

HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN YENİDOĞAN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Doğan Şimşek,¹ Doç. Dr. Seçil Aydınöz,¹ Dr. Mesut Mutluoğlu,² Yrd. Doç. Dr. Osman Metin İpçioğlu,³ Dr. Hakan Çermik,⁴ Dr. Mustafa Kul,¹ Doç. Dr. Ferhan Karademir,¹ Doç. Dr. Günalp Uzun,² Prof. Dr. İsmail Göçmen¹

¹ GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi, İstanbul

² GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Servisi, İstanbul

³ GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Biyokimya Servisi, İstanbul

⁴ Etimesgut Asker Hastanesi Patoloji Servisi, Ankara

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı yenidoğan sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan nekrotizan enterokolitte hiperbarik oksijen (HBO) tedavisinin intestinal apoptoz ve oksidatif strese olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metod: Çalışmada yirmi adet Wistar türü yenidoğan sıçan kullanıldı. Her grupta 10 hayvan olmak üzere kontrol grubu (n=10) ve HBO grubu (n=10) oluşturuldu. Her iki gruptaki sıçanlarda hipoksi reoksijenasyon yöntemi uygulanarak nekrotizan enterokolit oluşturuldu. HBO grubundaki sıçanlara nekrotizan enterokolit oluşturulduktan sonra %100 O₂ ile 2,5 mutlak atmosfer basınçta 60 dakika HBO tedavisi uygulandı. TUNEL metoduyla boyanan intestinal kesitlerde apoptoz skorlaması yapıldı. Oksidatif stres düzeyini saptamak için intestinal dokuda protein karbonil içeriği ölçüldü.

Bulgular: Apoptoz skoru HBO grubunda (1,0 ± 0,7), kontrol grubuna (2,1 ± 0,6) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0,01). Protein karbonil içeriği ise HBO grubunda (233,3 ± 181,1 nmol/mg protein), kontrol grubuna (32,2 ± 16,9 nmol/mg protein) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p<0,05).

Sonuç: HBO tedavisi deneysel nekrotizan enterokolit modelinde intestinal dokuda oksidatif stresi artırmasına rağmen apoptoz skoru ile değerlendirilen doku hasarını azaltmaktadır. HBO tedavisinin yenidoğan nekrotizan enterokolitinde apoptozu engelleme mekanizmalarının tam olarak ortaya konabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır

Anahtar Kelimeler: Nekrotizan enterokolit, hiperbarik oksijen, sıçan, apoptoz, oksidatif stres Nobel Med 2011; 7(1): 12-16

EFFECTS OF HYPERBARIC OXYGEN THERAPY ON EXPERIMENTAL NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN NEWBORN RATS

Objective: This study was undertaken to investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on intestinal epithelial apoptosis and oxidative stress in an experimental newborn rat model of necrotizing enterocolitis.

Material and Method: Twenty newborn Wistar rats were randomly divided into control and HBO groups, 10 rats in each. Necrotising enterocolitis was developed in all animals by using a hypoxia-reoxygenation model. Animals in the HBO group was treated with 100% O₂ at 2,5 atmospheres absolute for 60 minutes. Tissue injury was determined with apoptosis scoring in intestinal tissue samples stained by TUNEL method. Oxidative stress was determined by measuring protein carbonyl content of intestinal tissue.

Results: The apoptosis score was $2,1 \pm 0,6$ in control group and $1.0 \pm 0,7$ in HBO group ($p<0.01$). The protein carbonyl content was $32,2 \pm 16,9$ nmol/mg protein in control group and $233,3 \pm 181,1$ nmol/mg protein in HBO group ($p<0.05$).

Conclusion: Although HBO therapy, in our experimental necrotising enterocolitis model, increased oxidative stress level, reduced tissue injury determined by intestinal apoptosis scoring.

Further studies are needed to shed light on the mechanisms of beneficial effects of HBO therapy on intestinal apoptosis after experimental necrotising enterocolitis in newborn rats.

Key Words: Necrotizing enterocolitis, hyperbaric oxygen, rat, apoptosis, oxidative stress *Nobel Med 2011; 7(1): 12-16*

GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit (NEK) düşük doğum ağırlıklı yenidoğanların en sık karşılaşılan gastrointestinal problemidir. Hastalık ani başlangıç ve hızlı seyir göstererek mortaliteye neden olur. Tedavinin temel amacı metabolik dengeyi sağlamak ve enfeksiyonları kontrol altına alarak hastalığın ileri evrelere geçişini önlemektir. Prematürite, perinatal hipoksi-iskemi, enfeksiyonlar ve formül sütle enteral beslenme en önemli risk faktörleridir. Bu faktörlerin etkisiyle oluşan intestinal iskemi ve arkasından gelen reperfüzyon evresindeki serbest oksijen radikalleri ile inflamatuvar mediatörlere bağlı apoptozis sonucu ortaya çıkan mukozal zedelenme patogenezdaki ana mekanizmalardır.

Son yıllarda inflamatuvar süreci ve sonuç olarak reoksijenasyon dönemindeki hasarı önlemeye dönük çeşitli tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır.¹

Hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi kapalı bir basınç odasında bir atmosferden daha yüksek basınç altında %100 oksijen solutulmasıdır. HBO tedavisi dekompresyon hastalığı, arteryel gaz embolisi, ciddi karbon monoksit zehirlenmesi, iyileşmeyen yaralar, gazlı gangren ve diğer nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonları, kompartman sendromu ve ezilme yaralanmaları dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarda HBO tedavisinin böbrek,² beyin,³ kalp,⁴ bağırsak,⁵ kas^{6,7} gibi birçok dokuda iskemi sonrası gelişen reoksijenasyon hasarını azalttığı gösterilmiştir. Yukarıda açıkladığımız NEK patogenezi düşünüldüğünde HBO tedavisinin bu hastalıkta da faydalı olabileceği öne sürülmüştür.⁸ HBO tedavisinin NEK'li yenidoğanlarda

mortaliteyi azalttığı ve klinik bulgularda daha hızlı düzelme sağladığı bildirilmiştir;⁹ ancak HBO tedavisi NEK olgularında rutin olarak kullanılmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı deneysel olarak NEK oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda HBO tedavisinin intestinal epitelyal apoptozis ve oksidatif stres üzerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

MATERYAL ve METOD

Çalışma protokolü Haydarpaşa Numune Hastanesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmada 20 adet 2-5 günlük Wistar türü yenidoğan sıçan kullanıldı. Yavru sıçanlar rastgele seçilerek ve işaretlenerek kontrol ve HBO grubuna ayrıldılar.

Kontrol grubu (n=10): Üç gün arka arkaya hipoksi reoksijenizasyon işlemi yapıldı. Hipoksi işlemi için sıçanlar 15 dakika süreyle, %100 CO₂ akışı sağlanan hava geçirmez plastik cam kap (Vacunit; Echmann, England) içinde bekletildi. Ardından aynı kap içine 15 dakika süreyle %100 O₂ verilerek reoksijenizasyon gerçekleştirildi.¹⁰

HBO grubu (n=10): Üç gün arka arkaya hipoksi reoksijenizasyon işlemi yapıldı. Son hipoksi reoksijenizasyon işleminden iki saat sonra, %100 O₂ ile 2,5 mutlak atmosfer basınçta 60 dakika süreyle HBO tedavisi uygulandı.

Üçüncü günün sonunda bütün hayvanlara ketamin anestezisini takiben servikal dislokasyonla ötenazi uygulandı. Batın orta hattın yapılan insizyonla terminal ileum ve çekum çıkarıldı. →

| Tablo: Apoptoz skorlama sistemi | |
|---------------------------------|--|
| Skor | Açıklama |
| 0 | Villus epitelinde ayrı ayrı birkaç TUNEL pozitif nükleus var. |
| 1 | Villus epitelinde tepede izlenen gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var |
| 2 | Villus epitelinde villusu tamamen kaplayan fakat kriplere inmemiş gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var. |
| 3 | Villus epitelinde villusu tamamen kaplayan ve kriplere uzanım gösteren gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var. |
| 4 | Transmural yayılım gösteren gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var. |

Histopatolojik inceleme

Doku örnekleri % 10 formaldehitte fikse edildi, doku takibi işlemi ile dehidrate edildikten sonra parafin içinde bloklar içine gömüldü. Her bir bloktan 0,4 µ kalınlığında iki adet parafin kesit alınarak Hematoksin-Eozin ve TUNEL immunohistokimyasal boyaması yapılarak incelendi. Kesitler aynı patolog tarafından kör yöntemle değerlendirildi. Apoptoz 0 - 4 arası skorlandı (Tablo).¹¹

TUNEL yöntemi

Parafin kesitler bir gece 56 derecede etüvde beklendikten sonra ksilen, alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi. Oda sıcaklığında proteinaz K ile 10 dakika inkübe edildi. Distile su ile yıkanan doku örnekleri %3 H₂O₂ ile 5 dakika bekletilip yıkama sonrası "Equilibration Buffer" da 10 saniye tutuldu. TUNEL immunohistokimyasal boyama setine ait (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7100, Chemicon) Working Streght TdT enzimi eklenip, nemli ortamda 1 saat 37°C de inkübe edildi. "Working Strength Stop/Wash Buffer" da 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile yıkamayı takiben anti-digoxigenin konjugatı eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında nemli ortamda tutuldu. Tekrar PBS ile yıkayıp peroksidaz substratı ile oda sıcaklığında 6 dakika bekletildi. Yıkamayı takiben metal yeşilinde 10 dakika tutuldu. Su ile yıkama, alkol serileri ve ksilen-den geçirilerek lamel ile kapatıldı.

Protein karbonil içerik ölçümü

Gastrointestinal sistem dokusunun protein karbonil düzeyi karbonil grubunun 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazonun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan yöntem kullanılarak tespit edildi.¹² Dokuların protein içeriği ise Lowry yöntemi kullanılarak ölçüldü.¹³ Doku karbonil düzeyi protein miktarına oranlanarak birimlendirildi (nmol/mg protein).

İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS 10,0 paket programı kulla-

nılarak yapıldı. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırılırken Student *t* testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda intestinal doku hasarı apoptoz skoru ile ölçüldü. Kontrol grubunda ortalama apoptoz skoru $2,1 \pm 0,6$, HBO grubunda ise $1,0 \pm 0,7$ olarak bulundu. Örnek patolojik kesitler Resim'de sunulmuştur. Apoptoz skorlamasına göre kontrol grubu ile HBO tedavisi verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,003$). İntestinal dokuda oksidatif stres düzeyini belirlemek için doku protein karbonil içeriği ölçüldü. Kontrol grubunda ortalama protein karbonil değeri $32,2 \pm 16,9$ nmol/ mg protein olarak bulundu. HBO tedavisi verilen grupta ise protein karbonil değeri $233,2 \pm 181,1$ nmol/mg protein olarak bulundu. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,01$).

TARTIŞMA

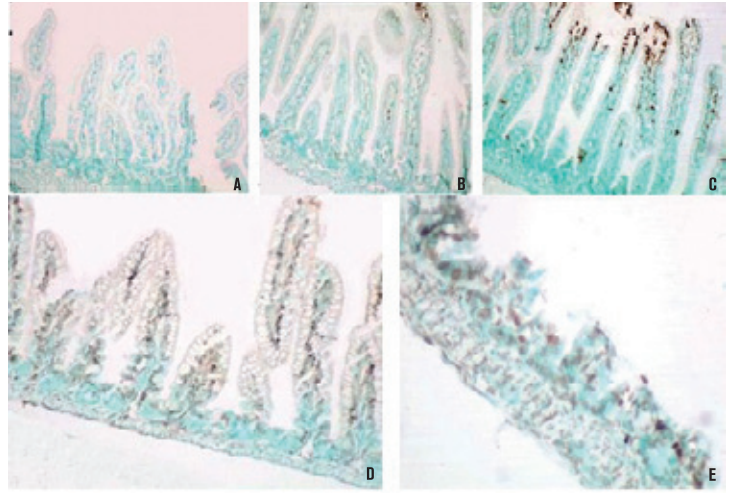
Nekrotizan enterokolitin başlamasında tetiği çeken üç önemli faktör hipoksi, hipertonic mamalarla erken enteral beslenme ve enfeksiyonlardır. Ancak bu faktörlerin ulaştığı ortak yol intestinal iskemidir.¹⁴ İskemi sonrası gelişen reperfüzyon evresinde, yapımı artan serbest oksijen radikalleri, tümör nekrotizan faktör-alfa, trombosit aktive edici faktör, IL-1, IL-3, IL-6 gibi inflamatuvar mediatörlerin intestinal mukozal zedelenmeyi daha da artırarak ülserasyon ve nekroz oluşturdukları düşünülmektedir.^{8,15-17} HBO tedavisi plazmada çözünmüş oksijen miktarını artırarak dokulara daha fazla oksijen gitmesini sağlar. HBO tedavisi sırasında oluşan hiperoksi doku hipoksisini gidermenin yanında birçok hücrenel ve biyokimyasal mekanizma üzerinde de etkili olur. HBO tedavisinin reperfüzyon hasarı oluşumuna katkıda bulunan birçok faktör üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.¹⁸ HBO tedavisinin nötrofillerin endotele yapışmasını, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve mikrovasküler kan akımını düzelttiği öne sürülmüştür.^{2,6,7,18}

HBO tedavisinin NEK'li yenidoğanlarda kullanımı bildirilmiş olmasına rağmen etkinliğinin mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Güven ve ark.⁸ yaptıkları çalışmada yenidoğan NEK modelinde HBO tedavisinin intestinal apoptozu ve doku hasarını azalttığını göstermişlerdir. Bununla birlikte HBO tedavisi oksidatif stresi ve TNF-alfa seviyesinde de azalmaya neden olmuştur. Çalışmamızda, Güven ve ark.⁸ çalışması ile uyumlu şekilde HBO tedavisinin NEK sonrası apoptozu azalttığını bulduk. HBO tedavisinin apoptozu azalttığı birçok deneysel modelde gösterilmiştir ancak bu etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekte →

dir.¹⁹⁻²² Muhtemel mekanizmalar arasında caspase-3 ve 9 aktivasyonunun azaltılması,^{19,20} mitokondrial transmembran potansiyelinin korunması,²⁰ antioksidan enzim aktivitelerinin artması^{8,22} ve Bcl-2 ekspresyonunun artması^{19,22} sayılabilir.

Çalışmamızda oksidatif stres belirteci olarak doku protein karbonil içeriği kullanıldı. Güven ve ark.⁸ aksine biz HBO tedavisinin doku protein karbonil içeriğini artırdığını bulduk. Oksidatif stres, serbest oksijen radikalleri ve antioksidan savunma mekanizmaları (enzimatik ve non enzimatik antioksidanlar) arasındaki bir dengesizlikten meydana gelir. Serbest oksijen radikalleri normal fizyolojik mekanizmalar sırasında üretilmektedir ve hücre içinde birçok süreçte rol almaktadırlar. Bu nedenle oksidatif stresin her zaman hasara yol açmadığı düşünülmektedir. Sasaki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada oksidatif stresin sıçan myokardiyumunda doku hasarını azalttığı görülmüştür.²³ Bununla birlikte son yıllarda HBO tedavisinin birçok olumlu etkisinin belirli düzeyde oksidatif stres oluşmasına bağlı olduğu ileri sürülmektedir.²⁴ Bizim çalışmamızda da oksidatif stres düzeyi artmış olmasına rağmen yukarıda da belirtildiği gibi HBO tedavisinin apoptozu azalttığını bulduk. Bu karşılıklı bize oksidatif stresin belirli bir düzeye kadar doku üzerinde koruyucu etki yaptığını belirli bir düzeyin üzerinde ise doku hasarını artırdığını düşündürdü. Bu noktada çalışma sonuçlarımız ışığında HBO tedavisinin apoptoz üzerine olumlu etkilerini açıklamada oksidatif stresin rolü olduğunu iddia etmek güç olacaktır. Ancak sonraki çalışmaların bu konuyu araştırması gerektiğini düşünüyoruz.

Özen ve ark. hipoksi reoksijenasyon modeli kullanarak NEK oluşturdukları ratlarda intestinal apoptoz oluşumunda serbest oksijen radikallerinin rolü olduğunu saptamışlardır.²⁵ Ancak bizim çalışmamızda ok-



Resim: Apoptoz skorlaması: A (Skor 0: Villus epitelinde ayrı ayrı birkaç TUNEL pozitif nükleus var), B (Skor 1: Villus epitelinde tepede izlenen gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var), C (Skor 2: Villus epitelinde villusu tamamen kaplayan fakat kriptlere inmemiş gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var), D (Skor 3: Villus epitelinde villusu tamamen kaplayan ve kriptlere uzanım gösteren gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var), E (Skor 4: Transmural yayılım gösteren gruplar halinde TUNEL pozitif nükleuslar var)

sidatif stresin intestinal apoptozu azalttığını gördük. Bu durum hipoksi oluşturulurken kullanılan yöntem farklılığından kaynaklanabilir. Özen ve arkadaşlarının çalışmasında fareler 60 dakika süreyle hipoksiye maruz kalırken bizim çalışmamızda hipoksiye maruziyet süresi 15 dakikaydı. Bu durumda ortaya çıkan serbest oksijen radikali miktarı farklı olabilir, oluşan oksidatif stres düzeyine bağlı olarak doku hasarı düzeyi de değişebilir.

Sonuç olarak deneysel olarak NEK oluşturduğumuz yenidoğan sıçanlarda HBO tedavisinin intestinal dokuda oksidatif stresi artırmasına rağmen apoptozu azalttığını bulduk. HBO tedavisinin apoptozu engelleme mekanizmalarının tam olarak ortaya konabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

İLETİŞİM İÇİN: Doç. Dr. Seçil Aydınöz GATA Haydarpaşa Eğitim Hast. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi Tıbbiye Cad. 34668 Üsküdar, İSTANBUL saydinoz@gmail.com
GÖNDERİĞİ TARİH: 04 / 04 / 2009 • **KABUL TARİHİ:** 20 / 10 / 2009

KAYNAKLAR

1. Guner YS, Chokshi N, Petrosyan M, et al. Necrotizing enterocolitis-bench to bedside: novel and emerging strategies. *Semin Pediatr Surg* 2008; 17: 255-265.
2. Solmazgul E, Uzun G, Cermik H, et al. Hyperbaric oxygen therapy attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Urol Int* 2007; 78: 82-85.
3. Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke* 2004; 35: 578-583.
4. Sterling DL, Thornton JD, Swafford A, et al. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. *Circulation* 1993; 88: 1931-1936.
5. Yamada T, Taguchi T, Hirata Y, Suita S, Yagi H. The protective effect of hyperbaric oxygenation on the small intestine in ischemiareperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 786-790.
6. Hong J, Kwon H, Chung YK, Jung SH. The effect of hyperbaric oxygen on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat musculocutaneous flap. *Ann Plast Surg* 2003; 51: 478-487.
7. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, et al. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plastic Reconstr Surg* 1993; 91: 1110-1123.
8. Guven A, Gundogdu G, Uysal B, et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 534-540.
9. Baydin SA. HBO Therapy in Pediatric Surgery. Jain KK. (eds.) *Textbook of Hyperbaric Medicine*. 4th ed. Hogrefe Huber Pub., Cambridge, MA 2004: 351-358.

10. 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.
11. Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2004; 55: 622-629.
12. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
14. Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003; 8: 449-459.
15. Ford HR, Sorrells DL, Knisely AS. Inflammatory cytokines, nitric oxide, and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 1996; 5: 155-159.
16. Tunc T, Oter S, Guven A, et al. Protective effect of sulfhydryl-containing antioxidants against ischemia/reperfusion injury of prepubertal rat intestine. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 681-687.
17. Kabaroglu C, Akisu M, Habif S, et al. Effects of L-arginine and L-carnitine in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Pediatr Int* 2005; 47: 10-14.
18. Buras J. Basic mechanisms of hyperbaric oxygen in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Int Anesthesiol Clin* 2000; 38: 91-109.
19. Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, Gould LJ. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2102-2112.
20. Palzur E, Zaaroor M, Vlodayvsky E, Milman F, Soustiel JF. Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy in brain injury is mediated by preservation of mitochondrial membrane properties. *Brain Res* 2008; 1221: 126-133.
21. Atasoyu EM, Yildiz S, Cimsit M, et al. Investigation of the effect of hyperbaric oxygen on experimental cyclosporine nephrotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 150-154.
22. Wang L, Li W, Kang Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats. *J Neurotrauma* 2009; 26: 55-66.
23. Sasaki H, Ray PS, Zhu L, Galang N, Maulik N. Oxidative stress due to hypoxia/reoxygenation induces angiogenic factor VEGF in adult rat myocardium: possible role of NFkappaB. *Toxicology* 2000; 155: 27-35.
24. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009; 106: 988-995.
25. Ozen S, Akisu M, Baka M, et al. Insulin-like growth factor attenuates apoptosis and mucosal damage in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Biol Neonate* 2005; 87: 91-96.