (+++), çok yoğun boyanma (++++) olacak şekilde sınıflandırıldı.

Lipid Peroksidasyon Analizi: Doku homojenatlarında lipid peroksidasyon ölçümü Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemi ile yapıldı (21). Homojenatlardaki protein içeriği Lowry ve arkadaşlarının metodu ile hesaplandı (18).

Nitrit ölçümü: Nitrit düzeyleri Griess yöntemine göre ölçüldü (11).

Doku çinko düzeyi ölçümü: Doku çinko düzeyleri flame yöntemi ile atomik absorpsiyon spektrofotometresinde (Perkin Elmer Analyst 800 Atomic Absorption Spectrometer) ölçüldü.

İstatistiksel İnceleme: Biyokimyasal değerler için önce Kruskal-Wallis testi uygulandı. Gruplar arasında fark olduğu görülünce gruplar post-hoc Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Histopatolojik inceleme sonuçları x2 testi ve Fisher kesin x2 testi ile değerlendirildi. $P < .05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

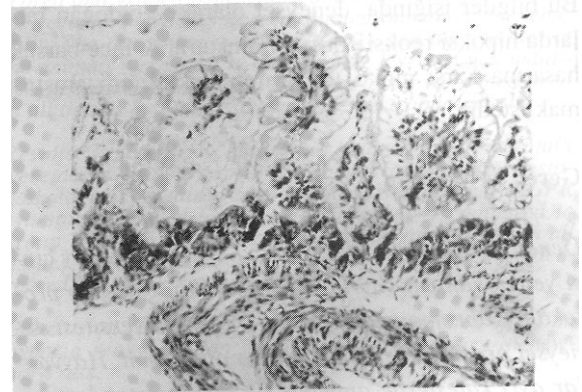
Deneyel model yenidoğan ratlar tarafından iyi tolere edildi. Dekapitasyon yapılarına kadar hiç bir deney hayvanı ölmedi.

Makroskopik İnceleme: NEK oluşturmak için deneyel işleme tabi tutulan grup 2 ve grup 3'deki hayvanlarda barsaklarda renk değişimi, barsak duvarında kanama veya distansiyon gibi belirgin NEK bulguları gözlenirken kontrol grubu (grup 1) hayvanlarda

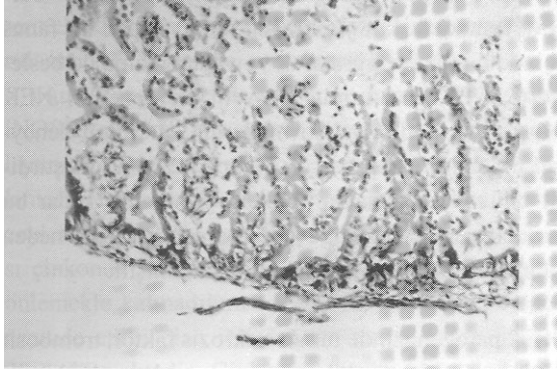
Tablo 1. Dokularda histopatolojik hasar derecelemesi.

Gruplar*	1.Derece	2.Derece	3.Derece	4.Derece	5.Derece
Grup 1 (n=10)	10	-	-	-	-
Grup 2 (n=10)	-	8	2	-	-
Grup 3 (n=10)	5	5	-	-	-

*Uygun istatistik yöntem uygulayabilmek için gruplarda 2. derece ve üstü hasarlar birleştirildi ve gruplar ikiye bölünerek karşılaştırıldı. Grup 2, grup 1'den farklı ($p < .001$), grup 3 grup 1'den farklı ($p < .05$), grup 2 grup 3'den farklı ($p < .05$).



Resim 1. Yüzeysel epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon (grup 3, hematoksilen-eozin x200).



Resim 2. Villusların uç kısımlarına lokalize kısmi villöz nekroz (grup 2, hematoksilin-eozin x200).

patolojik bulgu görülmedi.

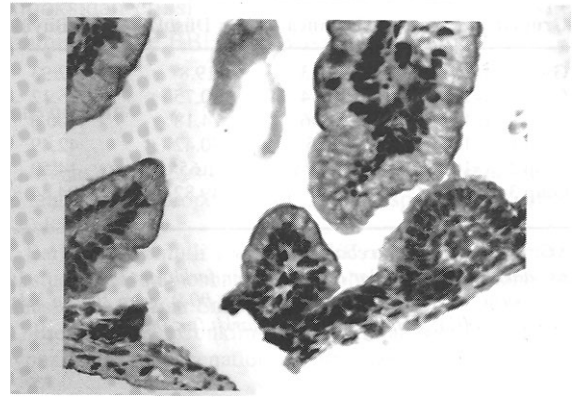
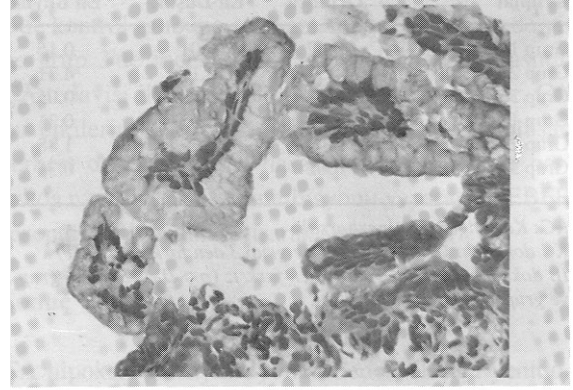
Histopatolojik inceleme: Hipoksi-reoksijenizasyon uygulanmış olan grup 2 ve grup 3 de H-E boyamalarda 2 ve 3. derece hasar gözlenirken kontrol grubu sonuçları normal idi. Grup 2'de, grup 3'den daha fazla 3. derece hasar vardı ($p < .05$, Tablo 1, Resim 1 ve 2). İmmunhistokimyasal incelemede grup 2 ve grup 3'de kontrol grubuna göre daha az immün boyanma görüldü (Tablo 2, Resim 3 A ve B). Grup 2'de immünhistokimyasal olarak EBFR boyanması grup 3'den daha azdı ($p < .05$).

Tablo 2. Dokularda EBFR immünhistokimyasal boyanması.

Gruplar*	-EBFR	+EBFR	++EBFR	+++EBFR	++++EBFR
Grup 1 (n=10)	-	-	-	9	1
Grup 2 (n=10)	-	8	2	-	-
Grup 3 (n=10)	-	4	1	5	-

*Uygun istatistik yöntem uygulayabilmek için gruplarda + ve ++ EBFR boyanmaları ile +++ ve ++++EBFR boyanmaları birleştirildi. Grup 2, grup 1'den farklı ($p < .001$); grup 3, grup 1'den farklı ($p < .05$); grup 2, grup 3'den farklı ($p < .05$).

Biyokimyasal İnceleme: Grup 2 ve grup 3'de barsak dokusu MDA seviyeleri artmış idi. Grup 2'de MDA seviyeleri grup 3'deki MDA seviyelerinden daha yüksekti ($p < .001$, Tablo 3). İncebarsakların nitrit düzeyleri grup 2 ve grup 3'de MDA sonuçlarına paralel olarak yükselmişti. Yine grup 2 nitrit düzeyleri grup



Resim 3. A. İmmunhistokimyasal + EBFR boyanması (grup 2, hafif boyanma, immunperoksidaz boyası, x400). B. İmmunhistokimyasal +++ EBFR boyanması (grup 3, şiddetli boyanma, immunperoksidaz boyası, x400).

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

Gruplar	Ortanca	En Düşük	En Büyük
Grup 1 (n=10) İB	0.25	0.18	0.37
Grup 2 (n=10) İB	2.02	0.62	3.89
Grup 3 (n=10) İB	0.41	0.24	0.61
Grup 1 (n=10) KC	1.64	0.52	3.10
Grup 2 (n=10) KC	8.92	6.57	9.74
Grup 3 (n=10) KC	1.07	0.08	1.82

KC: Karaciğer, İB: İncebarsak.

KC dokuları: Grup 2, grup 1 ve grup 3'den farklı ($p < .001$). İB dokuları: Grup 3, grup 1'den farklı ($p < .004$), grup 2, grup 1'den farklı ($p < .001$) ve grup 2, grup 3'den farklı ($p < .001$).

3'den daha yüksekti ($p < .001$, Tablo 4). Grup 3'de ince barsak dokularında çinko düzeyi kontrol değerlerinden fazla iken ($p < .004$) grup 2'de kontrol değerlerinin altına inmiş idi ($p < .001$, Tablo 5). Karaciğer

Tablo 4. Gruplarda doku nitrit (μ mol/mg/prot) analiz sonuçları.

Gruplar	Ortanca	En Düşük	En Büyük
Grup 1 (n=10) İB	0.07	0.01	0.15
Grup 2 (n=10) İB	1.37	0.10	4.71
Grup 3 (n=10) İB	0.03	0.02	0.05
Grup 1 (n=10) KC	0.21	0.01	0.31
Grup 2 (n=10) KC	0.43	0.32	1.88
Grup 3 (n=10) KC	0.02	0.01	0.34

KC: Karaciğer, İB: İncebarsak.

KC dokuları: Grup 2, grup 1 ve grup 3'den farklı ($p<.001$)

İB dokuları: Grup 1, grup 3'den farklı ($p>.05$). Grup 2, grup 3 ve grup 1'den farklı ($p<.001$).

Tablo 5. Gruplarda doku çinko düzeyleri (mg/g doku).

Gruplar	Ortanca	En Düşük	En Büyük
Grup 1 (n=10) İB	29.23	19.8	42.93
Grup 2 (n=10) İB	19.34	10.75	26.12
Grup 3 (n=10) İB	51.06	24.18	100.6
Grup 1 (n=10) KC	39.5	30.42	42.49
Grup 2 (n=10) KC	2.89	1.65	14.50
Grup 3 (n=10) KC	60.7	49.82	94.44

KC: Karaciğer, İB: İncebarsak.

KC dokusu: Tüm gruplar birbirlerinden farklı ($p<.001$).

İB dokusu: Grup 3, grup 1'den farklı ($p<.004$); grup 2, grup 1'den farklı ($p<.001$); grup 3, grup 2'den farklı ($p<.001$).

dokularında yine grup 2'de MDA ve nitrit düzeyleri diğer gruplardan yüksekti ($p<.001$).

Tartışma

NEK prematüre infantların gastrointestinal sisteminin en sık görülen hastalığıdır ve ölümcül seyrebilir. Son yıllarda görülme sıklığı giderek artmaktadır. Hastalığın ölümcül seyretme sıklığı % 10-50 arasında değişmektedir. Tam kat barsak nekrozu gelişen durumlarda ölüm oranı çok artmaktadır (14,24). Bir çok risk faktöründen bahsedilmekle birlikte hastalığın patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Prematürite, hipoksi, yapay mama ile besleme, bakteriyel enfeksiyon ve intestinal iskemi bilinen önemli risk faktörleridir (4). Klinik olarak perinatal veya neonatal hipoksinin NEK gelişimi ile olan ilişkisi iyi bilinmemektedir.

Yenidoğan yavrularla yapılan birçok hayvan deneyinde hipoksinin NEK oluşumuna olan etkileri araştırılmıştır. Karna ve arkadaşları yenidoğan domuzlar-

ra hipoksi uygulayarak hipoksinin ince barsak hipoperfüzyonu oluşumunda iskemi ve asidozdan daha önemli bir etken olduğunu göstermişlerdir (15). Barlow ve arkadaşları yenidoğan ratları kapalı bir fanus içinde hipoksiye uğratarak ve yapay mama ile besleyerek NEK oluşturmuş ve yeni bir deneysel NEK oluşturma modeli geliştirmişlerdir (2). Bu tür deneysel modellerin incebarsak hipoperfüzyonu geliştirdiği bildirilmiş olmakla beraber, günümüze kadar bu modellerin oluşturduğu ince barsak hasarına neden olan spesifik bir mediatör bulunamamıştır.

NEK patogenezinde tümör nekrozis faktör, trombosit aktive edici faktör, lökötrienler ve serbest oksijen radikallerinin rol oynadıkları bildirilmiştir (6,5,7,10). Perinatal asfiksi NEK ilişkisi ve intestinal iskemi oluşturularak yapılan deneysel NEK modelleri NEK patogenezinde serbest oksijen radikal hasarının önemini vurgulamıştır (8,26). Süperoksit dizmutaz ve katalaz tedavisinin trombosit aktive edici faktör verilen yetişkin ratlarda incebarsak hasarını azalttığı gösterilmiştir (9). Miller ve arkadaşları tavşanlarda oluşturulmuş bir deneysel NEK modelinde süperoksit dizmutazın barsak hasarı oluşumunu önlediğini göstermiştir (19).

Serbest oksijen radikalleri, hücre hasarını hücre membranında ve mitokondri membranında çözülmemiş yağları perokside ederek oluşturmaktadırlar. ÇA serbest oksijen radikal oluşumunu ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz enzimlerini inhibe ederek engellemekte ve oluşmuş serbest oksijen radikallerini de temizlemektedir. Bunu süperoksit iyonlarının spontan dismutasyonunu artırarak yapmaktadır. ÇA ayrıca çok reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumunu inhibe edici özelliğindedir (1). Grup 3'de grup 2'ye kıyasla ince barsak dokularında MDA ve nitrit düzeyleri daha düşük çıkmıştır. Bu hipoksi reoksijenizasyon ve soğuk stres uygulamasından önce cilt altı yolu ile ÇA verilen grup 3'deki rat yavrularında ince barsak hasarının aynı işleme tabi tutulan grup 2'deki yavrulardan daha az olduğunu göstermektedir. Histopatolojik incelemede grup 3'deki hayvanlarda daha düşük dereceli ince barsak hasarı görülmesi biyokimyasal sonuçlar ile uyumludur.

Nadler ve arkadaşları yapay besleme ve hipoksi uygulaması ile rat yavrularında deneysel olarak NEK oluşturmuşlar ve hasarlı incebarsaklarda nitrik oksit

sentaz-mRNA (iNOS mRNA) artışı tespit etmişlerdir (20). Bu bulgu deneysel NEK modellerinde barsak hasarı oluşumuna nitrik oksitinin de etki ettiğini göstermektedir. Zhang ve arkadaşları yenidoğan rat yavrularına sadece hipoksi uygulayarak incebarsak hasarını oluşturmuşlar ve hasarlı ince barsak dokusunda iNOS artışı olduğunu göstermişlerdir (34). Bizim çalışmamızda da NEK sadece hipoksi ve soğuk uygulaması ile oluşturuldu. NO yan ürünü olan nitrit düzeylerinin grup 3'de grup 2'ye kıyasla daha az olması çinkonun sadece serbest oksijen radikal hasarını önlemekle kalmadığını aynı zamanda NEK patogenezinde etkili olan iNOS aktivitesini de azalttığını düşündürmektedir. Çinkonun incebarsağın inflamatuvar hastalıklarında iNOS aktivitesini azalttığı daha önce bildirilmemiştir. Ancak derinin bazı inflamatuvar hastalıklarında çinkonun iNOS aktivitesini azalttığı bilinmektedir (32). Çinkonun iNOS aktivitesi üzerine olan bu etkisi NEK gibi barsak hastalıklarında da söz konusu olabilir. Bunun yanı sıra bu etki çinkonun serbest oksijen radikal hasarını azaltmasına bağlı dolaylı bir sonuç da olabilir. Çinkonun bir çok enzimatik reaksiyonda görev alan bir metal olduğu düşünülürse bu bilinmezliğin daha ileri araştırmalarla aydınlatılması gerektiği anlaşılır.

“Epidermal Büyüme Faktörü” (EBF) barsak mukozası hasarını rejener eden ve incebarsak sendromunda, geride kalan barsakta emilim yüzeyini artıran bir hormondur. Barsak mukozasında bulunan reseptörlerine bağlanarak etki eder. Çinkonun EBFR aktivitesini artırdığı bilinmektedir (31,15,30). Bu nedenle biz bu çalışmada histopatolojik hasarlanmayı H-E boyama ile derecelerken immunhistokimyasal olarak barsak mukozasında EBFR dağılımına da baktık. Çinko verilen grup 3'de immunhistokimyasal olarak grup 2'den daha fazla boyanma görüldü. Bu bulgu bize deneyin yapıldığı üç gün boyunca çinko grubunda barsak mukozası rejenerasyonunun daha fazla olduğunu düşündürdü.

Grup 3'deki incebarsak MDA ve nitrit düzeyinin grup 2'deki MDA ve nitrit düzeylerinden daha düşük olması, histopatolojik olarak doku hasarının grup 3'de grup 2'den daha az olması ve grup 3'de artmış EBFR boyanması varlığı hipoksik stres öncesi uygulanan ÇA tedavisinin hipoksi-reoksijenasyonun neden olduğu yenidoğan rat ince barsak hasarını azalttığını düşündürmektedir. Karaciğerde bakılan MDA

ve nitrit ölçümleri yine hipoksik stresin grup 2'de daha fazla olduğunu desteklemektedir. Grup 3'de doku çinko düzeylerinin yükselmiş olmasına rağmen grup 2'de kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu bulgu da yine grup 3'de incebarsak hasarının daha az olmasının ÇA tedavisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. ÇA bu etkilerini hipoksi-reoksijenasyon sonrası oluşan serbest oksijen radikal hasarını azaltarak, ince barsakta muhtemel iNOS inhibisyonu yaparak ve EBFR reseptör aktivitesini artırarak yapmaktadır.

Sonuç

ÇA hipoksi-reoksijenasyonun neden olduğu yenidoğan rat ince barsak hasarını azaltmaktadır. Bu ÇA'nın antioksidan etkisi yanında muhtemel iNOS aktivite inhibisyonu ve EBFR aktivasyonu ile olmaktadır.

Kaynaklar

1. Afanas'eV IB, Suslova TB, Cheremisina ZP, et al: Study of antioxidant properties of metal aspartates. *Analyst* 120:859, 1995
2. Barlow B, Santulli TV, Heird WC, et al: An experimental study of acute neonatal enterocolitis--the importance of breast milk. *Pediatr Surg* 9:587, 1975
3. Bielefeldt K, Conklin JL: Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig Dis Sci.* 42:878, 1997
4. Caplan MS, MacKendrick W: Necrotizing Enterocolitis: A review of pathogenetic mechanisms and implications for prevention. *Pediatr Pathol* 13:357, 1993
5. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W, et al: Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 116:960, 1990
6. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W: Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: the role of platelet activating factor (PAF-acether). *Gastroenterology* 99:979, 1990
7. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W: Hypoxia, PAF, and necrotizing enterocolitis. *Lipids* 26:1340, 1991
8. Crissinger KD, Granger DN: Mucosal injury induced by ischemia and reperfusion in the piglet intestine: influences of age and feeding. *Gastroenterology* 97:920, 1989
9. Cueva JP, Hsueh W: Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 9:1207, 1988
10. Furukawa M, Lee EL, Johnston JM: Platelet-activating factor-induced ischemic bowel necrosis: the effect of platelet-activating factor acetylhydrolase. *Pediatr Res* 34:237, 1993
11. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al: Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131, 1982
12. Hayashi S, Gleason WA, McFee AS, et al: Effects of pH alterations and hypoxia on isolated human intestine. *Scand J Gastroenterol* 21:9, 1986
13. Hebra A, Brown MF, McGeehin K, et al: The effects of

ischemia and reperfusion on intestinal motility. *J Pediatr Surg* 28:362, 1993

14. Holman RC, Stehr-Green JK, Zelasky MT: Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979-85. *Am J Public Health* 79:987, 1989

15. Karna P, Senagore A, Chou CC: Comparison of the effect of asphyxia, hypoxia, and acidosis on intestinal blood flow and O₂ uptake in newborn piglets. *Pediatr Res* 20:929, 1986

16. Kowalewski K, Zajac S, Kologej A: Effect of ischemic anoxia on electrical and mechanical activity of the totally isolated porcine stomach. *Eur Surg Res* 8:12, 1976

17. Langer JC, Sohal SS, Mumford DA: Mucosal permeability in the immature rat intestine: effects of ischemia-reperfusion, cold stress, hypoxia, and drugs. *J Pediatr Surg* 28:1380, 1993

18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:165, 1951

19. Miller MJ, McNeill H, Mullane KM, et al: SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in a rabbit model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol* 255:G556, 1988

20. Nadler EP, Dickinson E, Knisely A, et al: Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. *J Surg Res* 92:71, 2000

21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351, 1979

22. Okur H, Küçüaydın M, Köse K, et al: Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E *J Pediatr Surg* 30:1416, 1995

23. Özkan KU, Boran C, Kılınç M, et al: The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg* 39:91, 2004

24. Rowe MI, Reblock KK, Kurkchubasche AG, et al: Necrotizing enterocolitis in the extremely low birth weight infant. *J Pediatr Surg* 29:987, 1994

25. Samet JM, Dewar BJ, Wu W, et al: Mechanisms of Zn(2+)-induced signal initiation through the epidermal growth factor receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 15:86, 2003

26. Santulli TV, Schullinger JN, Heird WC, et al: Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics* 55:376, 1975

27. Saugstad OD: Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res* 23:143, 1988

28. Szabo JS, Stonestreet BS, Oh W: Effects of hypoxemia on gastrointestinal blood flow and gastric emptying in the newborn piglet. *Pediatr Res* 9:466, 1985

29. Tons C, Kolesterhalfen B, Klein HM, et al: Induction of heat shock protein 70 (HSP70) by zinc bis (DL-hydrogen aspartate) reduces ischemic small-bowel tissue damage in rats. *Langenbecks Arch Chir* 382:43, 1997

30. Wu W, Graves LM, Gill GN, et al: Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J Biol Chem* 277:24252, 2002

31. Wu W, Samet JM, Silbajoris R, et al: Heparin-binding epidermal growth factor cleavage mediates zinc-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:540, 2004

32. Yamaoka J, Kume T, Akaike A, Miyachi Y: Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon-gamma or tumor necrosis factor-alpha in murine keratinocytes. *J Dermatol Sci* 23:27, 2000

33. Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, et al: Effect of zinc-carnosine chelate compound (Z-103), a novel antioxidant, on acute gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res Commun* 14:289, 1991

34. 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* 15:53, 2003