

Yenidoğanda Perinatal Hipoksinin İnce Barsak Histolojik Yapısına Etkileri: Elektronmikroskopik Çalışma

Utku Ateş, Meral Baka, Gülperi Öktem, Yiğit Uyanıklı

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D., 35100, BORNOVA - İZMİR

ÖZET

Yenidoğanda multiorgan hasarlanmasına neden olan maternal hipoksi, hem anne hem de fetus için önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir. Wistar Albino dişi sıçanlarda geç prenatal dönemde noniskemik hipoksi modeli oluşturularak, maternal hipoksik travmanın yenidoğan ince barsak dokusuna etkileri transmisyon elektron mikroskop ile incelendi. Kontrol grubunda ince barsak histolojik yapısında herhangi bir patolojik bulguya rastlanmazken deney grubunun ince barsak dokularının ışık ve elektron mikroskop incelemelerinde; bez epiteline komşu lamina propria'da ödem, epitelde kalınlaşma, epitel hücrelerinde çok sıralı görünüm ve mitokondrielerde histopatolojik değişiklikler ve bazal hücrelerde sitoplazma kaybına rastlanması geç prenatal dönemde annenin yaşadığı hipoksik travmanın fetusun ince barsaklarında hücresele bir zedelenmeye neden olduğunu göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, yenidoğan, ince barsak, mukoza

SUMMARY

EFFECTS OF PERINATAL HYPOXIN ON THE HISTOLOGY OF NEONATAL INTESTINE; ELECTRON MICROSCAPIC STUDY

Maternal hypoxia that cause multiple organ injuries in newborns is one of the biggest reason of mortality and morbidity for both mother and the fetus. The experimental model of non ischemic hypoxia was induced to Wistar Albino pregnant rats in their late gestational period to study the effect of maternal hypoxic trauma on newborns small intestine tissue by transmission electron microscopy. While in control group there was not any pathological findings in small intestine tissue, light and electron microscopy observations of experimental group showed; edema in lamina propria layer in the neighborhood of gland epithelium, thickening of epithelium, multilayer view of epithelial cells, histopathological changes in the mitochondria and cytoplasm loss in basal cells is concluded as the sign of cellular damage in small intestine tissue of fetus caused by maternal hypoxic trauma in the late prenatal period.

Key Words: Hypoxia, newborn, small intestine, mucosa

GİRİŞ

Prenatal dönemde yaşanan hipoksik travma yenidoğanda çeşitli patolojilerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Dokunun yeterince oksijenlenememesiyle birlikte, enerji metabolizmasında meydana gelen değişiklikler sonucunda oluşan serbest oksijen reaktifleri meydana gelen doku hasarında önemli bir yer tutmaktadır. Serbest radikaller ve diğer oksijen derivelere reperfüzyon periyodunda kapiller permabiliteyi artırarak hasara neden olmaktadır (1-2). Dokuda adenosin trifosfat (ATP) miktarı azalmakta ve biriken adenosin molekülleri aşırı oranda yıkıma uğramaktadır. Ayrıca normal koşullarda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumuna yol açmayan ksantin dehidrogenazın, hipoksik koşullarda aşırı adenosin yıkımı sonucu oluşan hipoksantin'in enzimatik yıkımı sırasında SOR üretimine neden olduğu bildirilmektedir (3-4).

Organizmada oksidatif mekanizmalar sonucu oluşan SOR, aşırı üretim veya vücuttaki oksidan/antioksidan dengenin bozulması durumunda; protein, lipid, karbonhidrat ve nükleotid gibi biyomolekülleri etkileyerek zararlı etki göstermeye başlamaktadır (5-6).

Etiyopatogenezinde hipoksi olduğu düşünülen önemli yenidoğan hastalıklarından biri Nekrotizan Entero-kolit'dir (NEK). NEK, yenidoğanda yüksek mortalite oranıyla seyreder, özellikle prematüre bebekler için ölümcül olabilir (7). Kilosu 1500 gr altında olan prematürelerin %12'sinde, yoğun bakımda takip edilen yenidoğanların %15'inde, NEC olduğu kabul edilmektedir (8). Lloyd ve ark., hipoksinin, insanda ve diğer memeli türlerinde ince barsaktaki kan akımında azalma meydana getirerek patojik değişikliklere neden olabileceğini söylemişlerdir. İskemi ve hipoksiye bağlı oluşan hasarlanmada endotel ve epitel bariyer bütünlüğünün bozul-

duğu gözlenmiştir (9-10). Hipoksi fagositik sistemi akti- ve etmekte ve bariyer hasarını arttırmaktadır. Bunun so- nunda bakteriyel translokasyon oluşmakta ve organda fonksiyon bozukluğu meydana gelmektedir (11).

GEREÇ VE YÖNTEM

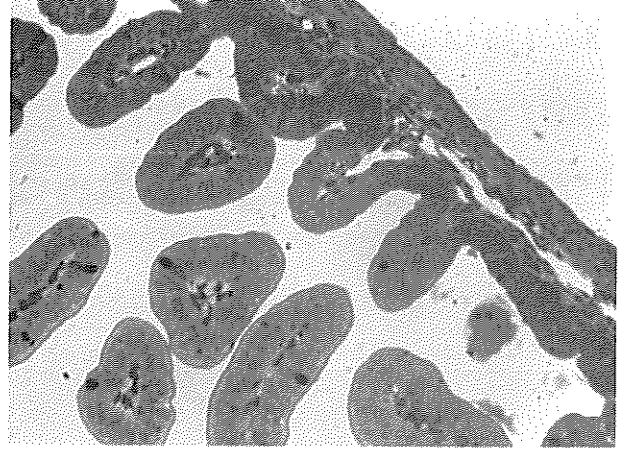
Bu çalışma; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'nun onayı ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları 200-220 gr. arasında değişen Wistar Albino dişi sıçanlar ile yapıldı. Estrus siklus tayini için günlük vaginal smearlar alındı. Proestrus döneminin gecesinde fertil erkek sıçanlarla çiftleştirildi. Kontrol grubu olarak seçilen (n=6) sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadan hamilelikleri takip edildi. Denek grubu için seçilen hamile sıçanlar ise doğum yaptıkları döneme yakın, hava geçirmeyen Plexiglas odaya alındı ve ortama % 100 CO₂ 5 dakika boyunca perfüze edildi. Tüm hayvanlarda; nefes almada güçlük, siyanoz ve 5. dakika sonuna doğru defekasyon gözlemlendi. Daha sonra ayrı kafeslerde izole edilen sıçanların hamilelikleri takip edildi ve doğum yapımları beklenildi. Doğumdan hemen sonra letal dozda ketalar (0.15 mg / 100 gr.) + rompun (0.02 ml/100 gr.) ile anestezi edilen yenidoğan sıçanlar intrakardiyak perfüzyon ile tespit edildi. Fiksatif olarak, 0.1 M cacodylate tamponlu %2'lik glutaraldehit ve %2'lik paraformaldehit solüsyonu kullanılarak elektron mikroskopi için fiksasyon sağlandı. Dis- ke edilen ince barsaklar aynı içerikli taze fiksatifte 24 saat daha bekletildi. Rutin takibi yapılan parçaların epon blokları elde edildi. Epon bloklardan Reichert Austria Nr.313864 ultramikrotomda alınan yarı ince kesitler (1 mikron) ışık mikroskopi için Toluidine blue; elektron mikroskopi için uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. İnce kesitler Zeiss EM-9 Transmisyon Elektron Mikrosko- bu'nda incelenerek, elektronmikrograflar elde edildi.

BULGULAR

Kontrol grubu ışık mikroskop bulgularında; ince bar- sak mukoza epitel dokusunda normal bir sıralanma izlen- di. Goblet hücreleri yetişkin ince barsak dokusuna oranla az sayıda olmasına karşın, içeriğinde salgı granüllerine rastlanmadı. Lamina propria'nın bağ dokusu hücrelerin- den ve doku iskeletinden zengin olduğu görüldü (Şekil 1).

Deney grubunun ışık mikroskop bulgularına baktığı- mızda, bez epiteline komşu lamina propriada hafif öde- me rastlandı. Epitelde kalınlaşma ve epitel hücrelerinde çok sıralı görünüm yanısıra villuslarda düzleşmeler mevcuttu. Goblet hücrelerinin oldukça az sayıda olduğu saptandı. Lamina propriada ise çok sayıda heterokro- matik nükleuslu hücrenin bulunduğu görüldü (Şekil 2).

Kontrol grubuna ait elektron mikroskop görüntüle- rinde; goblet hücrelerinde salgı granülleri yoğun, hü-



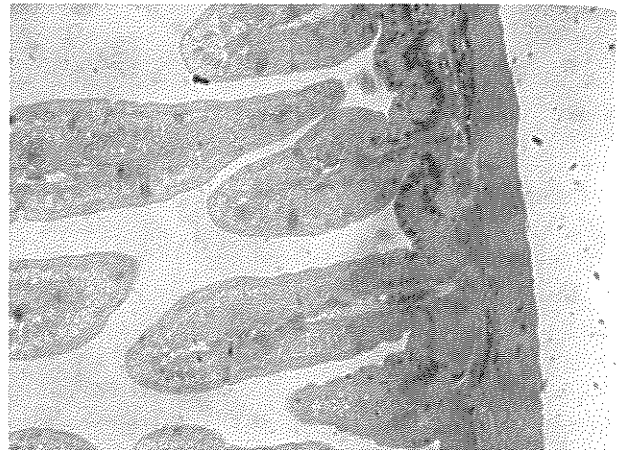
Şekil 1. Kontrol grubu Toluidine Blue (X 20)

reler düzgün sınırlı ve bazal enterositler normal olarak değerlendirildi (Şekil 3).

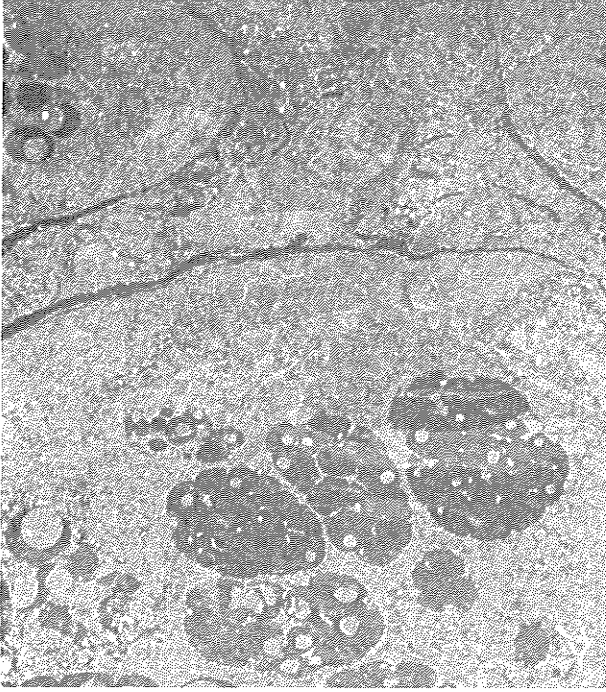
Deney grubuna ait elektron mikroskopik inceleme- de; az sayıda salgı granüllerine ve lamina propriada öde- me rastlandı. Bazal hücrelerde sitoplazma kaybının olduğu görüldü. Mikroviluslar bir miktar düzleşmişti. Bunun- la beraber belirgin değişiklik enterosit mitokondrilerinde görüldü. Mitokondriler daha çok golgi cisimciği ve peri nükleer zonda birikmişti. Belirgin olarak şişmiş ve yuvar- laklaşmıştı. Mitokondriyal kristallerin sınırları düzgün ola- rak seçilemiyordu ve vakuolizasyonu artmıştı (Şekil 4).

TARTIŞMA

Bilimsel alandaki tüm yeniliklere ve gelişen teknoloji- ye rağmen doğum sırasında yaşanan hipoksiye bağlı ola- rak ciddi sorunlar yaşanmaya devam etmektedir. Doğum sırasında yaşanan hipoksi, yenidoğanda gastrointestinal sistem arterial kan akımında azalma meydana getirerek barsak mukozasında hasarlanmaya neden olmaktadır. Hi- poksi, hücre hasarı ve hücre ölümünün en önemli ve en sık nedenlerindedir Hipoksinin süresi hasarlanmanın ge-



Şekil 2. Deney grubu Toluidine Blue (X 20)



Şekil 3. Kontrol grubu yenidoğan ince barsak dokusu TEM x5200



Şekil 3. Deney grubu TEM x5200

ri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olmasını tayin eder. Belli noktaya kadar, farklı hücre tiplerinde değişken olmak üzere zedelenme tamir edilebilir ve kan akımının düzeltilmesi ile oksijen ve metabolik maddeler tekrar uygun hale gelirse hücre iyileşebilir. Hipoksik süreç uzar, hücre yapısı bozulmaya devam eder ve hücre enerji üretimi onarılamazsa hücrede ATP tükenir. Hücrede enerji oluşturmadaki yetersizlik, geri dönüşümsüz noktayı gösterir ve reperfüzyon olsa da hasarlı hücre kurtulamaz (12).

Hipoksik bir süreçte hücrede görülen ilk histopatolojik değişiklik hücre şişmesidir ve geri dönüşümlü bir

olaydır. Işık mikroskopik olarak tanınması zordur ve yaygın olarak etkilenen organın tümünde rastlanabilir. Hipoksiye maruz kalan hücrelerin sitoplazmalarında küçük şeffaf vakuoller görülür. Bu öldürücü olmayan zedelenme, hidropik dejenerasyon veya vakuoler dejenerasyon olarak da isimlendirilir.

Gerri dönüşümlü hücre zedelenmesinde: (tomurculanma, yuvarlaklaşma, mikrovillusların şeklinin bozulması, myelin figür oluşumu, hücreler arasında bağların gevşemesi gibi) plazma membran değişiklikleri; (şişme, erime, küçük fosfolipidden zengin amorf dansitelerin görülmesi gibi) mitokondrial değişiklikler; (dilatasyon, polisomların ayrılması ve kümelenmemesi gibi) endoplazmik retikulumda değişiklikler; (granüler ve fibriller elemanların ayrılması gibi) nükleer değişiklikler ultrastrüktürel olarak gözlemlenebilir.

Memeli hücreleri glikolitik yeteneklerine rağmen uzun süreli yaşam için oksidatif metabolizmaya zorunlu olarak bağımlıdır. Mitokondriler, hücresel solunum için temel organellerdir ve vücuttaki oksijenin %90'dan fazlasını tüketirler. Dolayısıyla hipoksiden en fazla zarar gören organel mitokondridir ve mitokondrinin tamir edilemez hasarı ise hücre ölümüne neden olur. Yenidoğan memeli hücrelerinin, anneye bağımlı oksijenlenme dönemi olan intrauterin hayata ve özellikle oksijene serbestçe ulaşılabilen extrauterin hayata başarılı bir şekilde adaptasyonu için normal ve zamanında gelişim gösteren mitokondrilere sahip olması gerekmektedir. Perinatal dönem esnasında sıçan hücrelerinin mitokondrilerinin yapısal ve fonksiyonel olarak belirgin değişiklikler geçirdiği gösterilmiştir. Bu süreç, mitokondrial proliferasyon, mitokondrial sayı artımı ve organel farklılaşmasını içermektedir (13,14,15,16,17).

Mitokondriyal proliferasyon normal yaşam boyunca devam eden bir süreçtir. Doğumdan sonraki mitokondriyal enzimatik aktivitelerin indüksiyonu ortamdaki organellerin proliferasyonu ile sağlanmaktadır (13,14,18,19,20,21). Farklılaşmanın aksine, proliferasyon protein sentezinin transkripsiyonel düzeyinde kontrol edilir (22). Mitokondrial farklılaşma sıçanlarda doğumdan hemen sonra postnatal birinci saat içinde çok hızlı bir şekilde oluşmaktadır (16,18,23,24,25). Bu farklılaşma sürecinde, var olan mitokondriler ultrastrüktürel, moleküler ve fonksiyonel olarak karakteristik yapılarını kazanırlar. En göze çarpan değişiklik doğumdan hemen sonra meydana gelen solunum kontrol fonksiyonundaki artıştir (23,24,26).

İskemi sürerse geri dönüşümsüz hasar meydana gelir. Gerri dönüşümsüz zedelenme morfolojik olarak; mitokondrilerde şiddetli şişme, plazma membranında aşırı hasar ve lizozomda şişme ile karakterlidir. Mitokondriyal matrikste büyük, kümeleşmiş amorf dansiteler gelişir. Membranlardan protein, enzim, koenzim ve ribonükleik asitlerin kaybı vardır. ATP'nin oluşumu için gerekli metabolitler de kaybedilmeye başlanır ve yüksek

enerjili fosfatların daha fazla kaybına neden olur. Bu dönemde lizozomal membranlarda hasar gelişmesi sonucunda lizozomal enzimler sitoplazmaya kaçır. Bu enzimlerin aktivasyonu ise hücrenin komponentlerinin enzimatik sindirilmesine yol açar. Hipoksik zararlanma sonucunda mitokondrilerde meydana gelen şekilsel bozukluklar, enerji mekanizması, enzim sentezi, besin transportu gibi mitokondrilerin görev üstlendiği birçok işlevde de aksamalara neden olmaktadır.

Bazı durumlarda, önceden iskemiye maruz kalmış ve ölmemiş, fakat biokimyasal olarak etkilenmiş hücrelerdeki zedelenme, kan akımı düzeltilildiğinde paradoksal olarak artar ve hücre zedelenmesi hızlanmış olarak ilerler ve hücreler kaybolmaya devam eder. İskemik reperfüzyon adı verilen bu olay geri dönüşümsüz olarak hücreyi ölüme götürür (12).

İskemi ve hipoksiye bağlı oluşan hasarlanmada endotel ve epitel bariyer bütünlüğünün bozulduğu (9-10) ve hipoksinin fagositik sistemi aktive ederek bariyer hasarını arttırdığı, bunun sonunda oluşan bakteriyel translokasyonun organda fonksiyon bozukluğu meydana getirdiği söylenmektedir (11).

Yapılan çalışmalar, iskemik olaylarda gözlenen ince barsaklardaki histopatolojik değişikliklerin insan NEK'de görülen değişikliklerle benzer olduğunu göstermektedir (27). Ayrıca hipoksinin, NEK patogenezinde etkili olduğunu, hipoksi-reoksijenasyon döneminde çeşitli hücrelerin aktive olarak lökotrienler, serbest radikaller, histamin ve prostaglandinlerin ortama salınmasına neden olduklarını söyleyen çalışmalara rastlanmıştır (28-29).

Bu çalışmada ışık mikroskopik olarak bez epiteline komşu lamina propriada hafif ödem, epitelde kalınlaşma, epitel hücrelerindeki çok sıralı görünümün yanısıra villuslardaki düzleşmeler ve Goblet hücrelerinin oldukça az sayıda olmasının yanısıra elektron mikroskop bulgularında saptanan özellikle mitokondrilerdeki histopatolojik değişiklikler, lamina propriadaki ödem ve bazal hücrelerdeki sitoplazma kaybı perinatal dönemde annenin yaşadığı hipoksik travmanın, plasental yolakla fetusun ince barsaklarında NEK'dekine benzer hücresel bir zedelenme yarattığının göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Çalışmamızda; prenatal dönemin sonunda dahi annenin yaşadığı hipoksik travma sonucu yenidoğanlarda hücre zedelenme bulgularına rastlanması; embriyonik gelişim sürecindeki hassas hücresel farklılaşmaların neticesinde tüm organların geliştiği göz önüne alındığında, çeşitli nedenlerle yaşanan hipoksik travmaların, özellikle tüm organ taslaklarının geliştiği erken embriyoner dönemde meydana gelmesi; yenidoğanda minor sistem bozukluklarından düşüklere kadar geniş bir yelpazede patolojilere neden olabileceğinin bir işareti olarak yorumlandı. Bu nedenle her gebelikte fetusun oksijenlenmesi rutin olarak monitorize edilerek oksijenlenmeyi bozabilecek olası nedenler ortadan kaldırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Cassutto BH, Misra HP, Pfeiffer CJ. Intestinal post-ischemic reperfusion injury: studies with neonatal necrotizing enterocolitis. *Acta Physiol Hung.*;73(2-3):363-9, 1989.
2. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol.*; 17(2): 145-152, 1985.
3. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-oksidan dengesini etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*; 11: 336-341, 1998.
4. Kurtuluş H, Eskiocak S, Tütüncüler F. Deneysel hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda N-asetil sistein uygulamasının etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*; 28 (2):40-44, 2003.
5. Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*; 133(4): 537-556, 2002.
6. El-Bassiouni EA, Abo-Orlo MM, Helmy MH, Ismail S, Ramadan M. Changes in the defense against free radicals in the liver and plasma of the dog during hypoxia and/or halothane anesthesia. *Toxicology*; 128(1): 25-34, 1998.
7. Okur H, Küçükaydın M, Köse K, Kontas O, Doğan P, Kazez A. Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: The role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg*; 30:1416-1419, 1995.
8. Neu J. Nekrotizing enterokolitis. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43:409-432
9. Musemeche CA, Baker JL, Feddersen RM: A model of intestinal ischemia in the neonatal rat utilizing superior mesenteric artery occlusion and intraluminal platelet-activating factor. *J surg Res*; 58:724-727, 1995.
10. Karna P, Senagore A, Chou CC: Comparison of the effects of asphyxia, hypoxia, and acidosis on intestinal blood flow and oxygen uptake in newborn piglets. *Pediatric Res*; 20: 929-932, 1986.
11. Sun Z, Wang X, Deng X, Borjesson A, Wallen R, Hallberg E, Andersson R. Phagocytic and intestinal endothelial and epithelial barrier function during the early stage of small intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock*; Mar; 13 (3): 209-16, 2000.
12. Kumar V, Cotran R, S. Robbins S. L., Basic Pathology, sixth edition, ss. 4-24 W.B Saunders Company; Philadelphia, 2000.
13. Rohr H.P., Wirz A., Henning L.C., Riede V.N. and Bianchi L. *Lab. Invest.* 24, 128-139, 1971.
14. Hommes F.A.: Normal and Pathological Development of Energy Metabolism (Hommes F.A. and Van den Berg C.J., Eds.); s.1-9, Academic Press, London 1975.
15. Pollak J.K. and Sutton R.; *Trends Biochem. Sci.*; 5, 23-27, 1980.
16. Cuezva J.M. et al., Eds.: *Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonate*, s.113-135, Plenum Press, New York 1990.
17. Cuezva J.M. et al; *J. Bioenerg. Biomembr.*29, 365-377, 1997.
18. Aprille J.R.: *Mitochondrial Physiology and Pathology* (Fiskum, G., Ed.), s.66-99. Van Nostrand Reinhold Co., NewYork 1986.
19. Pollak J.K. and Duck-Chong, C.G. *Enzyme* 15, 139-160, 1973.
20. Aprille J.R. and Asimakis, G.K; *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 564-575, 1980.
21. David H.; *Exp. Pathol.* 17, s.359-373, 1979.
22. Izquierdo J.M., Ricart J. and Cuezva J.M. *J. Biol. Chem.* 270, s.10342-10350, 1995.
23. Valcarce C., Navarrete R.M., Encabo P., and Cuezva, J.M. *J. Biol. Chem.* 263, s.7767-7775, 1988.
24. Almeida A., Lopez-Mediavilla C., Orfao A. and Medina, J.M *FEBS Lett.* 344, s.50-54, 1994.
25. Almeida A., Lopez-Mediavilla C. and Medina J.M. *Endocrinology* 138, s.764-770, 1997.
26. Pollak J.K.; *Biochem. J.* 150, 477-488, 1975.
27. Allabadi S.,Choe EU, Flint LM. Post-treatment dexamamine infusions partially reverse reductions in cranial m.; *The American Surgeon*; 65 (6); Health Module ss.548, Jun 1999.
28. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W.; Hypoxia, PAF and nekrotizing enterokolitis. *Lipids*; 26:1340-1343, 1991.
29. Akisü M, Baka M, Çoker I, Kültürsay N, Hüseyinov A.; Effects of dietary n-3 fatty acids on hypoxia-induced nekrotizing enterokolitis in young mice. *Biol Neonate*; 74:31-38, 1998.