

İntestinal iskemi reperfüzyon hasarında Nörotensin'in etkisi

The effect of Neurotensin on intestinal ischemia reperfusion injury

Dr. Emin GÜRLEYİK¹, Dr. Günay GÜRLEYİK¹, Dr. İrfan CAN¹, Dr. Ali ÖZCAN²
Dr. Pembegül GÜNEŞ³, Dr. İlhan ONARAN²

Haydarpaşa Numune Hastanesi 4. Genel Cerrahi Kliniği¹ ve Patoloji Laboratuvarı²
GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Biyokimya Ana Bilim Dalı³, İstanbul

ÖZET: İnce barsak mukozasında kan akımını ve hücrel proliferasyonu, enterositlerde DNA, RNA ve protein sentezini artıran hormon olarak bilinen Nörotensin'in (Nt) intestinal iskemi reperfüzyon (I/R) hasarındaki etkisini ratlarda araştırdık. Çalışmamızda 30 rat eşit olarak üç deney grubuna ayrıldı: Grup 1, eksploratris laparotomi; Grup 2, 60 dakika iskemi ve 3 saat reperfüzyon; Grup 3, Grup 2'deki I/R'na ek olarak 300 µg/kg/gün IM Nt üç gün süreyle uygulandı. Biyokimyasal analiz olarak serum AST, ALT, LDH, CPK ve doku malondialdehit (MDA) seviyeleri ölçüldü. Mukozadaki histolojik değişiklikler Chiu sınıflamasına göre değerlendirildi. Grup 3'te ölçülen ortalama serum enzim düzeyleri grup 2'den anlamlı olarak düşük bulundu. Lipid peroksidasyon ürünü olan doku MDA'nın ortalama düzeyleri grup 2'de 1.54, grup 3'te 1.10 nmol/mg proteindir (p=0.001). Histolojik incelemede Chiu sınıflamasına göre mukoza hasarı grup 3'te, grup 2'ye göre anlamlı olarak az bulundu; 2.6 ya 3.8 (p=0.009). Bu bulgular ışığında Nörotensin'in intestinal iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etki yaptığı sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Nörotensin, ince barsak, iskemi reperfüzyon hasarı

SUMMARY: We studied the effect of neurotensin, a hormone which increases the synthesis of DNA, RNA and protein in enterocytes blood flow and cellular proliferation in the small bowel mucosa of rats with intestinal ischemia reperfusion injury. Thirty rats were equally separated into three experimental groups: Group 1, explorative laparotomy; Group 2, 60 minutes of ischemia and 3 hours of reperfusion; Group 3, ischemia and reperfusion as in group 2 plus neurotensin 300 µg/kg/day IM. over 3 days. Levels of serum AST, ALT, CPK, LDH and tissue malondialdehyde (MDA) were measured. Histologic changes in intestinal mucosa were evaluated according to Chiu's classification. Mean serum levels of measured enzymes were significantly lower in group 3 than in group 2. Tissue levels of MDA, which is a product of lipid peroxidation, were 1.54 nmol/mg protein in group 2 and 1.10 nmol/mg in group 3 (p=0.001). According to Chiu's classification, histologic examination revealed significantly less mucosal damage in group 3 than group 2; 2.6 versus 3.8 (p=0.009). These findings suggest that neurotensin has a protective effect on intestinal ischemia reperfusion injury in rats.

Key words: Neurotensin, small bowel, ischemia reperfusion injury

Mezenterik kan akımının bozulması, ince barsaklarda iskemi oluşturup dokularda değişik derecede hasar yapar. Nekroz gelişmeden önce kan dolaşımının sağlanması durumunda intestinal mukozadaki hasarın iskemik dönemden daha çok reperfüzyon döneminde olduğu ve yapılan çalışmalarda bir saatlik iskemiye takiben üç saatlik reperfüzyon döneminde oluşan hasarın, dört saatlik iskemi dönemini takiben oluşan hasardan daha ciddi olduğu gösterilmiştir (1-7). İskemik dokuda reperfüzyon esnasında yoğun nötrofil infiltrasyonu, nötrofil degradasyonu ile biriken oksijen radikalleri ve bazı enzimlerin başlattığı lipid peroksidasyon ve protein degradasyonu, hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve nekrozuna

neden olabilmektedir (6-8).

Nörotensin (Nt) 13 aminoasitten oluşan tridekapeptid yapısında bir hormon olup, barsak mukozasında kan akımını artırarak mukozal proliferasyonu hızlandırdığı, sistemik ve lokal etkisi ile enterositlerde DNA, RNA ve protein sentezini arttırdığı bilinmektedir (9-11). Bu çalışmamızda mezenterik iskemi reperfüzyon (I/R) hasarında Nörotensinin etkisinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL METOD

Çalışma Haydarpaşa Numune Hastanesi Deneyisel Araştırma Laboratuvarında, Hastanemiz Biyokimya ve Patoloji, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Biyokimya laboratuvarlarının desteğiyle yapıldı. Deneyde 250-300 gr. ağırlığında 30 adet Wistar-Albino rat kul-

Tablo 1. Deney gruplarında AST ve ALT sonuçları

Gruplar	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
1	222±95	86±33
2	605±100	307±131
3	397±104	256±28
*p değeri	0.00002	0.21

*p değeri, grup 2 ve 3 karşılaştırılması

lanıldı. 12 saat süre ile aç bırakılan deneklere Ketamine (Ketalar, Parke Davis) 50 mg/kg IM. enjeksiyonu yapılarak genel anestezi sağlandı. 10'ar ratlık üç grup oluşturuldu.

Grup1: (Sham Laparotomi) Median laparotomi yapıp, eksplorasyonu takiben karın kesisi 3/0 ipek ile kapatıldı.

Grup 2: (Ligasyon) Median laparotomi yapılarak superior mezenterik arter aortadan çıkış yerinden diseke edildi. Atravmatik mikrovasküler klemple arteriyel dolaşım durduruldu. 60 dakika iskemi sağlandıktan sonra klemple açılıp dolaşım sağlandı. Karın kesisi 3/0 ipek ile kapatıldı.

Grup 3: (Nörotensin) Toz halindeki Nt (Sigma, USA) 1 mg/ml olacak şekilde serum fizyolojik ile sulandırıldı. Cerrahi işlemden 48, 24 saat önce ve deney günü deneklere 300 mikrogram/ kg /gün nörotensin IM. enjekte edildi. Grup 2'de olduğu gibi superior mezenterik arter klemple edilerek iskemi sağlandı. 60 dakika sonra klemple açılarak reperfüzyona izin verildi. Karın kesisi 3/0 ipek ile kapatıldı.

Örnek toplama: 3 saat reperfüzyon sağlandıktan sonra Ketamine anestezisi altındaki deneklerde median kesi dikişleri alınarak karına girildi.

Kan Biyokimyası: Vena Cava Inferior kateterize edildi. 5 ml kan örneği alınarak AST, ALT, LDH ve CPK ölçümleri biyokimya laboratuvarında otoanalizör ile yapıldı.

Doku Biyokimyası: İleumdan alınan doku örnekleri sıvı nitrojenle dondurulup ölçüme kadar

Tablo 3. Chiu sınıflamasına göre histopatolojik derecelendirme

Gruplar	Histopatolojik derecelendirme	Karşılaştırılan gruplar	p değerleri
1	0.7±0.48	1-2	0.000001
2	3.8±0.79	1-3	0.00002
3	2.6±0.52	2-3	0.009

Tablo 2. Deney gruplarında LDH ve CPK sonuçları

Gruplar	LDH (IU/L)	CPK (IU/L)
1	586±295	685±172
2	1329±537	1826±370
3	1030±519	733±243
*p değeri	0.32	0.002

*p değeri, grup 2 ve 3 karşılaştırılması

-35 °C derin dondurucuda saklandı. Doku malondialdehit (MDA: nmol/mg protein) düzeyi thiobarbitüri asit yöntemi kullanılarak ölçüldü (12, 13).

Patolojik Anatomi: Histopatolojik inceleme için ileumdan alınan doku örnekleri % 10 formol içinde tespit edildi. Tespit edilen doku parafin bloklara konularak 5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen-Eosin ile boyandı. Işık mikroskopunda incelenen preparatlar Chiu ve arkadaşlarının (14) mukozal hasarı gösteren standart skalasına göre değerlendirildi. Skala aşağıdaki kriterlere göre uygulandı:

Grade 0: Normal mukoza

Grade 1. Genellikle villusun tepesinde subepitelyal alanın kapiller konjesyonla genişlemesi

Grade 2. Epitelyal tabakanın orta derecede ayrılmasıyla birlikte subepitelyal alanın genişlemesi

Grade 3. Masif epitelyal ayrılma, birkaç hasarlı villus

Grade 4. Dilate kapillerle birlikte hasarlı villuslar

Grade 5. Lamina proprianın ayrılıp dağılması, ülserasyon ve hemoraji.

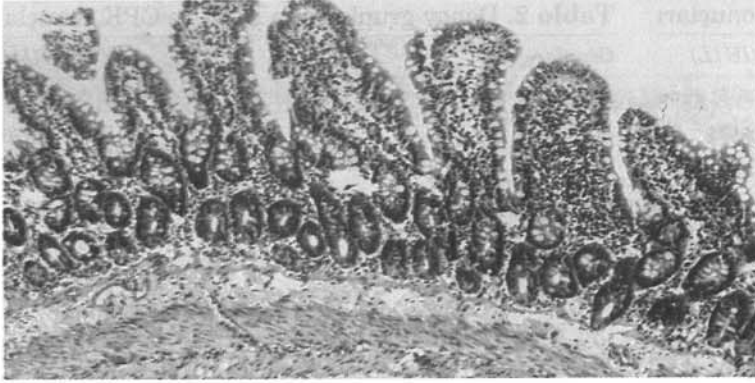
Veriler ortalama±Standart sapma olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme Student t testi ile yapıldı. p < 0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

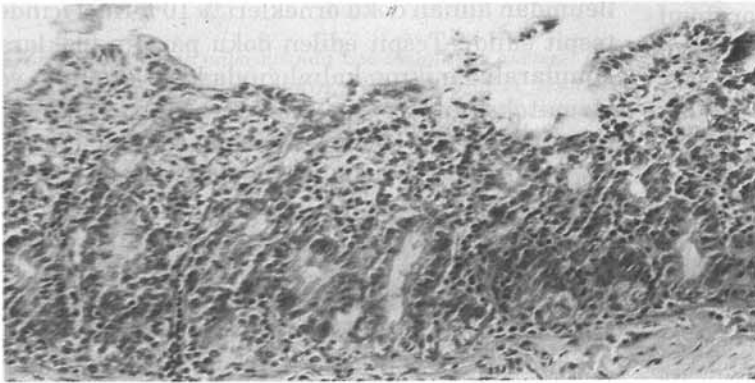
Çalışma süresince ölen denek olmadı. Tüm bulgular üç grupta 30 denek üzerinde değerlendirildi.

Tablo 4. Doku malondialdehit (MDA) düzeyleri

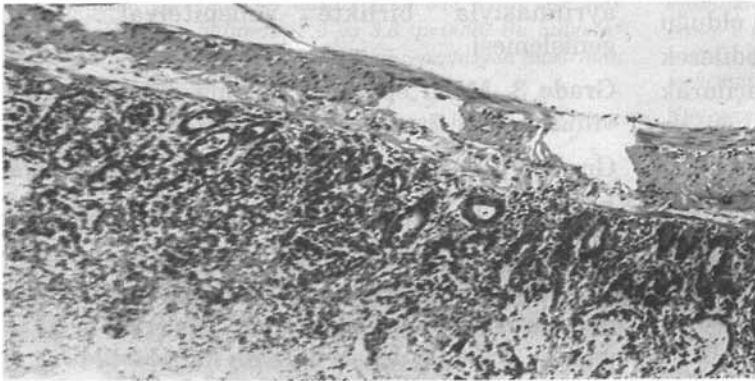
Gruplar	MDA (nmol / mg protein)	Karşılaştırılan gruplar	p değerleri
1	0.63±0.03	1-2	0.000002
2	1.54±0.26	1-3	0.00002
3	1.1±0.17	2-3	0.001



Resim 1. Normal doku (HEx200)



Resim 2. Orta derecede hasarlı doku (Chiu Grade 3; HEx400)



Resim 3. Ağır hasarlı doku (Chiu Grade 5; HEx100)

Kan Biyokimyası: Ortalama serum enzim değerlerinde, Nt kullanılan deneklerde grup 2'ye göre AST seviyesi anlamlı olarak daha az bulundu. Benzer bulgular, daha az belirgin olmakla birlikte, serum ALT seviyelerinde de saptandı (Tablo 1).

Kan biyokimyasında ölçülen diğer enzimlerden LDH ve CPK'da intestinal iskemi reperfüzyona bağlı anlamlı artış bulundu. Ortalama serum CPK

seviyesinde Nt kullanılan grup lehine, diğer ligasyon grubuna göre anlamlı fark saptandı. Ortalama LDH seviyesi ise sayısal fark olmasına rağmen, anlamlı bulunmadı (Tablo 2).

Chiu sınıflamasına göre yapılan histopatolojik derecelendirmede en çok hasar grup 2'de saptandı. Nt verilen gruptaki hasar ise daha azdı (Tablo 3). Mikroskopik incelemede grup 1'deki deneklerde normal mukoza yapısı görülürken

(Resim 1), grup 2 ve 3'deki deneklerde çeşitli derecelerde hasar saptandı (Resim 2 ve 3).

Serbest oksijen radikallerinin yaptığı hasarın göstergesi olarak, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın doku düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark vardı (Tablo 4). Her iki iskemi reperfüzyon grubu arasında, Nt verilen grup lehine anlamlı fark bulundu.

TARTIŞMA

İnce barsak mukozası arteriyel dolaşımın durmasıyla oluşan iskemiye karşı hassastır. Barsakta oluşan hasarın ciddiyeti arteriyel tıkanıklığın süresine, boyutuna ve tıkanan arterin beslediği alanın büyüklüğüne bağlıdır (2). Arteriyel dolaşımın yeniden başlaması organın kanlanmasını sağlamakla birlikte, canlılığını koruyan dokularda reperfüzyon sonrası hasar geliştiği ve bu hasarın kısa süreli iskemiyle gelişen hasardan daha fazla olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (3-5). Reperfüzyon hasarı kısa süreli iskemilerden sonra oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda 1 saate kadar olan iskemi süresinde dokuda oksijen metabolitlerinin arttığı, 2 saatin üzerindeki iskemilerde ise azaldığı gösterilmiştir (3, 7). Bu nedenle deneysel çalışmalarda 45-60 dakikalık iskemi sürelerine uygun olarak çalışmamızda da istestinal iskemi 60 dakika süreyle superior mezenterik arter dolaşımının durdurulmasıyla oluşturuldu. I/R hasarını incelemek için iskemi dönemini izleyen 3 saatlik reperfüzyon sağlandı.

I/R sonrası ince barsak mukozasında oluşan hasar sonucu bazı mikroorganizma ve toksik metabolitlerin translokasyonuna bağlı sistemik etkiler görülebilmekte ve kalp, karaciğer, akciğer, böbrek gibi vital organların işlevlerinde olumsuz gelişmeler olabilmektedir (15-17). I/R hasarına bağlı sistemik etkiler çeşitli enzimlerin serum seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirilmektedir (18, 19). Çalışmamızda I/R sonrası enzim seviyelerinin yükselmesi, sistemik etkilere neden olan barsak mukoza hasarının dolaylı bir göstergesidir. Aynı enzim değerlerinin Nt kullanılan grupta ise I/R'a rağmen daha düşük bulunması, Nt'in ileum mukozası üzerindeki trofik etkisiyle ince barsak cidarından translokasyonu ve dolayısıyla olumsuz sistemik etkileri azalttığını düşündürmektedir.

Histopatolojik inceleme ile ince barsak mukozasındaki hasar direkt olarak gösterilebilir.

Mukoza hasarının Chiu ve arkadaşlarının önerdiği skalaya göre sınıflanması, hasarın değerlendirmesinde kolay bir yaklaşım sağlamıştır. Çalışmamızda, histopatolojik inceleme ile I/R'a bağlı ileum mukozasında belirgin hücre hasarı gösterildi. Nt kullanılan deneklerde ise hücre hasarının diğer I/R grubundan anlamlı olarak az olması bu hormonun ince barsak mukozası üzerindeki proliferatif etkisine bağlanmaktadır. Bilindiği gibi Nt esas olarak ileumdan salgılanmakta, ince ve kalın barsaklarda çeşitli değişikliklere neden olmaktadır. Kalın barsak mukozasında uzun süreli (10 günden fazla) kullanımda hiperplazi ve hipertrofi gelişmesine karşın, ince barsak mukozasında 5 günden az kullanımda dahi önemli değişiklikler olmaktadır (9, 11, 20).

I/R sonrası dokularda oksijen radikallerinin oluşumu ve birikmesi bütün biyomoleküllerde bozulmaya neden olabilir. Örnek olarak hücre membran lipidlerinin peroksidasyonu hücre lizisine neden olur (3, 7, 8). I/R sonrası dokuda oluşan oksijen metabolitlerinin kantitatif değerlendirilmesinin zor olması nedeniyle reaksiyon ürünleri ölçülerek araştırma yapılmaktadır. Bunlardan bir tanesinde lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) tir (21-23). Grup 2'deki deneklerde saptadığımız yüksek doku MDA seviyeleri I/R sonrası oksijen radikallerine bağlı oluşan reaksiyonu göstermektedir. Ratlarda iskemiye izleyen 5 dakikalık reperfüzyon sonrası doku MDA düzeylerinin 3-4 kat atması ile dokuda oksijen metabolitlerinin kısa sürede oluştuğu ve lipidlerle reaksiyona girdiği çalışmalarda gösterilmiştir (22, 23). Bu aşamada toksik metabolitlerin sentezinin engellenmesi, oluşanların temizlenmesi ve mukozanın korunması önem kazanmaktadır ve çalışmalar bu amaçlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu amaca yönelik Nt verilen deneklerdeki daha düşük doku MDA düzeyleri, bu grupta reaksiyonun veya hücre hasarının daha az olduğunu, veya toksik metabolit ve reaksiyon ürünlerinin ortamdaki hızla uzaklaştırıldığını düşündürmektedir. Nt'in ince barsak mukoza hücrelerinde DNA, RNA, protein sentezini ve villus boyunu artırıcı trofik etkisi, oluşan reaksiyona karşı hücreleri koruyucu bir faktör olarak görülmektedir. Ayrıca Nt'in barsaklara yönelik bilinen bir başka etkisi ise splanknik kan akımını artırmasıdır (11, 20). Artan mezenterik kan akımı toksik metabolit ve proteolitik enzimlerin birikimini engelleyen, ve oluşan reaksiyon ürünlerini

ortamdan uzaklaştıran önemli bir etken olarak düşünülmektedir. Histopatolojik inceleme, doku ve serumda biyokimyasal analiz bulgularına göre Nörotensin'in intestinal İ/R hasarı üzerinde olumlu etki yaptığı sonucuna varılmıştır. Literatürle birlikte değerlendirildiğinde villuslarda trofik

etki, hücre DNA, RNA ve protein sentezinde artış ile mukoza yapısının korunması; ayrıca splanknik kan akımında artış ile toksik metabolitlerin temizlenmesini kolaylaştırılması, intestinal mukoza üzerinde Nörotensine bağlı muhtemel olumlu etkiler olarak düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Boros M, Karacsony G, Kaszaki J, Nagy S. Reperfusion mucosal damage after complete intestinal ischemia in the dog: The effects of antioxidant and phospholipase A2 inhibitor therapy. *Surgery* 1993; 113: 184-91.
2. Haglund U, Bulkley GB, Granger DN. On pathophysiology of intestinal ischemic injury. *Acta Chir Scand* 1987; 153: 321-4.
3. Nilsson UA, Aberg J, Aneman A, Lundgren O: Feline intestinal ischemia and reperfusion: Relation between radical formation and tissue damage. *Eur Surg Res* 1993; 25: 20-9.
4. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107: 574-80.
5. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250: 6749-53.
6. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-5.
7. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
8. Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem-Biol Interactions* 1990; 76: 141-61.
9. De Miguel E, Gomez De Segura IA. Trophic activity of nerotensin in massive intestinal resection. *Reu Esp Enform Dig* 1992; 82: 92-5.
10. De Miguel E, Gomez De Segura IA. Trophic effects of neurotensin in massive bowel resection in the rat. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 59-64.
11. Evers BM, Izukura M, Courtney M. Neurotensin prevents intestinal mucosal hypoplasia in rats fed an elemental diet. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 426-31.
12. Conti M, Morand PC, Levilian P, Lemonnier A: Improved fluorometric determination of malondialdehyde. *Clin Chem* 1991; 37: 1273-5.
13. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Ann Biochem* 1978; 86: 271-8.
14. Chiu CJ, McArdle AH, Bdown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low flow states. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-83.
15. Horton JW, White DJ. Free radical scavengers prevent intestinal ischemia reperfusion mediated cardiac dysfunction. *J Surg Res* 1993; 55: 282-9.
16. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, et al. Evidence for neutrophil related acute lung injury after intestinal ischemia reperfusion. *Surgery* 1989; 106: 195-201.
17. Turnage RH, Bagnasco J, Berger J, et al Hepatocellular oxidant stress following intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1991; 51: 467-71.
18. Golin G, Marks C, Marks WH. Intestinal fatty acid binding protein in serum and urine reflects early ischemic injury to the small bowel. *Surgery* 1993; 113: 545-51.
19. Kazmierczak SC, Lott JA, Caldwell JH. Acute intestinal infarction or obstruction search for better laboratory tests in an animal model. *Clin Chem* 1988; 34: 281-8.
20. Evers BM, Izukura M. Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. *Gastroenterology* 1992; 103: 86-91.
21. Ertas E, Atamanalp SS, Bulut T, Kuşay S, Ören D. İskemi ve reperfüzyon sonrası ince barsak mukozasında malondialdehid değeri ve süperoksit dizmutazın etkisi. *Gastroenterohepatoloji* 1991; 3: 160-5.
22. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidation, neutrophil infiltration after small intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; 105: 593-97.
23. Otamiri T. Influence of quinacrine on plasma malondialdehyde after small intestinal ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1988; 24: 63-8.