

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**İSKEMİ-REPERFÜZYON UYGULANAN SIÇAN
MİDESİNDE ANGIOTENSİN II' NİN İNOS VE
COX-2 EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Burcu GEMİCİ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2007

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**İSKEMİ-REPERFÜZYON UYGULANAN SIÇAN
MİDESİNDE ANGIOTENSİN II' NİN İNOS VE
COX-2 EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Burcu GEMİCİ

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nimet UYSAL**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2005.02.0122.006)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2007

ÖZET

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS), vasküler homeostazisin düzenlenmesinde en önemli düzenleyici sistemdir. RAS'ın en önemli etkiye sahip üyesi olan Anjiyotensin II (Ang II)'nin, kardiyovasküler ve renal hastalıklarda aktif rol oynayan bir büyüme faktörü olup, son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarla inflamatuvar cevabın oluşumunda kilit rolü olduğu gösterilmiştir. Deneysel iskemi-reperfüzyon (I/R) modeli, iskemi ve reperfüzyon sürelerine bağlı olarak uygulandığı dokuda inflamatuvar cevap oluşumunu tetikleyen bir modeldir.

İskemi-reperfüzyona maruz kalan mide dokusunda inflamatuvar cevabın oluşumu ile ilişkili enzimler olan iNOS, COX-2 ekspresyonunda Anjiyotensin II'nin rolünü açıklığa kavuşturmak amacıyla yapılan çalışmamızda, kontrol, I/R ve I/R + blokür grupları oluşturulmuştur. I/R gruplarına 30 dakika iskemi ve iskemiye takiben 24 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Blokür gruplarına ise I/R uygulamasından önce 5 gün, günde 2 defa AT₁ reseptör blokürü; Candesartan (1 mg/kg/gün), AT₂ reseptör blokürü; PD123319 (3 mg/kg/gün) veya ACE inhibitörü; Captopril (20 mg/kg/gün) uygulanmış, takiben I/R yapılmıştır. Deneklerden alınan mide dokusunda, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, PGE₂ ve NOx (nitrit+nitrat) miktarları, iNOS ve COX-2 ekspresyonları tesbit edilmiş, plazmada Ang II düzeyi ölçülmüştür.

30 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon periyodunun ardından artmış olan MPO aktivitesi, candesartan kullanımı ile baskılanmıştır. I/R grubunda PGE₂ miktarı azalmış, COX-2 ekspresyonu değişmemiştir. Candesartan ve PD123319 verilen I/R gruplarında ise COX-2 ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. I/R'a bağlı olarak NOx miktarında değişiklik olmamasına karşın, iNOS ekspresyonunda gözlenen artış, candesartan ile baskılanmıştır. Deney gruplarının hiçbirinde, plazma Ang II düzeyinde değişiklik tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak; Anjiyotensin II AT₁ reseptörü üzerinden etki ederek, I/R'a bağlı iNOS ekspresyonundaki artıştan sorumlu olabilir.

Anahtar kelimeler: İskemi ve reperfüzyon, Anjiyotensin II, iNOS, COX-2, candesartan, PD123319, captopril, inflamasyon.

ABSTRACT

Renin-Angiotensin system (RAS) is the most important regulatory system in vascular homeostasis. Angiotensin II (Ang II) which is the most effective member of RAS, is defined as a growth factor that has an active role on cardiovascular and renal diseases. At last decade, it is revealed that Ang II has a key role in development of inflammatory response. Experimental ischemia-reperfusion (I/R) model which triggers inflammatory response that depends on ischemia and reperfusion duration is an effective model.

In this study, we aimed to clarify the effect of Ang II on expression of iNOS and COX-2 enzymes which are related to inflammatory response in rat stomach which is exposed to ischemia-reperfusion. According to our purpose, control, I/R, I/R+Candesartan, I/R + PD123319, I/R + Captopril groups were designed. 30 min ischemia, subsequent 24 hrs reperfusion was applied at I/R group. AT₁ RB; Candesartan (1 mg/kg/day), AT₂ RB; PD123319 (3 mg/kg/day) or ACE inhibitor Captopril (20 mg/kg/day) were given twice a day for five days. After that, I/R procedure was applied. Myeloperoxidase (MPO) activity, PGE₂ and NO_x (nitrate+nitrite) quantities and expressions of iNOS and COX-2 were assayed in gastric tissues. Ang II level was measured in plasma.

After 30 min ischemia duration subsequently 24 hrs reperfusion period, MPO activity was increased. This increment was abolished with candesartan. PGE₂ quantity decreased, but there were no changes statistically significant and NO_x quantities in I/R group. The expression of COX-2 was increased in I/R+PD123319 and I/R+Candesartan groups. The increment of iNOS expression was suppressed with Candesartan although NO_x quantity was not changed related to I/R. There was no statistically significance in plasma Ang II level between all the groups.

In conclusion; Angiotensin II may be responsible for increase of iNOS expression which is related to I/R, via AT₁ receptor pathway.

Key words: Ischemia and reperfusion, Ang II, iNOS, COX-2, candesartan, PD123319, captopril, inflammation.

TEŐEKKÖR

Bu araŐtırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerçekleŐmesinde değerli katkıları ve eleŐtirileriyle bana yol gÖsteren değerli hocam Prof.Dr.Nimet UYSAL'a, deneysel çalıŐmalardaki katkılarından dolayı çalışma arkadaŐım AraŐ.GÖr.Ruken TAN'a, öneri ve eleŐtirileri için değerli hocalarıma, teknik olanakları ile deneysel çalıŐmanın belirli basamaklarının gerçekleŐmesini sağlayan Merkez Araştırma Laboratuarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları Ünitesi çalıŐanlarına, tezin yapım sürecindeki desteklerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Mutay ASLAN AYDIN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi-Reperfüzyon	3
2.1.1. İntestinal iskemi	4
2.1.2. İskemik Fazdaki Hasar Oluşumu	4
2.1.3. Reperfüzyon	6
2.1.4. Reperfüzyon Fazındaki Hasar Oluşumu	7
2.2. Reaktif Oksijen Türleri	9
2.3. Mukozal savunma	13
2.4. Mukozal Savunmanın Yapısal Özellikleri	15
2.4.1. Mukus Bariyeri	15
2.4.2. Epiteliyal Hücre Bariyeri	16
2.5. Akut Gastrodedonal Savunmanın Fiziyojik Mekanizması	16
2.5.1 Mukus Yapımının Düzenlenmesi	16
2.5.2. Bikarbonat Sekresyonunun Düzenlenmesi	16
2.5.3. Mukozal Mikro Dolaşımın Düzenlenmesi	17
2.5.4. Gastrodedonal Motilitenin Düzenlenmesi	17
2.6. Afferent Duysal Nöronların Özelliği	18

2.7.	Mukoza Bütünlüğün Sağlanmasında Bağışıklık Sisteminin Rolü	18
2.8.	Lüminal Asit Sinyalinin Efferent Sinir Cevaplarında İletimi	19
2.9.	Gastroduodonal Savunmanın Son Aşaması; Hızlı Onarım ve İyileşme	19
2.10.	Siklooksijenaz Enzimleri	20
2.11.	Renin Angiotensin Sistemi	21
2.11.1.	Angiotensin II	21
2.11.2.	Ang II Reseptörleri ve Reseptör Blokörleri	22
2.12.	Ang II'nin İnflamatuar Yanıt Oluşumundaki Rolü	24
2.12.1.	Vasküler Permeabilitenin RAS Aracılığı ile Değiştirilmesi	24
2.12.2.	RAS'ın inflamatuar Hücrelerde Kemotaksis ve Hücre Adezyonuna Etkisi	24
2.12.3.	RAS'ın Adezyon Moleküllerinin Ekspresyonuna Etkisi	24
2.12.4.	RAS'ın İnfiltrat Olan İmmün Hücre Fonksiyonlarına Etkisi	26
2.13.	Ang II'nin İndüklediği İnfiltrasyonun Moleküler Mekanizması	25
2.14.	Ang II'nin Doku Onarımına Etkisi	26
GEREÇ ve YÖNTEM		28
3.1.	Gruplandırma ve Deney Protokolü	28
3.2.	Parametrelerin Tayini	29
3.2.1.	Kan Basıncı Ölçümü	29
3.2.2.	Protein Ölçümü	29
3.2.3.	Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini	29
3.2.4.	Nitrit Tayini	30
3.2.5.	Nitrat Tayini	31
3.2.6.	PGE ₂ Tayini	32
3.2.7.	Anjiyotensin II Tayini	32

3.2.8.	iNOS ve COX - 2 Ekspresyonunun Tayini	33
3.3.	İstatistiksel Analiz	35
BULGULAR		36
4.1.	Kan Basıncı Değerleri	36
4.2.	MPO Aktivitesi	37
4.3.	PGE ₂ Miktarı	38
4.4.	NO _x Değerleri	39
4.5.	iNOS ve COX-2 Ekspresyonları	40
4.5.1	iNOS Ekspresyonu	40
4.5.2.	COX-2 Ekspresyonu	41
4.6.	Plazma Ang II Miktarı	42
TARTIŞMA		43
SONUÇLAR		47
KAYNAKLAR		48
ÖZGEÇMİŞ		61

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Araşidonik Asit
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
Ang II	: Anjiyotensin II
AP-1	: Aktivatör protein -1
ATP	: Adenozintrifosfat
AT₁ R	: Anjiyotensin Tip-1 reseptörü
AT₁ RB	: Anjiyotensin Tip-1 reseptörü blokürü
AT₂	: Anjiyotensin Tip-2 reseptörü
AT₂ RB	: Anjiyotensin Tip-2 reseptörü blokürü
AT₃	: Anjiyotensin Tip-3 reseptörü
AT₄	: Anjiyotensin Tip-4 reseptörü
bFGF	: Temel Fibroblast büyüme faktörü
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
CAN	: Candesartan
CAT	: Katalaz Enzimi
CAP	: Captopril
CGRP	: Kalsitonin Geni ile ilişkili Peptid
CINC	: Sitokin ile İndüklenen Nötrofil Kemoatraktanları
cNOS	: Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
COX	: Siklooksijenaz
CO₂	: Karbondioksit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
GI	: Gastrointestinal
GPx	: Glutasyon Peroksidaz Enzimi
H⁺	: Hidrojen iyonu
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HCl	: Hidroklorik Asit
HCO₃	: Bikarbonat
H₂CO₃	: Karbonik asit
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HO₂	: Hidroperoksit
H.pylori	: Helicobacter pylori
ICAM-1	: İntraselüler Adezyon Molekülü-1
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IL-8	: İnterlökin-8
IL-1	: İnterlökin-1
IL-1β	: İnterlökin 1-Beta
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
I/R	: İskemi/Reperfüzyon

K⁺	: Potasyum iyonu
LOX	: Lipooksijenaz
LTC₄	: Lökotrien C ₄
MAPkinazlar	: Mitojen İle Aktive Olan Protein Kinaz Ailesi
METZ	: Mitokondriyal Elektron Transport Zincir
MIP-2	: Makrofaj İnflamatuar Protein-2
MKA	: Mukozal Kan Akımı
MPO	: Miyeloperoksidaz
MUC	: Müsin Geni
Na⁺	: Sodyum iyonu
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO₂	: Nitrit
NO₃	: Nitrat
NSAID	: Steroid Olmayan Anti-İnflamatuvar İlaçlar
¹O₂	: Tekil (singlet) Oksijen
O₂	: Moleküler Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
OH[·]	: Hidroksil Radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
OH⁻	: Hidroksil İyonu
OS	: Oksidatif Stres
PA-1	: Protein Aktivatör-1
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü
Pcr	: Fosfokreatin
PD	: PD123319
PDH	: Piruvat dehidrogenaz
PG	: Prostaglandin
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PGI₂	: Prostatiklin
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PMNL	: Polimorfonükleer Lökositler
RAS	: Renin Anjiyotensin Sistemi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
S.C.	: Subkutan
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikali
TGF-α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktörü-alfa
TRPV1	: Transient Reseptör Katyon Kanalı Vanilloid-1
TX	: Tromboksan
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1

VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VPF	: Vasküler Permeabilite Faktörü
VR	: Vanilloid Reseptör
XDH	: Ksantin Dehidrogenaz
XO	: Ksantin Oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İskemik Hücre Hasarı Mekanizması	4
2.2. İskemiye Takiben Oluşan Reperfüzyonda Oluşan Doku Hasarı Mekanizması	7
2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Hasar Oluşturma Mekanizması	15
2.4. Renin Anjiyotensin Sisteminin Üyeleri	22
2.5. Anjiyotensin II'nin İnflamatuar Yanıt Oluşumundaki Rolü	23
4.1. Kan Basıncı Değerleri	36
4.2. Mide Mukozasında MPO Aktivitesi	37
4.3. Mide Mukozasında PGE ₂ Miktarı	38
4.4. Mide Mukozasının NOx Değerleri	39
4.5. iNOS Ekspresyonu	40
4.6. COX-2 Ekspresyonu	41
4.7. Plazma Ang II Düzeyleri	42

GİRİŞ

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) vasküler homeostazisin düzenlenmesinde en önemli düzenleyici sistemdir [1]. RAS'ın en önemli etkiye sahip üyesi olan, günümüzde kardiovasküler ve renal hastalıklarda aktif rol oynayan bir büyüme faktörü olarak tanımlanan Anjiyotensin II (Ang II), ilk defa 1940 yılında Braun-Mendez ve arkadaşları tarafından periferik bir hormon olarak tanımlanmıştır [1, 2, 3]. Ang II, renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığı ile anjiyotensinojenden dönüştürülen, geniş fonksiyon çeşitliliğine sahip, vazokonstriktör etkili bir oktapeptittir [2, 4].

1990'ların başlarında yapılan deneysel çalışmalar ile Ang II'nin, inflamatuvar cevabın oluşumunda kilit role sahip olduğu, pro-inflamatuvar ve proliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ang II çoğunlukla, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi inflamasyonla ilişkili transkripsiyon faktörlerini aktive etmek yoluyla, immün cevabın oluşumuna ve inflamatuvar sürecin gelişimine katkıda bulunur. İskemi-reperfüzyona maruz kalan dokularda ACE'ye ait gen ekspresyonunun ve Ang II'nin plazmadaki konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir [5].

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), inflamasyonda nitrik oksit (NO)'in aşırı yapımından sorumlu olan enzimdir [6]. iNOS makrofajlar, nötrofiller, vasküler düz kas ve endotel hücreleri, mezangial hücreler, kondrositler ve fibroblastlarda ortaya çıkar [6]. Ayrıca iNOS, siklooksijenaz-2 (COX-2) sentezinin düzenlenmesinde, dolayısı ile pro-inflamatuvar prostaglandin E₂ (PGE₂)'in yapımında önemli rol oynar [6]. Çeşitli inflamasyon modellerinde iNOS ve COX-2'nin birlikte indüklendiği ve birlikte regüle edildiği gösterilmiştir [6]. İnflamasyon bölgesinde indüklenen COX-2 etkisi ile oluşan PGE₂ vazodilatasyon ve vasküler permeabilitede artış yaparak pro-inflamatuvar etki gösterir.

COX-2 fizyolojik koşullarda tespit edilemeyecek kadar az olan bir enzimdir [6]. Ancak inflamatuvar sitokinler, endotoksinler, büyüme faktörleri, onkogenler ve forbol esterleri kapsayan mitojenik stimuluslar, hızlı ve geçici COX-2 gen ekspresyonuna neden olur [6].

iNOS ve COX-2'nin aktivitesi ile ortaya çıkan NO ve PGE₂ endotel hücresi üzerindeki adezyon moleküllerinin çıkışını regüle ederek nötrofil aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır [14]. Nötrofil aktivasyonu ve dokuya geçişi ile başlayan akut inflamasyon, iskemi-reperfüzyon patogenezisinde kritik rol oynamaktadır [7, 16].

İskemi-reperfüzyon (I/R)'a maruz kalan dokularda inflamatuvar bir cevap oluşur [8]. Bu inflamatuvar cevap, çeşitli inflamatuvar hücre ve moleküllerin etkileşimi ile ortaya çıkan dinamik bir süreçtir [5]. İskemi-reperfüzyona maruz kalan dokulara ait hücrelerde aktive olan NF- κ B, bu sürecin gelişiminde önemli rol oynamaktadır [5,

6, 9, 10, 11]. Bunun sonucu olarak çeşitli inflamatuvar genler eksprese olmakta ve çeşitli sitokinlerin lokal yapımı artmaktadır [5, 9, 12]. Doku kan damarlarının endotel hücrelerinde adezyon molekülleri eksprese olmakta ve böylece periferel lökositlerin infiltrasyonu ile doku hasarı ortaya çıkmaktadır [10]. Bu inflamatuvar moleküllerin deneysel manipülasyonları iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarını önlemek için tedavi yaklaşımlarını etkileyecektir [6].

Gastrointestinal sistem, hemen hemen her besin alınımından sonra hidroklorik asit (HCl), proteolitik enzimler ve safra gibi epiteliyal hasar oluşturma kapasitesi yüksek olan çok sayıda maddeye maruz kalmaktadır. Fakat bu maddelere maruz kalmasına rağmen mukozada önemli hasar oluşumu çok nadirdir. Gastrointestinal sistemin olağanüstü bozulmadan kalma yeteneğinin sebebi mukozal savunmadır. Mukozal savunma ve zararlı faktörler arasındaki dengenin bozulması, mukozal savunma komponentlerinin azalıp tehlikeli ajanların artması durumunda ülser oluşumu gözlenir [13]. Mukozal savunmanın temelindeki mekanizmaların anlaşılması, ülser tedavilerinin geliştirilmesi açısından son derece önemlidir [14].

İskemi-reperfüzyon sonrası gözlenen mide hasarı, çeşitli hemorajik koşullar (hemorajik şok, peptik ülser kanaması, vasküler ruptur vs.) ve diğer şok durumlarında çok sayıda mikrovasküler ve mukozal değişimlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonu ve dokuya geçişi, çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin salınımı, luminal asit, reaktif oksijen radikallerinin fazla miktarda oluşması, iskemi-reperfüzyona bağlı mide hasarının oluşumunda rol oynamaktadır [15].

Özetle; RAS'ın bir üyesi olan Ang II'nin inflamatuvar süreçte pro-inflamatuvar rolü olduğu, bunu NF- κ B ve AP-I gibi inflamasyonla ilişkili transkripsiyon faktörlerini aktive etmek yoluyla sağladığı, özellikle NF- κ B'nin aktivasyonu sonrasında inflamasyonla ilişkili iNOS ve COX-2 gibi enzimlerin, sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin yapımının arttığı bilinmektedir. İskemi-reperfüzyona maruz kalan dokularda inflamatuvar bir cevap oluşmakla birlikte ACE'ye ait gen ekspresyonunun ve düzeyinin arttığı gösterilmiştir [5].

Çalışmamız iskemi-reperfüzyona maruz kalan mide dokusunda inflamatuvar cevabın oluşumu ile ilişkili enzimler olan iNOS ve COX-2 ekspresyonunda Ang II'nin rolünü açıklığa kavuşturmak amacı ile planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi-Reperfüzyon

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesi veya durması sonucu, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin uzaklaştırılmamasına iskemi denir [16]. Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır.

İskemi tek başına doku hasarına sebep olur, ancak asıl hasar iskemik dokunun hücre canlılığını ve fonksiyonunu korumaya yönelik olarak yeniden kanlanması durumunda oluşur [16]. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan reaktif oksijen türleri, (ROS) dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir [17]. İskemik bir dokunun reperfüzyonu dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken, hasar oluşturur [18]. Bir dokuda iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiyeye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır [19].

Akut mezenterik iskemi, çeşitli yanıklar, hemorajik, travmatik ya da septik şok sonrasında, reaktif oksijen türlerinin ve proteazların üretimi ve nötrofillerin, nötrofil–endotelial hücre etkileşimlerini takiben intestinal mukozada birikmeleri sonucu iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı oluşur [20]. İskemik dokuya nötrofil geçişi iskemiden sonra ilk 12 -24 saat içinde gözlenir. Bu sürenin sonunda nötrofiller yerini yavaş yavaş makrofajlara bırakırlar. Bununla beraber, iskeminin ardından reperfüzyon da gerçekleşirse, lökosit birikimi iskemik alanda kan akımı arttığı için daha hızlı olur [21].

I/R hasarı, kalp, beyin, karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi oksijene bağımlı doku hücrelerini, organları önemli ölçüde etkiler. Organ naklini takiben gelişen fonksiyon bozukluğunun ana sebebi olarak da I/R hasarı gösterilmektedir. Bu hasar nakledilmiş organın uzun süre yaşama durumunu kısıtlar [8]. I/R'nin görülme sıklığına bağlı olarak mezenterik kan damarlarında meydana gelen I/R sonucu, genellikle akut vasküler yetmezlik ve çoklu organ yetmezliği gelişir [22].

I/R hasarının oluşum mekanizmasında çeşitli faktörlerin etkili olduğu öne sürülmüştür. Bunlar arasında, proteazların ve fosfolipazların aktivasyonu, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda meydana gelen değişim, ATP yokluğu, serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarı, pro ve anti-inflamatuar sitokin yapımındaki dengenin pro-inflamatuar sitokinler yönüne kayması, kemokinler, aktif immün sistem hücreleri bulunmaktadır [23].

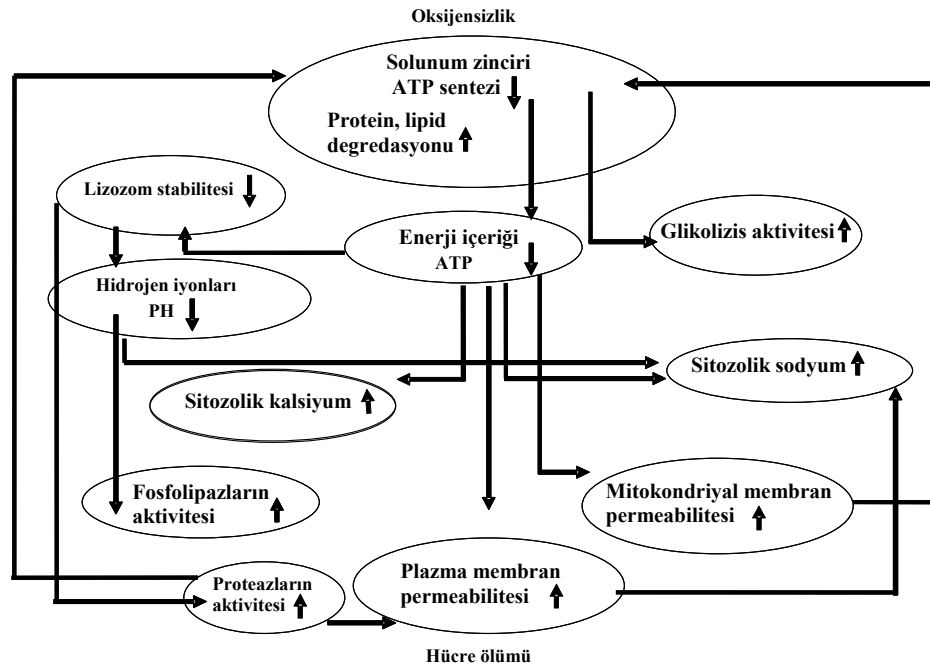
2.1.1. İntestinal iskemi

İntestinal iskemi genellikle tromboz ya da emboli ile oluşan arter tıkanması, kalp yetmezliği, mezenterik arterdeki düşük kan akımı, sepsis ve alfa adrenerjik ajanların uygulanması sonucu meydana gelir. Kan akımı en çok çöliak arterin, süperiyor mezenterik arterin, inferiyor mezenterik arterin tıkanması ile tehlikeye girer. Bununla beraber mezenterik kan damarları kendi aralarındaki ya da çok yakınlarındaki paralel akım kaynakları ile dokulara giden kan akımını destekleyebilirler [22].

Arteriyel iskemi dokulara oksijen temininin durdurulmasıyla meydana gelen değişimler ile başlar. Bu değişimlerden biri aerobik (oksijenli) enerji metabolizmasının durmasıdır. Bunu takiben hücre içi ATP miktarı azalır ve hücresel homeostazis bozulur. İskemi sürecinde yetersiz oksijen sağlanması, sonuç olarak ATP varlığında gerçekleşecek olayları tehlikeye sokar [22].

2.1.2. İskemik Fazdaki Hasar Oluşumu

İskemik fazda oksijene bağımlı olan hücrelerin (kardiyomiyositler, nöronlar, hepatositler, renal tübüler hücreler, bağırsak epitelial hücreleri) oksijensiz kalması bu hücreleri ağır bir şekilde etkiler [8]. İskemi sonucunda dokunun tek enerji kaynağı anaerobik metabolizmadır. Bu sebeple doku hipoksizde kalırsa, hipoksik doku hasarı ortaya çıkar [8, 24] (Şekil 2.1.). Hasar oluşumu, mitokondriyal enerji yapımının (oksidatif fosforilasyonun) azalması ve hücresel enerjinin düşmesi sonucu gerçekleşen bir seri olaylar dizisidir [8]. Doğrudan ya da dolaylı olarak meydana gelen enerji yokluğu, hücre içinde hücresel iyon homeostazisinin bozulması, hidrolazların aktivasyonu, hücresel membranların permeabilitelerinin artması gibi değişimlerin görülmesine sebep olur. Bu olaylar kısmen sıra ile birbirini takip eden tarzda gerçekleşir. Daha fazla hasarın oluşumu, bu değişimleri sürdürür ve bu değişimler de doku hasarını tetikleyici diğer değişimlerle bağlantılıdır. Böylece kendi kendine artan şekilde hasar oluşmaya başlar.



Şekil 2.1. İskemik hücre hasarı mekanizması [8].

İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur ve hücrelölüm meydana gelir. Hücrel enerji eksikliği iskemik hasarın gelişmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Aerobik koşullarda bir mol glukoz, glikoliz ile iki mol piruvata dönüşürken iki mol ATP elde edilmektedir. Oksijen varlığında iki mol piruvat, piruvat dehidrogenaz (PDH) enzimi ile asetil-KoA'ya metabolize edildikten sonra, krebs döngüsü ve ardından indirgen eşdeğerlerin mitokondrial elektron transport zincirinde, moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında 36 mol ATP oluşmaktadır [8, 25]. İskemi sırasında, oksijen yokluğuna bağlı olarak, mitokondrial elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi giderek azalmaktadır [26]. Fosfokreatin (Pcr) depoları tükeninceye kadar kreatin kinaz reaksiyonu ile ATP yapımı bir süre daha devam etmektedir. Daha sonra ATP tamamen tükenmektedir [25].

Hücre membranında bulunan Na^+/K^+ ATPaz pompası, ATP hidrolizi ile üç sodyum atomunu (Na^+) iki potasyum (K^+) atomu karşılığında hücre dışına çıkarırken, kalsiyum (Ca^{2+}) pompası olan Ca^{2+} ATPaz ise iki hidrojen iyonuna (H^+) karşılık bir Ca^{2+} iyonunu hücre dışına çıkarmaktadır. Böylece ekstrasellüler Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonları hücre içine göre sırasıyla 10 ve 10.000 kat daha fazla olmaktadır. Hücre içi K^+ konsantrasyonu ise hücre dışına oranla 40 kat fazla bulunmaktadır. Primer aktif transport ile sağlanan sodyum gradiyenti, $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ve Na^+/H^+ taşıyıcıları için enerji kaynağını oluşturmaktadır. Bu sekonder aktif transport taşıyıcıları ile Ca^{2+} ve H^+ iyonlarının hücre dışına çıkması sağlanmaktadır. Hücre membranının potasyuma olan geçirgenliği nedeniyle potasyum dağılımı temelde konsantrasyon gradiyenti ile oluşmaktadır.

Hücreye enerji sağlandığı sürece aktif ve pasif transport sistemleri uyum içinde çalışarak, iyon dengesini sağlamaktadırlar. İyon dengesi, hücre içi metabolizma ve sinyal iletimi gibi temel fonksiyonlar için gerekli olan membran potansiyelinin oluşturulmasında birinci derecede önem taşımaktadır.

İskemide sitozolik pH, ATP yokluğuna, glikolitik hızın artışına ve belki de hasarlı lizozomlardan serbestlenen H^+ iyonuna bağlı olarak düşer. Asidoz ile birlikte, makromolekül sentezinin durması, sitozolik Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının konsantrasyonunun artması ve iyon dengesinin bozulması, plazma permeabilitesinin artması, ATP yıkım ürünlerinin birikmesi, bu değişimlere paralel olarak sonunda, hücrel homeostazis bozulması görülür [8, 22, 27].

Sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun artışı hücre içi fosfolipazlar gibi hidrolazları (özellikle fosfolipaz A_2 gibi) aktive eder. Aktive olan hidrolazlar substratlarını yıkmak suretiyle hasar oluşumunu hızlandırırılar (Ör. hücre içi Ca^{2+} ile aktive olan calpain, hücre iskeleti proteinlerinin yıkımına sebep olur). Artan hücrel Na^+ iyonu konsantrasyonu plazma membranının ayrılmasına sebep olan hücrel osmotik şişkinliğin oluşumunu sebep olur. Mitokondriyal membranda oluşan geçiş porları yüzünden permeabilite değişimi, mitokondriyal membran potansiyeli kaybına ve mitokondriyal matriksde Ca^{2+} birikimine sebep olur.

İskemide gelişen bu olaylar, temelde reperfüzyonda oksijen ve kan ürünlerinin yeniden dokuya gelmesiyle oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumu

için zemin hazırlamaktadır [28]. Reperfüzyonda çok çeşitli hücre, organel ve enzimler serbest radikal kaynağını oluşturur. Bunlar arasında Mitokondrial elektron transport zinciri (METZ), vasküler endotel, lökositlerin (nötrofil, lenfosit, monosit) aktivasyonu, plazma ve organel membranları, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonu sayılabilir.

2.1.3. Reperfüzyon

Yapılan çalışmalarda, koroner arter tıkanması sonrasında eğer zamanında reperfüzyon uygulanırsa, bu uygulamanın hücreleri miyokardial nekrozisten koruduğu gösterilmiştir [22]. Bununla birlikte iskeminin süresine ve yoğunluğuna bağlı olarak oksijen yeniden dokulara geldiğinde, temelde oksijensizlik yüzünden oluşan doku hasarı daha da ağırlaşır. Reperfüzyonda hızlı oksijen radikali oluşumu hem sistemik hem de lokal hasar oluşumuna neden olur. Çeşitli hayvan türlerinde yapılan deneysel mezenterik iskemi reperfüzyon modelinde reperfüzyon fazında oluşan doku hasarı, iskemik fazda oluşan hasardan daha fazladır. Braunwald ve ark.'larının [29] çalışmasına göre miyokardiyal iskemide iskeminin süresi ile bağlantılı olarak koroner akımın yeniden sağlanması, hem nekrozisin önlenmesi hem de miyokardiyal hasarın yayılmasının önlenmesi açısından son derece etkilidir. Ancak, akımın yeniden sağlanması dokuda fonksiyonel metabolik ve yapısal değişimleri de beraberinde getirir [21]. İ/R sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon ve arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozukluğu gelişir. Kapillerlerde lökosit tıkaçları oluşur, sıvı filtrasyonu artar. Postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına çıkması ve lökositlerin hareketliliği başlar. Mikrosirkülasyonun bütün segmentlerinde aktive olan endotel hücreleri daha fazla ROS ve daha az nitrik oksit (NO) üretir. Endotel hücrelerinde süperoksit radikali ve NO arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınmalarına öncülük ederken adezyon moleküllerinin biyosentezini de artırır [30].

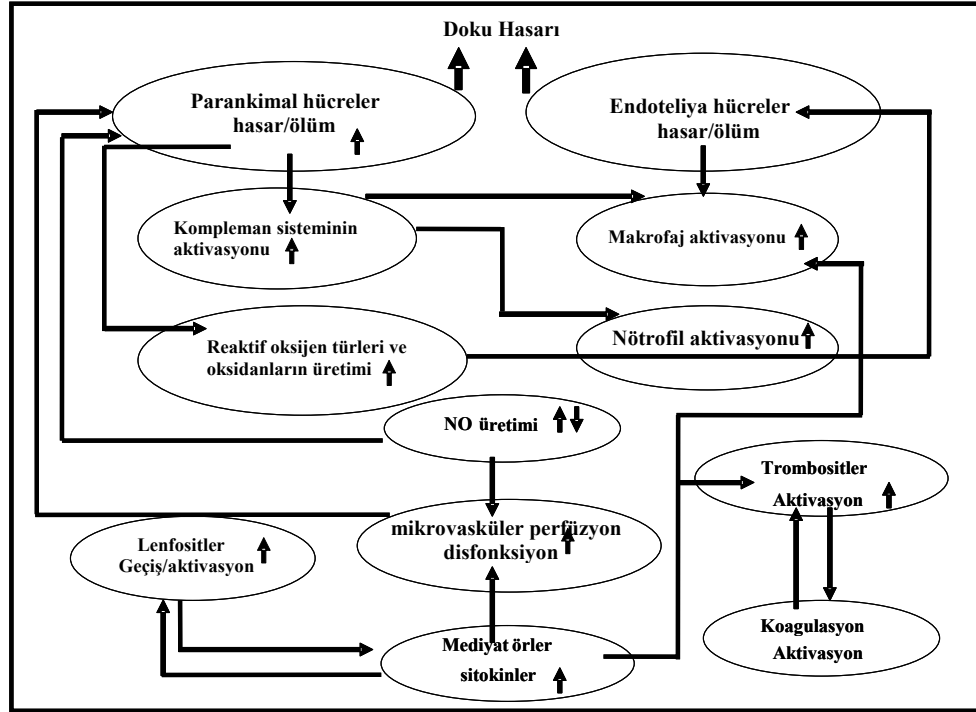
I/R, endotelium ve farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimleri artırarak mikrovasküler hasara, hücrel nekroza ve/veya apoptozise neden olur. Splanknik arterlerin tıkanması ve reperfüzyonun özellikle vasküler permeabiliteyi değiştirmesi, polimorfonükleer nötrofil (PMN)'lerin aktivasyon ve adezyonlarını sağlaması, pro-inflamatuvar maddelerin, nitrojen ve oksijen kökenli serbest radikallerin oluşumu nedeniyle dolaşımsal şoku hızlandırır [8].

İnce bağırsakta meydana gelen I/R, mukozal bariyerin bütünlüğünün bozulmasına, bakteriyel geçiş ve inflamatuvar cevabın oluşumuna sebep olur. Bakteriyel translokasyon, canlı bakterinin intestinal mukoza aracılığı ile mezenterik lenfatik nodlara, diğer organlara ve dokulara yayılmasıdır. Translokasyon süreci, bakteri ve bağırsak duvarı arasında tek başına sitokin yapımını uyaracak ve inflamatuvar yanıtı oluşturacak ilk temas ile başlar. Bakteri mukozaya geçer ve oradan farklı organlara dolaşım sistemi ile taşınır. Sıçan mezenterik arterine 30 dakika iskemiyi takiben 24 saatlik reperfüzyon uygulanan bir çalışmada, işaretli bakterinin translokasyonuna bakılmış ve translokasyonda reperfüzyon zamanının belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır [8]. Çünkü kan akımının yeniden sağlanması ile hücre içine fosfolipaz A₂ aktivasyonunu sağlayan Ca²⁺ girişi gerçekleşir. Fosfolipaz A₂ tarafından salınan araşidonik asit reperfüzyon süresince COX enzimleri tarafından metabolize edilir. Prostaglandin (PG)'lerin, Tromboksan (TX), prostasiklinler (PGI₂)

ve lökötrienlerin yapımından sorumlu olan lipooksijenaz (LOX) enzimlerinin üretimi, vazodilatasyon (PGI_2 , PGE_1 , PGE_2 , PGD_2), vasküler permeabilitenin artışı (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4), trombosit agregasyonunu ve PMN'lerin kemotaksisini uyarır [8, 22].

2.1.4. Reperfüzyon Fazındaki Hasar Oluşumu

İskemiye takiben inflamatuvar bir cevap oluşur (Şekil 2.2.) [8]. İnflamasyon, travma ve enfeksiyon gibi durumlarda dokular fiziksel ya da kimyasal ajanlarla ya da patojenlerle hasarlandığında, hasara karşı oluşturulan bölgesel savunma cevabı olarak tanımlanmıştır [3]. Bu oluşan inflamatuvar cevaba, makrofajlar endotelial hücreler, nötrofiller lenfositler, trombositler, parankimal hücreler, ayrıca kompleman sistemi, kan koagülasyon kaskadı, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit, pro ve anti-inflamatuvar sitokinler, mikrovasküler perfüzyon ile ilişkili diğer mediyatörler gibi hüresel olmayan yapılar da katılır [8].



Şekil 2.2. İskemiye takiben reperfüzyonda oluşan doku hasarı mekanizması [8].

İnflamasyon cevabı, hasarlı hücre içeriği tarafından tetiklenebileceği gibi, bütünlüğü bozulmuş doku matriksinin kompleman kaskadını ya da makrofajları aktive etmesi yolu ile dendritik ve diğer hücrelerin HSP (heat shock proteinler)'e, nükleer proteinlere ya da heparan sülfatın toll-like reseptörlerine bağlanması yolu ile de tetiklenebilir. İnflamatuvar yanıt her ne kadar hücrelerde özellikle de endotelial hücrelerde ve makrofajlarda başlasa da, bu hücreler de anoksi ve yeniden oksijenlenme sırasında hücre içi Ca^{2+} artışı ile aktive olurlar [8].

İnflamasyondaki olaylar, birbirleri ile bağlantılıdır. ROS, aktive olmuş makrofajlardan, nötrofillerden, endotelial hücrelerden, trombositlerden ve hasarlanmış hücrelerden salınabilir. Sitokin ve kemokinler gibi mediyatörler ise,

makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve endotelial hücreler tarafından oluşturulur ve yine bu hücreleri aktive eder. Azalan / artan NO oluşumu, artan endotelin -1 oluşumu ve kan koagülasyonu mikrovasküler perfüzyonda sorunlar yaratır. İnflamatuar cevap süresince salınan ROS, sitokinler, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), NO'nun yüksek dozları gibi çeşitli bileşenler, sitotoksitate yaratarak hücre hasarını ayrıca indüklerler. ROS'un, özellikle hidrojen peroksitin NF- κ B'yi aktive ettiği bilinmektedir. Aktive olmuş NF- κ B inflamasyonla ilişkili akut faz proteinleri, hücre adezyon molekülleri, hücre yüzey reseptörleri, sitokinler ve kemokinler gibi ürünleri olan genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinden sorumludur [31].

Mikrovasküler düzensizlik yüzünden reperfüzyon ile yeniden oksijenlenme sağlansa bile reperfüzyon fazında hala anoksik hasar devam eder ve reperfüzyon süreci boyunca inflamatuvar cevabın oluşumu ile hücre hasarı sürekliliğini korur.

Sıcak ve soğuk iskemiye takiben oluşan inflamasyon cevabında belirgin farklılıklar meydana gelir. En belirgin gözlemlerden biri endotelial hücreler soğuk iskemiye takiben oluşan reperfüzyonda sıcak iskemiye takiben oluşan reperfüzyona göre çok daha fazla etkilenirler [8].

Deneyisel çalışmaların sonuçlarına göre iskemi-reperfüzyon hasarının erken ve sonradan oluşan hasar olmak üzere bifazik şekilde geliştiği ortaya konmuştur. Erken hasar, ksantin oksidaz (XOD) adı verilen enzimden köken alan reaktif oksijen türlerinin yapımı ile oluşurken, sonradan oluşan hasar, inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve birikimi ile oluşur [31]. Erken hasarda iskemiye maruz kalan organda hipoksi ve hücre membranlarında da XOD kökenli ROS aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonu ile hasar gelişir. Bununla birlikte, ROS hem TNF- α , interlökin 1 β (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin hem de sitokinle indüklenen nötrofil kemoatraktanlarının (CINC) üretimine sebep olur [32]. Sonradan oluşan hasarda ise, nötrofil birikimi reperfüzyon sonrası 24 saat içinde belirgin şekilde gözlenir. Hasarlı dokuda lökosit birikimi karmaşık bir olaydır. Bu süreç, endotel yüzeyindeki adezyon moleküllerini, lökosit-kemotaksis faktörlerini, hücre içi adezyon moleküllerini (ICAM), ayrıca en önemli adezyon molekülleri olan, normalde bazal seviyede olan ancak iskemi sonrası yapımları-ekspresyonları IL-8, IL-1, ve TNF- α gibi iskemik dokudan salınan çeşitli inflamatuvar sitokinlerce artırılan endotelial adezyon moleküllerini kapsar [20].

Yapılan çalışmalara göre deneysel hepatik iskemi reperfüzyon hasarının geç fazında, aktive nötrofillerin rolleri önemlidir. Hepatik inflamasyonun başlangıç aşamasında oluşan ROS, sonraki aşamada ciddi hepatik inflamasyonla sonuçlanabilir. Bu sonuçlara ek olarak, 2001 yılında Yabe ve ark.'larının [33] yapmış olduğu çalışmada I/R ile oluşturulmuş hepatik hasarın, süperoksit dismutaz (SOD) ya da katalaz (CAT) türevleri tedavisi uygulandığında nötrofil kemotaksisini bozduğu için azaldığı ortaya konmuştur.

Reperfüzyonda, özellikle erken reperfüzyon fazındaki hücre hasarı iskemik fazda oluşan hücre içi değişimler sonucu oluşur. Örneğin, iskemik fazda mitokondriyal solunum zinciri enzimleri gibi elektron transferinden sorumlu enzimler hasarlanır. Reperfüzyonda hala elektronlarını oksijene aktarabilen hücreler bunu hasarlı enzimler aracılığı ile yaparlar ve sonuç olarak reaktif oksijen türleri

oluşur ve reaktif oksijen türleri aracılığı ile oluşan hücrel hasar başlamış olur. Benzer bir durum soğuk iskemide de gözlenir. Soğuk iskemide apoptozisi indükler. Soğuk, endotelial hücreler, hepatositler ve renal tübül hücreler gibi çeşitli hücrelerin sitozolik şelat havuzunda demir iyonlarının artışına sebep olur. Reperfüzyonu takiben bu demir iyonları hem apoptotik cevabı tetikler, hem de reaktif oksijen türlerinin oluşumunu sağlar. Her iki örnekte açıklanan, azalmış durumdaki hücrel redoks sistemlerinin artması, iskemik faz süresince demir şelatının indirgenmesinin artması reperfüzyonun başlangıcında hasar oluşumunu kolaylaştırır. Reperfüzyonda hücre hasarı her ne kadar inflamatuvar cevap sonucu oluşsa da hasarı oluşturan bileşenler, iskemide kan akımının azalması-durdurulması ile oluşan oksijensizliğe bağlıdır. Bu bileşenlerin çok çeşitli olmasından dolayı hücre içi hasar süreci karmaşık, uzun süreli ve reperfüzyon süresince devam edebilir tarzdadır [8].

Sitozolik Na^+ ve Ca^{2+} 'un artması, hidrolazların aktivasyonu ve mitokondriyal permeabilitede değişim anoksik hücre hasarı oluşumunda hemen gerçekleşir. Diğer değişimler, özellikle gerçekleşebilmesi ATP varlığına bağlı olanlar sadece reperfüzyon fazında görülürler. Bu sayede, mitojen ile aktive olan protein kinaz ailesi (MAPkinazlar), NF- κ B, ölüm reseptörlerini aktive eden sinyaller ve mitokondriyal apoptotik yolların (aktive edici ya da baskılayıcı kaspazların ve Bcl-2 ailesi üyelerinin aktivasyonu) tamamının reperfüzyon fazındaki hücrel hasar ile ilişkili olduğu söylenebilir [8].

2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Bir veya daha fazla orbitinde eşlenmemiş elektron bulunan atom veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanır [22, 34]. Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir çift elektron taşıyan kimyasallar olduğu için, son derece reaktif ve kararsızdırlar. Bu nedenle herhangi bir molekül veya atom ile etkileşime girerek, o yapıdan bir elektron alma veya bir elektron verme eğilimindedirler. [34, 35]. Organik ve inorganik kimyasal maddelerle, proteinlerle yağlarla karbohidratlarla kısmen de hücre membranları ve nükleik asitlerle reaksiyona girerler [22]. Canlılarda ROS, ekzojen ve endojen, fizyolojik veya patolojik mekanizmalar sonucu oluşabilir.

Biyolojik sistemlerle ilişkili başlıca oksijen türevli serbest radikaller şunlardır;

1. Süperoksit anyonu;
2. Peroksil radikali;
3. Hidroksil radikali;
4. Nitrik Oksit
5. Singlet oksijen [36].

İskemi boyunca ATP, hipoksantin yapımı için katalizlenir. Fizyolojik şartlar altında hipoksantin, ksantin dehidrogenaz (XDH) yolu ile ksantine okside olur. İskemi süresince, hücre içi Ca^{2+} miktarında artış ve iskemik süre ile orantılı olarak XDH'nin, ksantin oksidaza dönüşümü görülür. İntestinal dokularda diğer dokulara oranla daha hızlı olan bu reaksiyonda XO ölçümü intestinal iskeminin belirlenmesinde güvenli bir yoldur [22].

Reperfüzyonda oksijen yeniden dokulara geldiğinde, hipoksantin ve XO ile reaksiyona girerek, SOD enzimi aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'e dönüşecek olan süperoksit anyonunu oluşturur. CAT ya da glutatyon peroksidaz (GPX) enzimleri yolu ile H_2O_2 'e dönüşür. Demir iyonları varlığında, süperoksit anyonu ve H_2O_2 , Haber Weiss ve Fenton reaksiyonları ile oldukça reaktif ve sitotoksik olan hidroksil radikallerini ($OH\cdot$) oluşturur. Hidroksil radikalleri, hücre membran komponentlerinde lipid peroksidasyonunu başlatır, bu olay ödem oluşumuna, hücre içi elektrolit konsantrasyonunda değişimlere, hücre fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne yol açar [37].

Nötrofillerin ve kompleman yolağının aktive olması, hücre toksinlerin ve granülositlerin mikrovasküler endotelyuma yapışmasını artıran maddelerin salınması sonucu granülositlerin endotelial hücreye tutunmaları ve sonrasında süperoksit ve çeşitli proteazları salgılamaları yüzünden serbest radikallerin etkisi ile oluşan hasar daha da ağırlaşır, sistemik hale gelir [37].

Süperoksit radikalleri, hidroksi radikaller ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, doğrudan ya da dolaylı yoldan dokunun canlılığını yitirmesine ve fonksiyon kaybına, kısaca doku hasarına sebep olurlar [38]. İnflamasyon, aterosklerosis, apoptozis ve iskemi reperfüzyonda oluşan doku hasarı bu duruma örnektir [38].

Reaktif oksijen radikalleri arasında, midede I/R sonucu oluşan hasarın en büyük sorumluları, süperoksit radikalleri ve hidroksi radikallerdir. Diğer yandan vasküler endotelial hücrelerden salınan NO, kan basıncı düzenlenmesinde, vasküler tonusta, nöronal sinyalizasyonda, immünolojik fonksiyonlarda ve diğer pek çok fizyolojik olayda görevlidir. Sindirim sisteminde, NO gastrik mukozal kan akımının ve mukus sekresyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Bununla birlikte etanol, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID), suya batırma stresi ve iskemi reperfüzyon gibi çeşitli hasar modelleri ile midede oluşturulan mukozal lezyonlarda, NO'nun sitotoksik mi yoksa sitoprotektif mi olduğu hala açık değildir [38].

Serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimler ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücre antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki, bir denge oluşturmaktadır [39, 40].

Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini ve bu ara metabolitlerin oluşturduğu oksidatif stresi azaltmak üzere fonksiyon yaparlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir [39, 40, 41].

Reperfüzyon sonrasında intestinal hasarı indükleyen oksijen molekülünden yapılan serbest radikallerin kaynağı mitokondride bulunan elektron transport zinciri,

ksantin-ksantin oksidaz metabolizması, endotelial hücreler ve aktive nötrofillerdir [8].

Normal şartlarda oksijen molekülü suyu oluşturmak üzere mitokondrideki sitokrom sistemine aktarılır. Bu oksijenin % 1 veya 2'si yolaktan kaçarak oksijen kökenli serbest radikalleri oluşturur. Normal şartlarda, oluşan bu serbest radikaller endojen antioksidan enzimlerce nötralize edilir. Fakat reperfüzyon süresince aşırı miktarda serbest radikal oluşumu gözlenir. Bu aşırı serbest radikallerden dolayı oksidatif stres ve bunu takiben zararlı etkiler gözlenir [22].

NO ile peroksinitriti oluşturmak üzere reaksiyona giren süperoksit iyonları lipid ve protein oksidasyonunu yoğunlaştırır. Bunu takiben hüresel hasar gelişir. Tüm hüresel yapılar ROS'un aktivitelerine karşı dayanıksızdır. Hücre membranı, hüresel yapıda ve membran permeabilitesinde değişimlere sebep olan lipid peroksidasyonundan fazlaca etkilenir. Yağ-radikal reaksiyonları kendileri de serbest radikal olan lipidik peroksidazların salınması, sonrasında da diğer yağ asitlerinin indirgenmesini başlatır. Sonuç olarak, iyon değişiminde seçicilik kaybı ve lizozomlardan salınan hidrolitik enzimler gibi organel içeriklerinin salınması sonucu hücre ölümü gerçekleşir. Lipid peroksidasyonunu hızlandırmasının yanı sıra, ROS'un nötrofilleri aktive etme ve çekme kapasitesi vardır. İnflamatuar hücrelerin fonksiyonu I/R süresince üretilen kemoatraktanlar (C5a, IL-8, LTB₄, PAF) tarafından ve hem inflammatuar hücre yüzeyinde hem de endotelial hücre yüzeyinde bulunan adezyon moleküllerince düzenlenir. Lökosit-endotelyum etkileşimini sağlayan adezyon molekülleri, selektinler, integrinler ve immünoglobulinlerdir (hücre içi adezyon molekülü-1(ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1(VCAM-1)) [22].

Lökositlerin göçünde gerçekleşen olayların sırası, lökositlerin damar duvarına yaklaşmaları, endotelyum tabakası üzerinde dönmeleri, endotelden geçmeden önce endotele yapışmaları ve son olarak endotelden geçişlerdir. Aktive olmuş nötrofiller, adezyon ve takiben migrasyon olayları sonunda endotelyumdan geçtikten sonra, geçtikleri alanda serbest radikalleri ve proteolitik enzimleri (kollajenaz, elastaz, katepsin-G) salgılayarak bölgesel yıkıma sebep olurlar. Aktive olmuş nötrofillerin akciğer ya da diğer organları istila etmesi, çoklu organ yetmezliğinin gelişiminde önemli bir basamaktır. Normal sıçan bağırsağında, ICAM-1 ve VCAM-1 vasküler endotelyumda vardır. I/R cevabında ise, vasküler endotelyum hücrelerinde, bağ dokuda, lamina propriada ve de inflammatuar hücrelerde aşırı ekspresyonu gerçekleşir. Aşırı ekspresyon, I/R boyunca lökosit adezyonunu ve hasarlı alana geçişi hızlandırır [22].

NO, kardiyovasküler sistemde oldukça güçlü bir regülatör, mide kanlanmasında önemli bir endojen vazodilatördür [42, 43]. Ayrıca, periferik sinir sistemi fonksiyonlarında, immün fonksiyonlarda ve diğer homeostatik mekanizmalarda görevlidir [44]. Endotelial hücrelerde üretilen NO vasküler fonksiyonu ile kan basıncının düzenlenmesi gibi önemli rollere sahiptir. Bunlara ek olarak, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, iskemik koruma, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve anti-aterojenik özellikleri dolayısıyla son derece önemli bir moleküldür [42]. NO, mide mukozal bütünlüğünün korunmasına, duysal nöropeptidler, endojen prostaglandinler gibi diğer koruyucu mediyatörlerle

etkileşerek ve cGMP aracılı olarak mukus ya da bikarbonat sekresyonunu sağlamak yolu ile yardımcı olduğu için NO'nun mide mukozasında koruyucu rolü olduğu görülmektedir.

Fizyolojik olarak cNOS tarafından oluşturulan NO, mukozal perfüzyona yardımcı ve çeşitli uyarılara karşı sindirim sistemi mukozasını koruyucu roledir. Ancak iNOS aktivasyonunu takiben NO'nun aşırı üretimi patofizyolojik olaylarla ilişkilendirilmiştir [44]. Peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türlerinin sebep olduğu oksidatif stres ve buna bağlı mukozal hasar bu olaylara örnek verilebilir [43]. Aşırı NO'nun dolaşım salı ve inflamasyon ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [1, 44]. İnflamasyon durumunda NO'nun aşırı üretiminin iNOS aracılı olduğu kesinleşmiştir [44].

Endotelial fonksiyon bozukluğuna, azalan prostasiklin salımı ve vazokonstriktör maddelerin üretiminin artışı neden olabilir. Anormal vazodilatör cevapla ilişkilendirilmiş bu endotelial değişimlerin mekanizmaları tam anlaşılacak kadarıyla beraber, NO aktivitesinin bu anormalliklerin oluşumunda temel rolü oynadığı düşünülmektedir. Endotelial hücrelerde yapılan NO, hem trombosit adezyonunu ve aktivasyonunu inhibe ederek hem de sub endotelial boşluğa nötrofil ve monosit adezyonunu ve göçünü inhibe ederek vasküler bütünlüğü sağlar. Ayrıca NO, kan akımının otoregülasyonu ile ilişkilidir. Hem büyük arterler hem de mikro dolaşım seviyesindeki damarlarda, vasküler yataktaki kan akımının dağılımında önemli bir belirleyicidir [45].

I/R boyunca üretilen serbest radikaller içinde NO oldukça önemlidir. NO, nöronal ve epitelial hücrelerde bulunan yapısal NOS (NOS-1, cNOS), ilk defa makrofajlarda tanımlanmış ama günümüzde makrofajlarla birlikte, vasküler düz kas hücreleri, nötrofiller, endotelial hücreler, mesangial hücreler, kondrositler gibi pek çok hücrede ekspresyon edildiği bilinen indüklenebilir NOS (iNOS, NOS-2) ve endotelial hücrelerde bulunan, NOS-3 olarak da adlandırılan eNOS olmak üzere 3 izoformu bulunan NO sentaz (NOS) aracılığı ile L-arjininden sentezlenir [42, 43, 44, 46].

NO'nun, iNOS aracılığı ile aşırı olarak sentezlenmesi bağırsakta oluşan I/R hasarının oluşumuna katkıda bulunur. Bununla birlikte NO, cNOS aracılığı ile sürekli olarak sentezlenmekte ve I/R hasarının başlangıcında koruyucu etkili olduğu bilinmektedir. NO faydalı vazodilatör etkilerini, mikrovasküler sistemde vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesini sağlama yolu ile gösterirken, aynı zamanda NO, sitotoksik radikallerin üretimi ile ilişkilidir. NO çeşitli dokularda hücre içi sinyalizasyonda oldukça önemli bir mediyatördür, faydalı bir ikinci habercidir, fakat oksidatif stres durumunda tamamiyle toksiktir [45]. Sıçanda mezenterik reperfüzyon ile indüklenen inflamasyonda, artan iNOS ekspresyonu lipid peroksidleri ve yüksek NO yapımı ile karakterize oksidatif ve nitrosatif stres ile sonuçlanır. Doku iskemi reperfüzyonu, protein aktivatör-1 (PA-1) ve NF-κB gibi pro-inflamatuar genlerin ekspresyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri ile etkileşecek olan protein kinazları aktive eder. Bu süreç sonunda, iNOS, fosfolipaz A₂ (PLA₂), COX gibi enzimler, TNF-α, IL-1, IL-6 gibi sitokinler ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin yapımı artar [22].

NF-κB normal şartlar altında sitoplazmada bulunurken, iskemi gibi durumlarda nükleusa transloke olarak, inflamatuvar cevapta görevli olan iNOS ve COX-2 genlerinin transkripsiyonu regüle eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür [22, 47]. NF-κB'in intestinal I/R sonrası lezyon oluşumunda ve sonlanmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir. NF-κB, I/R sonucu bağırsakta meydana gelen sepsis, sitokinler ve oksidatif stres gibi proinflamatuvar uyarılar tarafından aktive olur. NF-κB'nin aktivasyonu sonucu, inflamatuvar cevabın düzenlenmesi ve mediyatör sentezi ile ilişkili proteinleri kodlayacak pek çok genin koordineli ekspresyonu sağlanır. NF-κB aktivasyonu anti-inflamatuvar tedavi için belirleyicidir. Kompleman sisteminin aktivasyonu, NF-κB'nin çekirdeğe translokasyonuna ve bunu takiben iNOS transkripsiyonunda artışa sebep olur [22].

Kompleman sisteminin I/R ile oluşan lezyonların patogenezinde önemli fonksiyonu vardır. Kompleman sisteminin aktivasyonu süperoksit anyonunun üretimini, hem nötrofillerin aktivasyonunu sağlayarak hem de reperfüzyon sonrası SOD seviyelerini düşürerek yapar. Kompleman sistemindeki bir bozukluk ya da inhibisyon, I/R sonucu oluşan hasarda görevli pek çok mediyatörün azalmasına sebep olur. Kompleman C5'in intestinal lezyonlarda TNF-α, ICAM-1 ve interlökin 1 alfa (IL-1α)'nın regülasyonundan sorumlu olduğu ve kompleman sistemini bloke etmenin dokuları reperfüzyon hasarına karşı koruduğu bilinmektedir. Sıçanda I/R sonrasında aktive komplemanın ürünlerinin intestinal epitelyumda iNOS ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. İntestinal iskemide nötrofil aktivasyonu yine kompleman sistemi aracılığı ile gerçekleşir [22].

2.3. Mukozal Savunma

Gastrointestinal sistemi, hemen hemen her besin alımından sonra hidroklorik asit (HCl), proteolitik enzimler ve safra gibi epiteliyal hasar oluşturma kapasitesi yüksek olan çok sayıda maddeye maruz kalmasına rağmen, sindirim sistemi mukozasında önemli hasar oluşumu çok nadirdir. Gastrointestinal sistemin kendini koruma yeteneği vardır. Bunun sebebi mukozal savunmadır. Mukozal savunma ve agresif faktörler arasındaki dengenin bozulması, mukozal savunma komponentlerinin azalması veya tehlikeli ajanların artması durumunda ülser oluşumu gözlenir [13].

Yüzeysel bir mukozal hasar görüldüğünde, fiziksel travma, aspirin, alkol, sıcak veya soğuk besinler enfeksiyonlar gibi zararlı etkenlere mazruz kalan mukozada oluşan hasar hızlıca onarılır. Gastrointestinal sistemin her segmenti hasara karşı koruyucu, gelişmiş savunma mekanizmalarına sahiptir. Özefagus, squamatöz tipte epitelyum tabakası sayesinde göreceli olarak geçirgen değildir. Aynı zamanda glandular sekresyonlar nedeniyle avantajlıdır. Midenin sepsis, yanık yaranlanması, travma ve çoklu organ yetmezliği gibi durumların sebep olduğu strese karşı oldukça hassas bir organ olmakla beraber, çeşitli savunma mekanizmalarını devreye sokarak kendini koruduğu bilinmektedir [48, 49]. Mide hücreler arası sıkı bağlantılar ve HCl'yi nötralize etmekte olan bikarbonat (HCO₃⁻) sekresyonu ile kendini korurken, bağırsakta da benzer şekilde güçlü mukozal savunma ve onarım mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, mukozal hidrofobisite, mikrodolaşım, koruyucu PG'lerin üretimi, duysal sinir liflerinden salınan vasoaktif nöropeptidler ve mukoza sülfidrilindeki artış sayılabilir [50].

Mideye uygulanan hafif iritan maddeler sonucu, mukozal kan akımının artışı, asit sekresyonunun azalması gibi savunma mekanizmalarının hızlıca etkinleştirilmesi sayesinde, gastrik mukozanın yüzey epitelyumunda makroskopik, gözle görülür hasar nadiren gözlenir [35]. Midenin mukus salgısı mukozal koruma için oldukça önemli bir bileşendir. “Bariyer” fonksiyonundan ayrı olarak mukus, mide epitelyal hücrelerini ksantin/ksantin oksidaz sisteminin ürünü olan oksijen metabolitlerine karşı korumaktadır. Midenin epitelyumu, mukus ve bikarbonat sekresyonlarından oluşan kesintisiz bir tabaka ile kaplıdır. Bu tabaka asit ve pepsin ile sindirime karşı mukozayı korumaktadır. Bu özelliği mukusun bariyer özelliği olarak adlandırılır [51].

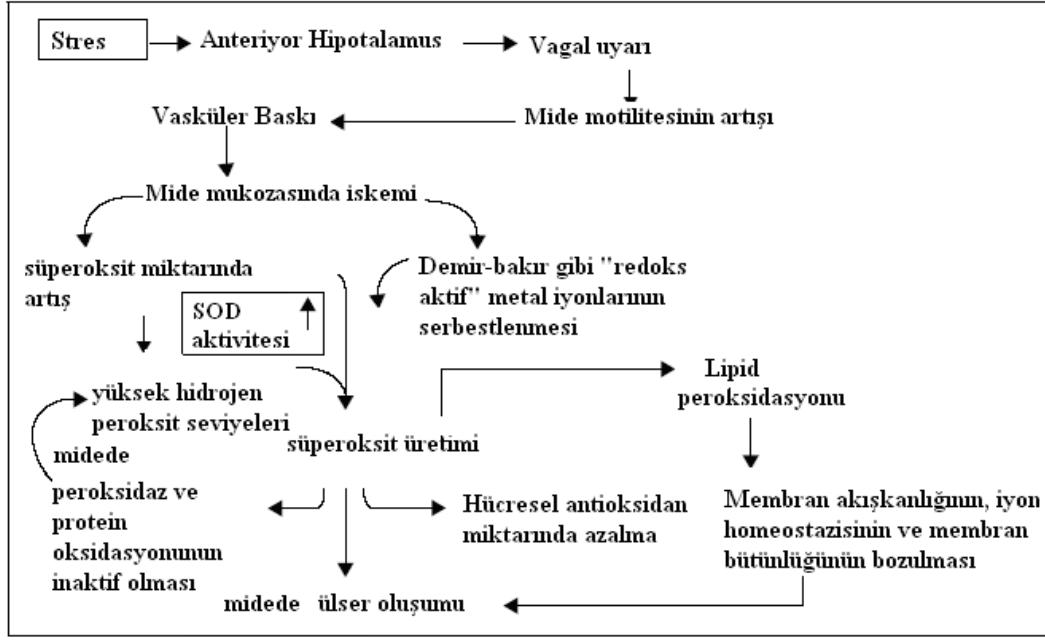
Duedonumun en önemli korunma mekanizması, hücre içi pH'nın korunmasına yardımcı olan HCO_3^- sekresyonudur. Ayrıca bu mekanizmalara ek olarak, yüksek hızda hücre yenilenme, etkili mukozal kan akımı, kesintisiz mukus tabakası, onarımı ve diğer koruyucu faktörleri uyaran regülatör peptidler sayılabilir. [34].

Reaktif oksijen türleri hücre hasarının oluşumunda esas rolü üstlenmiştir. (Şekil2.3.). Biyolojik sistemlerde fizyolojik şartlar altında, moleküler oksijenin yaklaşık olarak % 95'i mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ile suya dönüştürülür. Kalan oksijen süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri olarak adlandırılan reaktif oksijene indirgenir [34].

Gastrointestinal sistemde lamina propriadaki dinlenme durumundaki lökositlerde (makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller) ksantin oksidaz, amin oksidaz, aldehit oksidaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrat oksidaz (NADPH oksidaz) gibi mukozal oksidazlar yolu ile bol miktarda reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. İnflamasyon ve nötrofillerin çeşitli proinflamatuvar sitokinlerce göçü ile ROS yapımı daha da artar.

Aspirin, etanol, iskemi reperfüzyon, *H. pylori* ve stres kaynaklı gastrointestinal sistem hasarları ROS yapımına bağlı mekanizmalarla ilişkilidir

Mukozal savunmanın temelindeki mekanizmaların anlaşılması, anti-ülser tedavilerinin geliştirilmesi açısından son derece önemlidir [14]. Mide mukozası, aspirin, alkol, *H. Pylori* ile ilişkili gastrotoksinler, stres gibi zararlı ajanlara maruz kalmaya devam ettikçe hasar oluşumuna karşı direnci artar. Buna gastrik adaptasyon denir [52]. Gastrik adaptasyon, gastrik kan akımının artması ve Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve tümör büyüme faktörü (TGF) gibi bazı büyüme faktörleri tarafından mukozal hücre proliferasyonunun, arttırılması ile ilişkilidir [53].



Şekil 2.3. Reaktif oksijen türlerinin hasar oluşturma mekanizması [34].

2.4. Mukozal Savunmanın Yapısal Özellikleri

2.4.1. Mukus Bariyeri

Mide-bağırsak mukozası, hidrojen iyonları, diğer kimyasallar, bakteriyel toksinler gibi epiteliyal hücelere girebilecek makromoleküllere karşı bariyer oluşturan kesintisiz bir mukus jel tabakası ile kaplıdır. Epiteliyal hücelere tarafından yapılan trefoil peptidleri mukusun viskoz bariyer özelliklerinin stabil kalmasını sağlar. Midedeki mukus, lüminal sıvı içinde çözünebilir ve mukozal hücelerele musiparöz hücelere çevreleyen çözünemez formdaki (adherent) mukus olmak üzere çeşitli formlarda bulunabilir. Adherent mukusun mide mukozasındaki esas koruyucu faktör olduğu düşünülmektedir. Mukusta meydana gelen azalma, mide mukozasını çeşitli agresif faktörlerin oluşturduğu hasara karşı daha dayanıksız hale getirir [50]. Mide mukusu antioksidan özelliklere sahiptir ve mukusu oluşturan glikoproteinler, ksantin/ksantin oksidaz sistemi kökenli serbest oksijen radikallerine karşı korucuyu etkilidir [51].

Mukus jelinin, bileşenlerinin kimyasal yapısı belirlenmiştir. Müsinler, ağırlıklı olarak glikozile olmuş MUC familyasının proteinlerinden oluşmuşlardır. İnsan midesindeki mukus hücelerele mideye spesifik spektrumda özellikle MUC1, MUC5-AC, MUC6 gibi müsinleri eksprese eder. Peptik ülser hastalarından toplanan mukus örnekleri sağlıklı insanların mukus örneklerine göre daha bozunmuş durumdadır [54].

Yapılan çalışmalarda, yüzeydeki aktif fosfolipidlerin mukus jeline koruyucu hidrofobik özellikler kazandırdığı gösterilmiştir. NSAID'lerin mukoza üzerindeki zararlı etkileri mukozadaki yüzey fosfolipitlerinin hidrofobik özelliklerinin

azalmasına bağlıdır. Bu nedenle fosfatidilkolin uygulaması insanda aspirinin sebep olduğu hasarı azaltmaktadır [54].

Mukozal savunma mekanizmalarının büyük çoğunluğu endojen veya ekzojen PG'ler tarafından uyarılır. Endojen PG'ler, akut hasara karşı oluşturulan mukozal korunmayı sağlayan, yapımından COX enzimlerinin sorumlu olduğu ürünlerdir. PG'ler, midedeki asit sekresyonu, mukus ve bikarbonat üretimi, mukozal kan akımı ve epiteliyal hücre çoğalma hızı gibi çeşitli fizyolojik olaylarla ilişkilidir [55]. PG'ler arasidonik asit (AA) metabolizmasının en önemli ürünleridir [56]. Mukozal bütünlüğün sağlanması PGE₂ ve PGI₂'nin sürekli üretimine bağlıdır. PG'ler özellikle PGE₂, hücre çoğalmasını, tümör gelişimini etkilerken aynı zamanda malign hücrelere karşı oluşturulan immün cevabı da baskılar [57]. Prostaglandinlerin yüksek seviyeleri, malign hücrelerin gelişimine yardımcı olmaktadır.

M.Takeeda ve ark.larının [35] çalışmasına göre günlük %0.1 iodoacetamide uygulanarak oluşturulan gastrit modelinde, COX-1 ve COX-2 kökenli PG'ler inflamasyonlu midede mukozal savunmaya, asit sekresyonunu azaltarak ve mukozal bütünlüğün devamlılığını sağlayarak katkıda bulunmaktadır.

COX aracılı mukozal PG sentezinin, NSAID ile inhibisyonu veya spesifik antikorların neden olduğu PG nötralizasyonu gastroduodenal ülserleşmeye yol açmaktadır [55].

2.4.2. Epiteliyal Hücre Bariyeri

Epitelyum, mukus tabakasının altında epitelyum, hücre yapısı ve hücreler arası sıkı bağlantı ile karakterize olan ikinci bir savunma hattı oluşturur. Epiteliyal bariyerin özelliklerinden birisi de, Na⁺/H⁺ değiştirici mekanizması ve Na⁺ / HCO₃⁻ birlikte taşıma mekanizması tarafından kontrol edilen intraselüler pH'nın regülasyonunu sağlamasıdır. Bunun yanı sıra, bariyeri oluşturan epitelyum hücrelerinin mikrobial bir atak tehditi olduğunda kemokinleri sekrete edebilme yetenekleri vardır [54, 58].

2.5. Akut Gastroduodenal Savunmanın Fizyolojik Mekanizması

2.5.1. Mukus Yapımının Düzenlenmesi

Gastroduodenal mukozal bariyer sadece yapısal olarak mukus tabakası ve epiteliyal hücreler olarak tanımlanmamıştır. Bu bariyer savunma özelliklerinin devamlılığından sorumlu fizyolojik olaylara bağlıdır. Mide mukozasında mukus yapımı ve sekresyonu PGE₂ tarafından EP₄ reseptörleri yolu ile stimule edilir [54, 59]. EGF'in insan ve sıçan muköz hücrelerinde mukus sentezini artırıcı fizyolojik bir rolü vardır [54].

2.5.2. Bikarbonat Sekresyonunun Düzenlenmesi

Bikarbonatın (HCO₃⁻) mukus tabakasına sekrete edilmesi, lümen den gelen H⁺ iyonlarının nötrale edilmesi için önemlidir. HCO₃⁻ iyonlarının sekresyonu lümenal asidifikasyon ve PG'ler tarafından kontrol edilir. Takeuchi ve ark.ları [60] tarafından, PGE₂'nin HCO₃⁻ sekresyonunu sıçan ve fare midesinde EP₁ reseptörleri, duodenumda ise EP₃ reseptörleri aracılığı ile stimule ettiği gösterilmiştir. HCO₃⁻

sekresyonunun stimülasyonunun düzenlenmesinde sıçanda γ -aminobutirik asit ve ET_A reseptörleri yolu ile aktive olan endotelin-1 görevlidir [54].

2.5.3. Mukozal Mikro Dolaşımın Düzenlenmesi

Tüm savunma ve onarım mekanizmaları yeterli derecede kan akımının sağlanmasına bağlıdır. İskemi, GI sistem mukozasının koruyucu mekanizmalarının etkisini tehlikeye atar ve GI sistemi bakteri geçişlerine ve sistemik hastalıklara açık hale getirir [54].

Asit ile uyarılan duodenumda mukozal kan akımının (MKA) artışı, aynı zamanda epitelyumda intraselüler pH'nın düşmesi ile paralellik gösterir [61, 62]. Bu da epitelyal hücrelerin lüminal asit değişimine cevaben mukozal vasodilatasyon için sinyal oluşturmalarını sağlar. Bu sinyal bazolateral Na^+/H^+ değiştirici sistem aracılığı ile H^+ iyonlarının atılmasını sağlayabilir. İnterstisyel asitlik, aside duyarlı sinir liflerini uyararak kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) salınımını ve CGRP aracılı NO üretimini artırarak, muskular kan akımını kontrol eden submukozal arteriyollerde vasodilatasyonu sağlamış olur [54].

Mide-bağırsak mukozasındaki hasar genellikle mikro dolaşımda meydana gelen bozulmalarla ilişkilidir. Etanol ile oluşturulan hasarda, mast hücrelerinin degranülasyonu ve bunun sonucunda da çeşitli zıt etkileri olan mediyatörlerin salınımı gerçekleşir. Sıçan midesinde mast hücre degranülasyonu ve bunu takiben trombosit aktive edici faktör (PAF) salınımı, *H. pylori* ve suya batırma stresi ile oluşturulan mide hasarında MKA'nın azalmasından sorumludur. Substance P tarafından salınan mast hücre proteazları, asit ile artışı uyarılan gastrik MKA'yı ve vasodilatör peptid CGRP yi parçalama özellikleri sayesinde inhibe ederler [54].

Mikrodolaşımdaki bozulmaların yanı sıra endotelin-1, NO, prostasiklin (PGI_2) gibi vasküler endotelial habercilerdeki dengesizlik de mukozal hasara sebep olur [54, 63, 64, 65]. Örneğin, bir vasokonstriktör haberci olan endotelin-1, sıçan midesinde *H. Pylori*, lipopolisakkarit, indometazin ve ET_A/ET_B reseptör antagonistleri karışımı uygulandığında, sentezi artar ve mide mukozasını korur. Vasokonstriktör etkili olan anjiyotensin II nin etkisi tam olarak açıklanmamıştır [54].

Sıçanda suya batırma stresi uygulanarak oluşturulan mide hasarı modelinde, vasodilatör olan NO'nun disfonksiyonunun midede MKA'nın düşürülmesine katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Her ne kadar NO'nun NOS aracılığı ile fizyolojik yapımı yararlı olsa da, iNOS aracılı, fazlaca üretimi midede vasküler ve mukozal hasarı ağırlaştırmaktadır [63].

2.5.4. Gastroduodonal Motilitenin Düzenlenmesi

Mukozal savunma, motor aktivitede özellikle otonom ve enterik sinir sistemi gibi çoklu kontrol mekanizmalarınca yönetilen itici motilitenin inhibisyonu ile desteklenir. Motilitedeki koruyucu değişime, aşırı miktardaki asidin duodenuma girmesi ile meydana gelen mide gevşemesi örnek verilebilir. Bu cevap sekretin, kolesistokinin gibi endokrin faktörler ve vagus siniri gibi nöral reflekslerle düzenlenir. İnsanda antral motor aktivite ve mide boşalması, endojen NO tarafından

azaltılır. Bu da inhibitör motor nöronlardan salınan NO'nun koruyucu etkili olduğunun göstergesidir [54, 66].

2.6. Afferent Duysal Nöronların Özelliği

Etkili bir gastroduodenal savunmada koruyucu mekanizmaların aktive olabilmeleri için hızlıca uyarılmaları gerekir. Nöronlar en hızlı haberleşme sistemidir. GI mukozada dorsal kök ganglionundan köken alan bir grup ekstrinsik afferent duysal nöron, lokal alarm oluşturma görevindedirler. En önemli haberciler CGRP₁ reseptörü aracılığı ile aktivite gösteren CGRP ve NO'dur. CGRP içeren sinir lifleri insan mide mukozasında bulunur ve ülser sınırında bu sinirlerin yoğunlukları artar. Kimyasal maddeye duyarlı afferent lifler gastroduodenal MKA'yı, mukusu ve HCO₃⁻ sekresyonunu artırırken, asit sekresyonunu ve motiliteyi azaltarak, mukozal savunma için uygun ortamı sağlarlar [54, 67].

Midedeki nöral alarm sistemi sadece periferdeki uyarılarla değil, aynı zamanda beyin kökünden gelen uyarılarla da gerçekleşir [61].

2.7. Mukozal Bütünlüğün Sağlanmasında Bağışıklık Sisteminin Rolü

Mide-Bağırsak mukozasının bütünlüğü nötrofiller, makrofajlar, eozinofiller mast hücreleri ve antibiyotik peptidleri salan panet hücreleri gibi mukoza ile ilişkili lenfoid doku tarafından desteklenmektedir. Önemli bir nokta da mukozadaki epiteliyal hücreler, mikrobiyal atak ya da diğer hasar durumlarında hasarlı bölgeye diğer immün hücrelerin gelmesini sağlayacak olan kemokinleri salgılayacak kapasitesindedir [54, 67].

GI sistemde ne zaman bir hasar, enfeksiyon, ya da alerji olsa, bağışıklık sistemi inflamatuvar reaksiyonu başlatacaktır. Bu cevabın oluşumu ve doku fonksiyonuna etkileri çok sayıda sitokin tarafından yönetilir. Örnek olarak mide epiteliyal hücreleri *H. pylori*'ye maruz kaldıklarında, NF-κB aktivasyonuna ve bunu takiben çeşitli sitokin ve kemokinlerin sentezine sebep olurlar. Bunların arasında IL-8 önemli bir yere sahiptir. Çünkü IL-8 nötrofillerin toplanması ve gastritin başlamasından sorumlu kilit moleküldür. Bir defa inflamatuvar hücreler aktive olduklarında çeşitli IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 gibi çeşitli proinflamatuvar ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler inflamatuvar alana gelirler [68].

IL-1β, proinflamatuvar bir sitokinin prototipi oluşurken, doku hasarı ile ilişkili inflamatuvar yanıtın oluşumunda rolü olan çeşitli genleri düzenler. Örneğin IL-1β NF-κB, iNOS ve pro-apoptotik protein Bax'ı indükleyerek apoptozisi artırır [61]. Benzer apoptotik süreç *H.pylori* enfeksiyonunda da gözlenir. Ek olarak, IL-1β tirozin kinaz, protein kinaz C (PKC) ve çoklu mitogen activated protein kinazları etkileyerek mide epiteliyal hücrelerin çoğalmasını inhibe eder. IL-1β ve TNF-α'nın hücrelerde IL-8'i indüklemeye özelliği NF-κB ye bağlı tarzda gerçekleşmesi inflamasyonun devamını sağlar. IL-1β ve TNF-α'nın bu etkisi, epiteliyal hücrelerin inflamatuvar yanıtı karşı oluşturdukları davranışı baskılayıcı yeteneğinde olan ülser tedavisinde kullanılan ilaçlar tarafından baskılanmaktadır [54].

Sitokin sentezi, nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyon sindirim sistemi mukozasındaki kimyasal hasar ile tetiklenir. Örneğin; asetik asitin indüklediği mide

ülseri oluşumunda ve ülser tabanındaki fibroblastlarda, monositlerde makrofajlarda, IL-1 β 'ye rastlanır [54]. Aspirin ve diğer NSAID'ler IL-1 β ve makrofajlarda bulunan TNF- α yapımını artırır. Bu sitokinler mide mukozasındaki epitelial ve endotelial hücrelerde kaspaz-1'i ve kaspaz-3'ü uyararak apoptozise, takibinde de hasar oluşumuna katkıda bulunurlar. Sucralfat ve sulglikotid gibi anti-ülser ilaçların, indometazin ya da *H.pylori* lipopolisakkaridinin oluşturduğu inflamatuvar ve apoptotik etkileri ortadan kaldırıcı etkileri vardır [69].

2.8. Lüminal Asit Sinyalinin Efferent Sinir Cevaplarında İletimi

Aside maruz kalan mukozanın hasara karşı direnci, güçlü savunma mekanizmalarının varlığına bağlıdır. Bu mekanizmalar, lüminal asidin varlığına cevaben aktive olan hormonal ve nöral faktörler tarafından düzenlenir ve mukozayı tehlikeye karşı korur. Lüminal asit sinyalinin efferent sinirlere iletimi sayesinde, HCO₃⁻ salgısında ve kan akımında artma gözlenir. Yeni bulgulara göre, duodenal transmukozal asit difüzyonu, karbonik anhidraz aktivitesine bağlıdır. Karbonik anhidrazlar, karbonik asiti (H₂CO₃) su (H₂O) ve karbondioksit (CO₂) dönüşümünü kolaylaştıran enzimlerdir. H₂CO₃, CO₂ ve H₂O'dan oluşur, H⁺ ve HCO₃⁻ a ayrılır. Son dönemde yapılan çalışmalarla, lüminal H⁺'in, ekstraselüler karbonik anhidraz enzimi ile CO₂ ye dönüştüğü bunu takiben oluşan CO₂'nin hücreye diffüze olduğu, hücre içinde CO₂'nin yeniden H⁺ e dönüşüp, sitoplazmada subepitelial interstisyuma taşındığı, burada transient reseptör katyon kanalı vanilloid-1 (TRPV-1) gibi asit sensorlarını uyararak efferent koruyucu cevabı oluşturduğu ortaya konmuştur [34].

Çeşitli çalışmalarda mide asidine duyarlı mekanizmaların özellikleri incelenmiştir. Mide çok yavaş transmukozal asit geçişi ile karakterize sıkı epitelyum ile kaplıdır. Bununla birlikte, çeşitli araştırmacılar, submukozada TRPV-1 ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. İmmunohistokimyasal çalışmaların bulgularına göre, TRPV-1 arteriyollerin çevresindeki perivasküler boşluklarda ve düz kas tabakalarında, lokalizasyon göstermektedir. Duysal sinirlerin belirleyicisi olan CGRP ile benzer lokalizasyondadır. Diğer bir çalışmada mide paryetal hücrelerde ve mukozal yapılarında TRPV1 varlığı gösterilmiştir [70, 71].

2.9. Gastrodedonal Savunmanın Son Aşaması; Hızlı Onarım ve İyileşme

Mukozadaki tüm akut savunma sistemleri baskılandığında hasar görünür hale gelir. Mukozal savunmanın son basamağı yaralı bölgenin onarılmasıdır. İlk olarak, yüzey epitelinin devamlılığı, mukozal hücrelerinin lateral migrasyonu ve uzamasını içeren onarım işlemleri yolu ile yeniden oluşturulur. Epitelyumu onarmaya yönelik uğraşlar, inflamasyonla uyarılan hasarı takiben başlar ve trefoil peptidleri, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından yönetilir. Mukoza onarımının sonlanması için, hasarlı dokunun yerini hızla çoğalan dokuya bırakması, anjiogenezis, normal mukozal yapının yeniden oluşması ve fizyolojik rolünü geri kazanması gerekmektedir [54].

İyileşme süreci boyunca, hasarlı mukozanın toparlanması için iNOS ve cNOS gibi pek çok faktörün ekspresyon seyirindeki değişim önemlidir. Asit ile uyarılan sıçan mide mukozası ülselerinde, onarım başlamadan önce, proinflamatuvar etkili iNOS miktarı IL-1 β tarafından artırılır. Deneysel lezyon iyileştikten sonra iNOS aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir [54].

Mukozal onarımın tüm basamakları, büyüme faktörlerinin düzenleyici kontrolleri altındadır. Köpek oksintik mukoza hücre kültüründe, yara onarımının temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), EGF, TGF- α , insülin benzeri büyüme faktörü-1, trefoil peptidleri tarafından artırıldığı gösterilmiştir [54]. EGF reseptörleri EGF ve TGF- α tarafından aktive olur ve sıçan gastroduodenal epiteliyal hücrelerinde bulunur. Bu reseptörler sadece epiteliyal hücre göçünü değil, aynı zamanda mukozal proliferasyonu da yönetirler. TGF- α 'nın rolü normal fizyolojik şartlar altında daha baskınken, akut hasar sonrasında ülser iyileşmesinde ana rolü EGF üstlenir. Sıçan midesinde asitle uyarılmış ülser modelinde IL-1 β gibi sitokinler EGF, bFGF, TGF- β , hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi faktörlerin upregülasyonunun başlangıcına katkıda bulunur [72]. İyileşme süreci boyunca, yeni epiteliyal hücreler, EGF ve diğer büyüme faktörlerini salgırlar. Ülser sınırında epiteliyal hücrelerin çoğunluğu, EGF reseptörünü aşırı miktarda taşırlar. EGF nin azalması onarımı geciktirir. Sigara dumanı serumdaki EGF seviyesini düşürdüğü için deneysel ülser iyileşmesini zayıflatır. Buna zıt olarak heparinin etkisi, EGF ve FGF ekspresyonlarını artırdığı için kısmen ülser onarımını hızlandırma yönündedir [54].

2.10. Siklooksijenaz Enzimleri

COX enzimi, PG yapımı için anahtar rolü olan enzimdir. COX enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere 2 izoformu vardır [35, 55, 73]. 1990'ların başlarında, prostanoit sentezinde ilk adım olan PGH₂ üretiminden sorumlu enzimlerin COX-1 ve COX-2 olduğu ortaya konmuştur. COX-1 kural olarak normal mide mukozasında bulunur, hücre koruyucu bir enzimdir ve temel mide fonksiyonlarının devamlılığında sorumludur. COX-2 ise inflamasyon ile ilişkili olup, epiteliyal hücre, makrofajlar ve fibroblastlar gibi pek çok hücrede, romatid artrit, iskemi gibi inflamatuvar ya da mitojenik uyaranlar, tümör promotörleri ve büyüme faktörlerinin etkisi ile hızla eksprese olup ve inflamatuvar alanlardaki patolojik PG'lerin yapımından sorumlu olan COX izoformudur [35, 55, 57]. COX aktivitesi mide mukozal bütünlüğün sağlanmasında en önemli olaylardan biridir [35]. Normal mide mukozasında COX-2 belirlenemezken, ülser ve gastritis modellerinde, çeşitli inflamasyon ya da mukozal hasar durumlarında yüksek seviyede COX-2 eksprese olur [55]. Özellikle deneysel iskemi reperfüzyonda, COX-2 mRNA'sının ve protein seviyesinin arttığını gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır [74]. Ayrıca, artan PG seviyesi ve COX aktivitesi çeşitli epiteliyal kanserlerde belirlenmiştir [57]. Yapılan çalışmalar COX-2'nin mide mukozasındaki savunma hattını, mukozal bütünlük ve ülser gelişimi için oluşturduğu kavramını destekler [74].

Klasik NSAID'lerin gastrointestinal toksisitelerinin COX-1 inhibisyonu ile olduğu, yararlı anti-inflamatuvar, analjezik etkilerinin ise COX-2 inhibisyonu ile sağlandığı varsayılmaktadır. Ancak son dönemde bu varsayım tartışma konusu olmuştur. Çünkü COX-1 ve COX-2 nin tek tek spesifik, farmakolojik inhibisyonu ülser oluşumuna sebep olmazken, her iki enzimin birden inhibisyonunun gastroduodenal ülserleşmeye sebep olduğu gösterilmiştir [55]. COX-2 inhibisyonu uygulanan hayvan deneylerinde, midedeki erozyonların ve ülserlerin iyileşmesi uzun süreli olur. COX-2 her ne kadar inflamasyonda önemli bir mediyatör olsa da, mukozada artan COX-2 ekspresyonu ülser iyileşmesinde rol alır. Bu sebeple

midedeki inflamasyonda COX-2 ekspresyonunun fonksiyonel önemi açık değildir [55].

COX-1 ve COX-2 enzimleri, dokulara göre dağılımları, ekspresyonlarının regülasyonu, fizyolojik rolleri bakımından farklılık gösterirler. Ekspresyonlarından sorumlu genler sırasıyla 9. ve 1. kromozom üzerinde yer alır. İnsan COX-2 geni 8.3 kilobaz (kb) iken, COX-1 geni 22 kb'dır. COX-1 ve COX-2 proteinlerinin her ikisi de araşidonik asitten PGG₂ yi takiben PGH₂ oluşumunu, peroksidaz fonksiyonu ile katalizlemektedir. Her iki enzimin aminoasit dizilimleri % 60 oranında homoloji göstermektedir. Ancak bu enzimler substrata bağlanma bölgelerindeki aminoasitler ve katalitik bölgeleri bakımından birbirinden farklıdır [21]. 2002 yılında COX-1 in splice varyantı olduğu öne sürülen COX-3 olarak adlandırılan bir diğer COX enzimi tespit edilmiştir [70].

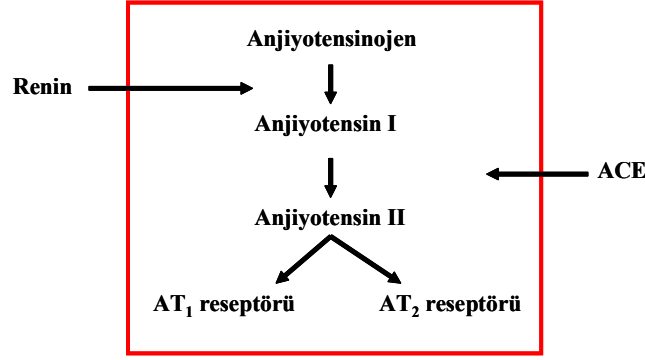
Prostaglandinlerin oluşumunda ilk basamak, AA'nın membrana bağlı fosfolipidlerden genellikle fosfolipaz enzimleri (öncelikle Fosfolipaz A₂) aracılığı ile serbestleştirilmesidir. Fosfolipaz A₂ yapısal ve indüklenebilir olmak üzere farklı izoformlarda eksprese olur. 85 kDa ağırlığındaki sitozolik fosfolipaz A₂, AA'dan PG yapımını sağlayan fosfolipazdır. Fosfolipaz A₂ nin bu formu aktivasyonu için Ca²⁺ ve kalmoduline ihtiyaç duyar [75].

COX-2 enziminin sadece patolojik durumlarla ilişkili olduğu, fizyolojik durumlarda rolünün olmadığı yönünde bir kanı vardır. H. Pylori gastritinde, mukozanın mononükleer hücreleri, parietal hücreleri ve fibroblastlarında COX-2'nin indüklendiği gözlenmiştir. Sıçan midesinde asitle uyarılan ülser oluşumunun ve iskemi reperfüzyon hasarının temelindeki COX-2 upregülasyonu IL-1β'ya bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir. Yapılan incelemelerde insan gastrik endotelial hücrelerinde COX-2 inhibitörleri anjiyogenezisi baskıladığı ve iskemi reperfüzyon hasarını ağırlaştırdığı gösterilmiştir [54].

2.11. Renin Anjiyotensin Sistemi

2.11.1. Anjiyotensin II

RAS'ın homeostasisi sağlamada ve korumada görevli bir mekanizma olduğu iyi bilinmektedir. Sistemik RAS kan basıncının düzenlenmesini ani şekilde vazokonstriksiyona sebep olarak sağlarken, kronik olarak aldosteron aracılı sodyum geri emilimini uyararak intravasküler hacmin genişlemesine neden olur. Hipertansiyondan bağımsız olarak RAS komponentlerinin dokularda yükselen seviyelerde olması, kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları gibi istenmeyen durumların göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ayrıca Ang II miyokardiyal enfarktüs sonrasında miyokardiyal yeniden düzenlenme (remodelling) de rol almaktadır [1, 2, 3, 72, 76].



Şekil 2.4. Renin-anjiyotensin sisteminin üyeleri [1].

Ang II, lokal olarak da doku RAS aracılığı ile üretilmektedir. Klinik bilgiler ve deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular RAS ile ilgili bilgilerimizi gün geçtikçe artırmaktadır. Bu bulgular RAS'ın hemodinamik regülasyonu dışında farklı görevleri olduğunu öne sürerek RAS konusunda yeni bir boyut açmıştır. Son bilgilere göre RAS inflamasyonda oldukça önemli role sahiptir [76].

1990'ların başlarında yapılan deneysel çalışmalar Ang II'nin inflamatuvar cevabın oluşumunda kilit rolü olduğunu, pro-inflamatuvar ve proliferatif etkilerin varlığı göstermiştir. Ang II, çoğunlukla, aktivator protein-I (AP-I) ve NF-κB gibi inflamasyonla ilişkili transkripsiyon faktörlerini aktive etmek yoluyla, immün cevabın oluşumuna, inflamatuvar sürecin gelişimine katkıda bulunur [77].

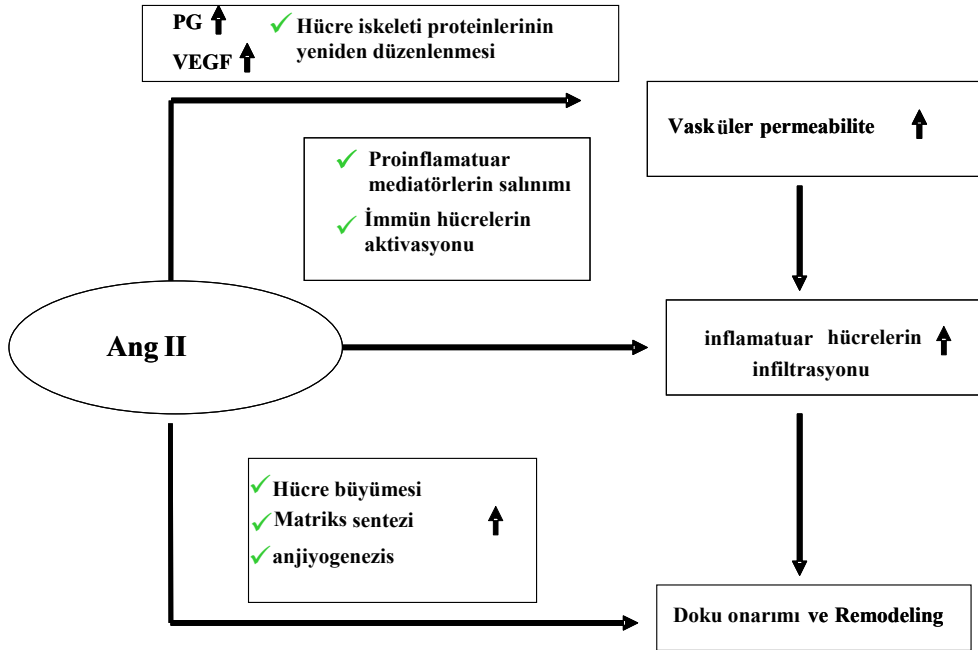
Ang II prostaglandin salgılanmasını sağlamak, vasküler endotelial hücre büyüme faktörleri ya da hücre iskeleti proteinlerini yeniden düzenlemek yoluyla vasküler permeabiliteyi artırır. Vasküler permeabilitenin artması inflamatuvar cevabın oluşumunda ilk basamaktır. Ang II, kemotaktik maddelerin sentezi düzenler. Hücrelerden salınan kemokinler ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenleyerek, inflamatuvar hücrelerin dokuya toplanmasına yardımcı olur. Aynı zamanda hücre farklılaşması ve proliferasyonunu da uyarır [77].

2.11.2 Ang II Reseptörleri ve Reseptör Blokerleri

Memeli hücrelerinde, Ang II'nin G proteini ile eşleşen Anjiyotensin Tip-1 (AT₁) ve Anjiyotensin Tip-2 (AT₂) olarak adlandırılan iki tip reseptörü vardır [1, 78, 79]. Ang II'nin çok yönlü etkileri bu reseptörler aracılı gerçekleşmektedir. Her iki reseptör tipide klonlanmış ve farmakolojik olarak karakterize edilmiştir [1]. AT₁ ve AT₂ reseptörleri %34 homoloji göstermekte fakat hücre içi farklı sinyal yollarını takip etmektedirler [78]. AT₁ reseptörleri böbrekte, kalpte, vasküler düz kas hücrelerinde, beyinde, adrenal bezlerde, trombositlerde ve plasentada yoğun olarak bulunmaktadır. AT₂ reseptörü ise çoğunlukla fetüste bulunur, post natal periyotta sayıca azalma gözlenir. Yetişkin dokularında AT₂ reseptörü, uterusu, adrenal bezlerde, merkezi sinir sisteminde kalpte, midede ve böbrekte oldukça düşük seviyede bulunur. AT₂ reseptörlerinin deneysel kardiyak hipertrofi, miyokardiyal enfarktüs ve yara iyileşmesi gibi durumlarda ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [78, 80, 81].

Reseptörlerin tanımlanmasını takiben, AT₁ reseptörüne spesifik Losartan, valsartan, irbesartan, telmisartan, eprosartan ve candesartan olarak adlandırılmış altı adet reseptör antagonisti geliştirilmiştir. Bu reseptör antagonistleri içinde candesartan cilexetil, oral uygulamada, uzun süreli etkili olan en iyi reseptör antagonisti olarak tanımlanmıştır [78]. Candesartan cilexetil, gastrointestinal emilim sonrasında hızlıca aktif candesartan formuna dönüşür. Tavşan aortunda reseptörüne bağlanma afinitesi losartan ile karşılaştırıldığında seksen kat daha etkilidir. [78].

Ayrıca AT₃ ve AT₄ reseptörleri de tanımlanmış, ancak AT₃ reseptör alt tipi sadece sinir kökenli 2A nöroblastoma hücre dizisinde saptanmıştır. AT₄ reseptörü, kalp, akciğer, böbrek, beyin ve karaciğerde bulunmaktadır. AT₃ ve AT₄ reseptörleri tam olarak karakterize edilemediklerinden dolayı, memeli Ang II reseptörlerinin sınıflandırılmasına girmemiştir [82-88]. Hücre içi sinyal yolları bu peptidin hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanmasını takiben uyarılmış olur. Spesifik reseptör antagonistleri ile yapılan çalışmalarda AT₁ reseptörünün; hücre proliferasyonunu, sitokin ve ekstraselüler matriks proteinlerinin yapımı ile, AT₂ reseptörünün ise, kan basıncı regülasyonu ve renal natriüresinin regülasyonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir [1, 9, 89]. Kollajen sentezi, NO yapımı ve α -2 adrenoreseptör aktivitesinde yaptığı artışın da, AT₁ reseptörü aracılığı ile olduğu bilinmekte, ancak son yıllardaki bazı yayınlarda AT₂'nin de bu fonksiyonlarda rolü olabileceği ileri sürülmektedir [1, 28, 51].



Şekil 2.5. Anjiyotensin II'nin inflamatuvar yanıt oluşumundaki rolü [3].

2.12. Ang II'nin İnflamatuar Yanıt Oluşumundaki Rolü

2.12.1. Vasküler Permeabilitenin RAS Aracılığı ile Değiştirilmesi

Vasküler permeabilitenin lokal değişimi sonucu, dokuya inflamatuvar hücrelerin geçmesi ve proteince zengin sıvının sızması inflamasyonun başlangıç fazındaki en önemli olaydır [3].

Renal ekstraktların peritoneal olarak uygulandığı deneysel bir modelde, vasküler permeabilitenin artışına sebep olan maddelerin bulunduğu öne sürülmüştür. Renal ekstraktın aktif komponenti olarak renin gösterilmiş ve hayvanlara Ang II infüze edildiğinde permeabilitenin arttığı gösterilmiştir. Bu da Ang II'nin vasküler permeabiliteyi endotelyumda basınç ile oluşan mekanik hasar aracılığı ile oluşturabileceğini düşündürmüştür. Ancak çalışmaların sonuçları, Ang II'nin vasküler endotelyum permeabilitesini hemodinamik değişimlerden bağımsız, lokal olarak etkilediği fikrini desteklemektedir [3, 90].

Ang II'nin indüklediği ikincil habercilerin de vasküler permeabiliteyi etkilediği kabul edilmiştir. Ang II'nin vazokonstriksiyon dışındaki etkisini açıklamaya yönelik iki aday vascular endotelial growth factor (VEGF) ve prostaglandinlerdir [3].

PGE₂, LTC₄, PGI₂, vasküler permeabilitede önemli olan klasik mediyatörlerdir. Ang II bu mediyatörlerin sentezini uyararak, mikrovasküler permeabiliteyi düzenler [91]. Sıçanda AT₁ reseptör antagonisti olan losartan kullanıldığında, permeabilitede organa bağlı tarzda, tromboksan A₂ /prostanoid reseptör aracılı artış engellenmiştir [3, 91].

VEGF güçlü bir endotelial mitojen ve aynı zamanda vasküler permeabilite ajanı olduğu için vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak da isimlendirilmiştir. Klinik ve deneysel kanıtlar Ang II'nin indüklediği VEGF vasküler permeabiliteyi artırmak yolu ile patogeneze katkıda bulunur. Ang II VEGF ekspresyonunu vasküler düz kas hücrelerinde, kalp endotelial hücrelerinde ve glomerular hücrelerde artırır. Deneysel modellerde ACE inhibitörleri ve AT₁ antagonistleri VEGF'nin aşırı ekspresyonunu ve diyabetik retinopatinin erken aşamalarında görülen yüksek permeabiliteyi engeller [3].

2.12.2. RAS'ın İnflamatuar Hücrelerde Kemotaksis ve Hücre Adezyonuna Etkisi

İnflamatuvar cevabın oluşumunda lümeninden interstisyel dokuya lökosit geçişi önemli bir basamaktır. Bu olay sırası ile [3];

1. Hücre göçü (Hücrelerin endotel yüzeyinde yuvarlanmaları ve adezyonları)
2. Endotel duvarından geçiş
3. Kemotaktik uyarana doğru göç

2.12.3. RAS'ın Adezyon Moleküllerinin Ekspresyonuna Etkisi

Lökosit adezyonu ve endotelden geçişi, lökosit ve endotel yüzeyinde bulunan çeşitli adezyon moleküllerinin sıra ile katıldığı çok basamaklı bir süreç olarak tanımlanmıştır. Dolaşımdaki lökositler ve vasküler endotelyum arasındaki ilk temas, "Rolling" yani lökositlerin endotel yüzeyinde yuvarlanmaları, selektin ailesi ve

ligandları tarafından sağlanır. Yuvarlanan lökositler adezyonu sağlayacak uyarıyı tetiklerler [3]. Adezyon için integrin aracılı sıkı tutunma gereklidir.

İmmunoglobulin ailesi molekülleri intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler endotelial adezyon molekülü-1 (VCAM-1) olmak üzere iki endotelial adezyon molekülü içerir. Bu adezyon molekülleri lökositlerde bulunur ve integrinlerle etkileşir. Kronik kalp yetmezliği görülen hastalarda, ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektinin çözünabilir formunun plazmadaki artışı endotelial disfonksiyonun göstergesidir. RAS'ın ACE inhibitörleri ve AT₁ antagonistleri ile bloke edilmesi bu artışı ortadan kaldırır. Ek olarak koroner kalp hastalığı görülen hastalarda lökositlerdeki artan L-selektin ekspresyonu AT₁ antagonistleri kullanılarak azaltılmıştır [3, 92]

Ang II monositlerin ve nötrofillerin endotelial hücelere adezyonunu artırır. I/R modellerinde koroner ve mikrodolaşımda artan polimorfonükleer hücre (PMN) adherensi ve PMN üzerindeki CD11b ile endotelial P-selektin ekspresyonları ile ilişkili olan iskemik lezyonlar, ACE inhibitörleri kullanılarak zayıflatılır. İnvitro çalışmalar da Ang II'nin direk olarak endotelial hücelerde ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarını artırdığını doğrulamaktadır [3, 92]. Yine böbrek hasarı modelinde RAS blokerleri uygulamasının, adezyon moleküllerinin aşırı ekspresyonlarını azalttığı bilinmektedir [93].

2.12.4. RAS'ın İnfiltre Olan İmmün Hücre Fonksiyonlarına Etkisi

İnflamatuar hücreler, RAS'ın tüm bileşenleri bakımından donanımlı ve Ang II üretme yeteneğindedirler [94]. Anjiotensin II'nin makrofajların fagositik aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir [95]. Son dönemde yapılan çalışmalarda, Ang II'nin makrofaj ve dendritik hücelerde olduğu gibi kemik iliği kökenli hücelerin farklılaşmalarına kısmen katkıda bulunduğu, ACE inhibitörlerinin uygulanması durumunda ise hemopoietik ve progenitör hücre çoğalmasının azaldığı gösterilmiştir [96]. Bunlara ek olarak, dokularda monositlerden makrofajlara farklılaşma olayı, RAS'ın aktivasyonu ve AT₂ reseptörünün ekspresyonu ile ilişkilidir [97]. Monosit/makrofajların AT₁'e bağımlı hücrel fonksiyonları arasında Ang II'nin indüklediği oksidatif stres ve kolesterol artışı bilinmektedir.

Ang II'nin akut inflammatuar cevabı, nötrofil kemotaksisi yolu ile modüle etmesi henüz yeterince açık değildir. Katepsin-G gibi membrana bağlı serin proteazlar nötrofiller üzerinde eksprese olur ve mobil Ang II üretim sistemi güçlü vazoaktif ve kemoatraktan özelliklerini inflamasyon alanında ortaya koyar. Nötrofiller sahip olduğu anjiotensin üretim sistemleri sayesinde inflamasyon alanında Ang II nin lokal yapımına katkıda bulunur. [98].

Diğer yandan, T-hücre bağımlı gecikmiş tip aşırı duyarlı granümatöz reaksiyonu ile karakterize olan "mürin schistosomiasis mansoni" modelinin mononükleer hücre birikimi ile ilişkili olduğu, granüloma makrofajlarının, T hüceler için kemotaktik ve aktivatör faktör olan Ang II'yi lokal olarak ürettikleri, ACE inhibitörü ve AT₁ antagonistleri uygulandığında T hücre aracılı granümatöz inflamasyonun iyileştiği gösterilmiştir [99].

Lokal RAS aktivasyonu sonucu, T hücreleri ve makrofajlar glomerulonefrit ve aterosklerotik plakda olduğu gibi non-spesifik olarak inflamasyon alanına biriktiklerinde, otokrin/parakrin tarzda lokal Ang II üretimini hızlandırarak kalıcı inflamatuvar cevabın oluşumuna katkıda bulunurlar [92].

2.13. Ang II'nin İndüklediği İnfiltrasyonun Moleküler Mekanizması

Ang II hücrel cevapları, Ca^{2+} mobilizasyonu, serbest radikal üretimi, protein kinazların ve NF- κ B ve AP-1'i de içeren çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gibi çeşitli hücrel yollar aracılığı ile ortaya koyar [100]. İnflamasyon ve doku hasarı ile ilişkili genler transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile kontrol edilir. Ang II'nin indüklediği inflamasyonda, NF- κ B'nin önemli bir rolü vardır. RAS aktivasyonunu takiben oluşan, ateroskleroz ve renal hasar gibi patolojik durumlarda artan hücrel NF- κ B aktivitesinin, ACE inhibitörü uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir [101]. Normal sıçanlarda Ang II'nin sistemik infüzyonu, dinlenme durumunda ve infiltre hücrelerde NF- κ B aktivasyonunu artırır. İçlerinde glomerular, mesengial, tubuloepitelyal hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre Ang II, NF- κ B'yi aktive eder [102]. Ang II'nin her iki reseptörünün inflamasyon ile ilişkisi kesin olarak açıklanamamıştır. Sıçan böbreğinde oluşturulan deneysel inflamasyonda, AT₁ ve AT₂ reseptör antagonistleri uygulaması ile NF- κ B aktivasyonunun azaldığı gösterilmiştir [1].

Ang II, NF- κ B'nin kontrolü altındaki pro-inflamatuvar genlerin ürünlerini kemokinler (MCP-1, Rantes), sitokinler (IL-6), adezyon molekülleri (VCAM-1, ICAM-1) ve anjiotensinojeni AT₁ ve AT₂ reseptörleri aracılığı ile artırır. Ang II aracılığı ile aşırı eksprese olmuş pro-inflamatuvar genlerin düzenlenmesinden sorumlu hücre içi diğer mediyatörlerde bulunmaktadır. Örneğin, MCP-1 geninin ekspresyonu, AP-1 aktivasyonu ile kontrol edilir [101].

VSMC'de Ang II ile indüklenmiş MCP-1 geni, katalaz ve MAPK kinaz inhibitörü uygulaması yapıldığında inhibe olur. Bu da H₂O₂'nin MAPK-bağlı yolda ikincil haberci rolü olduğunu göstergesidir [103].

2.14. Ang II'nin Doku Onarımına Etkisi

Doku yenilenmesi inflamatuvar cevabın, iki farklı süreçten oluşan en önemli sonucudur.

- 1) Yenilenme; hasarlı hücrelerin yerlerini, aynı tip yeni hücrelere bırakması,
- 2) Onarım; fibrozis olarak isimlendirilmiş kalıcı iz oluşumuna sebep olan yapının yerini bağ dokuya bırakması

RAS'ın hücre büyümesini ve matriks sentezini uyararak doku onarımına katkı sağladığı, RAS'ın bloke edildiği vasküler ve renal hastalık modellerinde ise fibrozisin azaldığı gösterilmiştir. Ang II, hücre büyümesini ve fibrozisi düzenleyen bir büyüme faktörü olarak tanımlanmış, Ang II bloke edildiğinde fibrozisin belirgin olarak yavaşladığı gösterilmiştir. Ang II, hücre büyümesini hücre ve reseptör tipine bağlı olarak farklı şekilde etkiler. Ang II, VSMC, mesengial hücreler, renal intersitisyel fibroblastlarda hiperplaziye sebep olur. Ang II AT₁ reseptörü yolu ile hücre çoğalmasını artırırken, AT₂ reseptörü yolu ile hücre çoğalmasını inhibe eder

[104]. Kültür hücreleri ile yapılan deneysel çalışmalarda Ang II'nin, TGF- β gibi büyüme faktörleri ve sitokinleri indüklemek yolu ile ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyonunu ve sentezini artırdığı gösterilmiştir. TGF- β , Ang II aracılı matriks sentezi ve hipertrofi oluşununun en önemli mediyatördür. TGF- β 'nin, makrofajlarda, T ve B lenfositlerde ve fibroblastlarda sentezlendiği, Ang II'nin TGF- β sentesini artırdığı gösterilmiştir. Kalp böbrek ve karaciğerde yapılan deneysel çalışmalar sonucu, artan TGF- β 'nin, lokal Ang II artışı ile ilişkili olduğu bunu takiben artan ekstraselüler matriks proteinlerinin, RAS blokajı ya da AT₁ reseptör geni olmayan farelerde azaldığı gösterilmiştir [104].

Hipotez: Anjiyotensin II'nin çeşitli dokularda oluşan inflamatuvar yanıtta görevli olduğu bilimektedir. Sıçan midesinde iskemi reperfüzyon modeli ile oluşturulan inflamatuvar yanıtta, Anjiyotensin II'nin, inflamasyonla ilişkili proteinler olan iNOS ve COX-2 ekspresyonlarını, artırabileceği dşnlmştir. Çalışma bu hipotezi doğrulamak amacıyla yapılmıştır.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve Deney Hayvanları Ünitesi'nde gerçekleştirilen çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden elde edilmiş, 50 adet erişkin, erkek 200-250 g ağırlığında Wistar sıçan üzerinde yapılmıştır. Sıçanlar tel kafeslerde standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir. Deneye başlamadan önce her sıçan tartılmış ve canlı ağırlığı kaydedilmiştir.

3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü

Sıçanlar bütün gruplarda, 18 saatlik açlık periyodundan sonra 15 mg/kg ksilazin-50 mg/kg ketamin karışımı ile anestezi yapıldıktan sonra deneye alınmıştır. Bu süre içinde su alımı serbest bırakılmıştır.

1. Kontrol Grubu: Hayvanlara herhangi bir işlem yapılmamıştır.

2. Sham Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 5 gün süre ile serum fizyolojik subkutan (s.c.) olarak verilmiştir. Anestezi sonrası orta hat kesisi ile çöliak arter ortaya çıkarılmış, karın boşluğu kapatıldıktan 24 saat sonra abdominal aortadan kan alınıp mide dışarı çıkarılarak deney sonlandırılmıştır.

3. İskemi-Reperfüzyon Grubu; 5 gün süre ile s.c serum fizyolojik verilen sıçanlara anestezi altında iskemi reperfüzyon uygulandıktan sonra deney sonlandırılmıştır.

4. AT₁ RB + İskemi-Reperfüzyon Grubu: Sıçanlara Anjiyotensin II'nin AT₁ reseptörünün blokeri olan *candesartan* (Astra Zeneca, CV11974), serum fizyolojik içinde hazırlanarak 1mg/kg/gün dozunda s.c. olarak günde iki defa, 5 gün süre ile verilmiştir [105]. Anestezi altındaki hayvanlara iskemi reperfüzyon uygulanmasının ardından deney sonlandırılmıştır.

4. AT₂ RB + İskemi-Reperfüzyon Grubu: Sıçanlara Anjiyotensin II'nin AT₂ reseptörünün blokeri olan *PD123319* (Sigma-P186), serum fizyolojik içinde hazırlanarak, 3 mg/kg/gün dozunda s.c. olarak günde iki defa, 5 gün süre ile verilmiştir. [106]. Anestezi yapılan hayvanlara iskemi reperfüzyon uygulanmasının ardından deney sonlandırılmıştır.

5. ACE inhibitörü + İskemi-Reperfüzyon Grubu : Sıçanlara anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü olan *Captopril* (Sigma-4042), serum fizyolojik içinde hazırlanarak, 20 mg/kg/gün dozunda s.c. olarak günde iki defa 5 gün süre ile verilmiştir [107]. Anestezi yapılan hayvanlara iskemi reperfüzyon uygulanmasının ardından deney sonlandırılmıştır.

İskemi reperfüzyon uygulanan gruplardaki hayvanlara, çöliak arterin açığa çıkarılıp klemplenmesi ile 30 dakika iskemi ve klemp alınarak 24 saat reperfüzyon yapılmıştır. 24 saatlik reperfüzyon sürecinin ardından abdominal aortadan kan alınıp, mide dışarı çıkartılarak deney sonlandırılmıştır. Dışarı çıkarılan mide serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra uygun büyüklükteki parçalara ayrılıp, analizleri yapılınca kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2. Parametrelerin Tayini

3.2.1. Kan Basıncı Ölçümü

Deney hayvanlarının gruplandırılmasından sonra, AT₁ RB, AT₂ RB, ve ACE inhibitörü gruplarındaki hayvanların, ilaç uygulamasına geçilmeden önce ortalama kan basınçları tail cuff metodu (MP150-Data acquisition system) ile ölçülmüştür. Sonra reseptör blokerleri ve ACE inhibitörü 5 gün süre ile günde 2 kez s.c. olarak verildikten sonra, kan basıncı ölçümleri tekrarlanmıştır.

3.2.2. Protein Tayini

Mide dokusunda protein tayini, prensibi Bradford yöntemine dayanan ticari kit ile yapıldı.

Reaktifler

1)Standart Solüsyon: 2µg/µl Bovin serum Albumin (BSA) (Merck, K35187818-607)

2)CPPA Reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce 23236)

İşlemler: 1 µl doku süpenatantı, 999 µl bidistile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra, üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenerek 595 nm’de absorbans spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart çalışması ise numune yerine, artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır. Mide dokusundaki protein miktarı, standart çalışmasından elde edilen absorbans ölçümleri kullanılarak çizilen standart grafiğine göre hesaplanmış ve sonuçlar µg/µl protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.3. Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini:

Stephan ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır [108].

Prensip: Tetrametilbenzidin, miyeloperoksidaz enzimi ve H₂O₂’nin bulunduğu ortamda oksitlenir. Oksidasyon ürünü olarak mavi renkli bileşik oluşur. Yöntem, mavi renkli bileşiğin neden olduğu absorbans değişiminin 1 dk süresince 655 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Reaktifler ve kimyasallar

1) Fosfat tamponu (50 mM, pH: 6,0): 50 mM Na₂HPO₄ (di-Sodium hydrogen phosphate, Merck 6586), 50 mM NaH₂PO₄ (Sodium phosphate, Sigma S-9638) ile hazırlanır. 1N HCl (hydrochloric acid, Merck 314) ile pH: 6.0’ya ayarlanır.

2) Homojenizasyon tamponu: % 1 oranında HTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide, Sigma, H-5882) içerir ve fosfat tamponu ile hazırlanır.

3) Reaksiyon tamponları:

1 mM H₂O₂ (Merck 8600)

20 mM Tetrametilbenzidin solüsyonu (Tetramethylbenzidine, Sigma, T-2885-1G ve Dimetilformamid, Applichem Dimethylformamide, A-3676 ile hazırlanır.)

80 mM NaH₂PO₄ (Sodium phosphate, Sigma S-9638)

İşlemler: 2.5 ml homojenizasyon tamponu içine konulan ~ 250 mg ağırlığındaki mide dokularına 3 kez 10 saniyelik sürelerle buz içinde sonikasyon yapılmıştır (Bandelin Sonopuls, UW 2070). Elde edilen homojenatlar analiz yapılıncaya kadar -80°C’de saklanmıştır. Analiz öncesinde homojenatlar 15000 rpm’de, 4°C’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Olusan süpernatandan 50 µl alınmış ve üzerine 790 µl, 80 mM NaH₂PO₄, 100 µl, 1 mM H₂O₂, 60 µl, 20 mM tetrametilbenzidin solüsyonu eklenip, küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometrede 655 nm’de 1 dk süresince okunmuştur. Süpernatandan alınan örnekler kullanılarak, protein kiti ile (Pearce-comasie plus-23236) ile protein değerleri ölçülmüştür. Spektrofotometrede 655 nm de 1 dk süresince okunan absorbans değişimi protein değerlerine oranlanarak MPO enzim aktivitesi mU/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Nitrit Tayini:

Mide dokusundan alınan örneklerle yapılan nitrit miktarının tayini, spektrofotometrik Griess yöntemine göre yapılmıştır [10, 47, 109, 110].

Prensip: Asidik ortamdaki nitrit (NO₂⁻) nitroz aside (NHNO₂) dönüşür ve Griess A reaktifindeki sülfanilamidi diazotize eder. Oluşan sülfanilamid-diazonium tuzu Griess B reaktifindeki naftiletilediaminle reaksiyona girerek spektrofotometrik olarak ölçülebilen eflatun renkli kromotofor oluşturur.

Reaktifler ve Kimyasallar

1) Fosfat Tamponu (pH: 7.4):

0.1 M KH₂PO₄ (Potassium phosphate, Sigma, P-5379),

0.1 M Na₂HPO₄ (di-sodium hydrogen phosphate, Merck, 6586) çözeltilerinin 1:4 oranında karıştırılmasıyla hazırlanır.

2) C₂H₅OH (% 99.5’lik Absolü alkol)

3) CH₃Cl₃ (Chloroform, Merck, K1496231)

4) NaNO₂ (Sodium Nitrite, Sigma, S-2252)

5) Griess A reaktifi: % 5’lik (v/v) Fosforik asit (H₃PO₄ ortho-Phosphoric acid % 85, Merck, 563) % 1’lik (w/v) Sülfanilamide (C₆H₈N₂O₂S, Sigma, S-9251)

İşlemler: Mideden alınmış olan 250 mg ağırlığındaki doku örnekleri havana alınmış, üzerine buzda bekletilen fosfat tamponundan 0.5 ml eklenip parçalanmış, ardından homojenizasyon tüpüne aktarılmıştır. Homojenizasyon tüpüne 2 ml tampon ilave edilerek teflon uçlu doku homojenizatörü (TRI-R STIR-R, Model K-43) ile buz içinde 20 sn boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat, protein tayini için ayrı bir deney tüpüne ayrılmış, kalan homojenat buzda bekletilen deney tüpüne aktarılmış, kör, standart ve numune için 2 ml’lik miktarlar tüplere konularak üzerlerine 3.5 ml buzda bekletilen bidistile su ilave edilmiştir. 1 ml etanol ve 0.6 ml

kloroform eklendikten sonra 20 sn vortekslenen tüpler, 4500 rpm de 10 dk santifüj edilerek, presipitasyonla proteinleri uzaklaştırılmış olan (deproteinize) süpernatandan 1 ml'lik örnekler alınarak küçük tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 0.25 ml Griess A reaktifi ve 5 dk sonra 0.25 ml Griess B reaktifi eklendikten sonra 5 dk lık bekleme süresinin ardından tüplerin 540 nm dalga boyundaki absorbanans değerleri spektrofotometrede köre karşı okunmuş ve nitrit değerleri mol/g protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. Nitrat Tayini

Nitrat şeklinde oksitlenmiş olan nitrit miktarını belirlemek amacıyla nitrit ölçümünün yanı sıra, Bories'in yöntemine göre nitrat tayini yapılmıştır [111].

Prensip: Numunelerdeki nitrat düzeylerinin "nitrat redüktaz"enzimi ile nitrite indirgendiği reaksiyonda, 340 nm'de β -NADPH'nin oksidasyonu sonucu absorbansta meydana gelen düşüş değerlendirilmiştir. Ortama FAD elektron taşıyıcısı olarak eklenmiştir.

Reaktifler ve Kimyasallar:

- 1) Nitrat redüktaz (*Aspergillus*) (500 U/L), (Sigma, N-7265)
- 2) Flavin adenin dinükleotid (0.2 mmol/L), (FAD Sigma, F-6625)
- 3) Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (12 mmol/L), (β -NADPH, Sigma, N-1630)
- 4) Sodyum nitrat (Sodium nitrate, NaNO_3 , Sigma, S-8170)
- 5) Fosfat tamponu (100 mmol/L; KH_2PO_4 ve K_2HPO_4) (pH: 7.5)

İşlemler: Mide dokusundan alınan örneklerle nitrit ölçümündeki gibi hazırlanan homojenatlar deney gününe kadar -80°C 'de saklanmıştır. Nitrat ölçümleri yapılmadan önce homojenatlar çözülerek 15.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatandan nitrat tayini ve protein tayini yapılmıştır.

İçerisinde 250 μl potasyum fosfat tamponu, 50 μl distile su, 50 μl FAD, 10 μl β -NADPH ve 100 μl numune bulunan tüpler 25°C 'de dengeye getirilmiştir. Enzimatik reaksiyonu başlatmak için ortama 40 μl nitrat redüktaz eklenmiş ve FAD'nin fotolabilitesinden dolayı reaksiyonun karanlık ortamda gerçekleşmesi sağlanmıştır. Numunelerin absorbanansı 45 dk sonra 340 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ protein olarak ifade edilmiştir.

Numune körü: Her bir numune için 40 μl nitrat redüktaz yerine 40 μl distile su içeren numune körü hazırlanmıştır.

Reaktif körü: 250 μl potasyum fosfat tamponu, 50 μl distile su, 50 μl FAD, 10 μl β -NADPH ve 150 μl distile suya ilaveten 40 μl nitrat redüktazın varlığında ve yokluğunda ölçülmüştür.

Hesaplama: Numunedeki nitrat konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$C = \Delta A \times \text{faktör}$$

$$\Delta A = A_{\text{numune körü}} - A_{\text{numune}} - A_{\text{reaktif körü}}$$

$$\text{Faktör} = V_T / V_N \times 1/l \times 1/\epsilon_{340} = 0.8$$

V_T = Reaksiyon total hacmi (500 μ l)

V_N = Numune hacmi (100 μ l)

l = Işık yolu (1 cm)

ϵ_{340} = β -NADPH'nin 340 nm'deki absorbtivitesi (6.22 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.2.6. PGE₂ Tayini

Prostaglandin E₂ (PGE₂) miktarının analizi dokuya uyumlu EIA kiti kullanılarak yapılmıştır [110, 112].

Reaktifler ve Kimyasallar

- 1) PGE₂ Enzymeimmunoassay kiti (Biotrack PGE₂ Enzymeimmunoassay System, Amersham)
- 2) Homojenizasyon Tamponu (pH: 7.5)
50 mM Tris HCl (Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride, Sigma, T-6666) 0.02 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma, ED2P) 5 mg/ml İndometazin (Indomethacin, Sigma, I-7378) kullanılarak hazırlanmıştır.
- 3) 1:4 oranında hazırlanmış Etanol:su) Solüsyonu (C₂H₅OH, % 99.5'lik Absolü alkol)
- 4) Glasiyel asetik asit (Glacial Acetic acid, % 99-100)
- 5) Hekzan (Hexane, Merck, 4368)
- 6) Etil asetat (Ethyl Acetate, Merck, K-34520464)
- 7) 1 M Sülfurik Asit (H₂SO₄, Sulfuric Acid, Merck, K-34485613-511)

İşlemler: PGE₂ miktarı tayini için çıkarılan midelerden, buz üzerinde mukoza kazıntıları alınmış ve 5 mg/ml İndometazin ilave edilmiş homojenizasyon tamponu içinde homojenize edilmiştir. 0.5 ml homojenat üzerine sırasıyla, 0.5 ml 1:4 su:Etanol solüsyonu, 10 μ l Glasiyel asetik asit eklenip, yavaşça çalkalanarak, 5 dk oda ısısında bekletilmiş ve bekleme süresinin sonunda, 2500 g'de 2 dk süresince santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant, 2 hacim % 10'luk Etanol ile yıkanmış olan 100 mg Amprep C18 mikrokolonuna uygulanmıştır. Uygulama sonrasında aynı kolon önce 1 hacim distile su ile ardından 1 hacim hekzan ile yıkanmıştır. Son olarak 0.75 ml etil asetat 2 defa kolona uygulanmış ve kolondaki PGE₂ temiz ependorf tüplere toplanmıştır. 1.5 ml hacmindeki Etil asetat yaklaşık 2 saat liyofilize edilmiş ve numunedeki PGE₂ EIA kiti ile analiz edilmek üzere hazır hale getirilerek -20 °C'de saklanmıştır. EIA kiti ile yapılan ölçüm sonrasında örnekteki PGE₂ miktarı pg/g doku olarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Anjiyotensin II Tayini

Plazma Anjiyotensin II miktarının analizi için, Angiotensin II radioimmunoassay kiti kullanılmıştır.

Reaktifler ve Kimyasallar

- 1) Ang II RIA kiti (Euria-Diagnostica, Angiotensin II radioimmunoassay, RB320)
- 2) Etanol (C₂H₅OH, % 99.5'lik Absolü alkol)

İşlemler: Deneyin bitiminden sonra deneklerden alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak, 4°C'de 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen plazma deney tüplerine alınarak plazmalar -20°C'de saklanmıştır.

Anjiyotensin II ölçümü yapılırken buz üstünde çalışmaya özen gösterilmiştir. Plazmadan alınan 1 ml örneğin üstüne 4 ml soğutulmuş etanol (C₂H₅OH % 99.5'lik Absolü alkol) eklenmiş, karıştırıldıktan sonra 2 dk süresince vortekslenmiştir. 4°C'de 2000 g'de 15 dk süresince santrifüj edildikten sonra süpernatant deney tüpüne alınmış ve azot gazı altında uçurma işlemi yapılarak analiz edilmek üzere hazır hale getirilmiştir. RIA kiti ile yapılan ölçüm sonrasında plazma Ang II düzeyi pmol/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.8. iNOS ve COX - 2 Ekspresyonunun Tayini

iNOS ve COX-2 proteinlerinin analizi western blot yöntemine göre yapılmıştır [10, 112].

Reaktifler ve Kimyasallar

- 1) % 30'luk Akrilamid – Bisakrilamid karışım solüsyonu (Akrilamid, Merck, S-4385430-552, Bisakrilamid, Merck-K-33932646-526)
- 2) % 10'luk Amonyum persülfat (APS, Merck, K-34485101-530)
- 3) TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin) (Merck, K-34460932-517)
- 4) Redüklenmemiş Numune Tamponu (Loading Dye, Laemli, 5X konsantre)
Laemli tamponu hazırlanırken,
10 ml Gliserol (Sigma, G-7757),
10 ml % 10 SDS (Sigma, L-4509),
1.25 ml 1 M pH: 6.8 Tris (Merck, K-34776287-533),
7.5 ml β-merkaptotanol (Merck, S-4365840-544) ve brom fenol blue (Sigma, B-6896) karıştırılıp final hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su eklenmiştir.
- 5) Elektroforez tamponu (5X konsantre Stok Solüsyon)
Elektroforez tamponu hazırlanırken,
15 gr Tris,
72 gr Glisin (Merck, K-32710490-405)
5 g SDS 1000 ml distile su içinde çözülmüştür.
Elektroforez aşamasında bu stok solüsyon 1:5 oranında bidistile su ile dilüe edilmiştir.

- 6) Blotlama Tamponu, (10X Konsantre Stok Solüsyon)
12.11 g Tris (Merck, K-34776287-533)
30 g Glisin (Merck, K-32710490-405)
1 g Etilen Diamin Tetra Asetikası (EDTA, ADR Lab. Chem. 139-13-9),
1 L bidistile suda çözülmüştür. Blotlama aşamasında 10X stok solüsyon 1:10 oranında bidistile su ile dilüe edilmiş, kullanım esnasında %10 metanol (Merck, K34212908-503) eklenmiştir.
- 7) TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer Salın, 10X Konsantre Stok Solüsyon)
TBS solüsyonu hazırlamak için 60.55 g Tris, 87.66 g NaCl 800 ml distile suda çözülmüş, pH, HCl ile 7.4'e ayarlanmış ve final hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su eklenmiştir. Kullanım esnasında 10X stok solüsyon 1:10 oranında bidistile su ile dilüe edilmiştir.
- 8) TBS-T Solüsyonu (Tris Buffer Salın-Tween 20)
TBS-T Solüsyonunu hazırlamak için, TBS stok solüsyondan (10X), 100 ml alınıp, bidistile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Solüsyona 1 ml Tween-20 (Merck, S4393684-601) eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- 9) iNOS Primer Antikoru (Santa Cruz, sc-650)
Kullanım esnasında 1:1000 oranında dilüe edilmiştir.
- 10) COX-2 Primer Antikoru (Santa Cruz, sc-7951)
Kullanım esnasında 1:1000 oranında dilüe edilmiştir.
- 11) Beta Aktin Primer Antikoru (Novus Biologicals NT 1907)
Kullanım esnasında 1:500 oranında dilüe edilmiştir.
- 12) Peroksidaz Konjuge Sekonder Antikor (Chemicon, AP132P)
Kullanım esnasında 1:3000 oranında dilüe edilmiştir.

İşlemler

Doku Örneklerinin Hazırlanması

iNOS ve COX-2 proteinlerinin tayini için mideden alınan ve sıvı nitrojen tankının içinde saklanan örnekler daha etkili bir sonikasyon için, buz üstünde küçük parçalara ayrılmıştır. 0.2 g doku için 600 µl lysis tampon ve lysis tampon + doku karışımının her 1 mL'si için 50 µl olacak şekilde protein inhibitör kokteyli (Sigma-9417) eklenerek vortekslenmiş, buz içinde 30 dk bekletildikten sonra 15000 rpm de 4°C de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar hemen buz kalıbına alınmış ve örneklerin protein analizleri ticari protein kiti ile yapılmıştır (Pierce-23236). Örnekler SDS jelle yüklenmeden önce laemli ile karıştırılarak 5 dk kaynatılmış ve yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

Elektroforez ve Antikorların Uygulanması

Örnekler içerdikleri proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları için % 8'lik Sodyum Dodesil Sülfat poliakrilamid jele yüklenmiştir. Moleküler ağırlık standartı (Biorad-161-0324) ve numuneler 2 saat süresince 80V da elektroforez edilmiştir. Jeldeki proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra, membran, % 5'lik süttozu (Biorad-170-6404) içeren TBS tamponu kullanılarak 1 saat 22°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBST ile 1-2 defa yıkanan membran TBST ile hazırlanmış %5'lik BSA ve primer antikorları içeren solüsyon ile 4°C'de çalkalayıcı içinde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası membran TBST ile 3-10 dakika yıkanarak fazla antikorlar uzaklaştırılmış, ardından membran, %5'lik süttozu ve 1:3000 oranında dilüe edilmiş sekonder antikor içeren TBST tamponu ile 1 saat 22°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBST ile 3-10 dk yıkama yapılmış ve membranlar görüntüleme aşaması için hazır hale getirilmiştir.

Görüntüleme ve Değerlendirme

Sekonder antikorla konjuge peroksidaz enziminin, kemiluminisans oluşturan ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı (Cemilucient detection system, Chemicon-2600), nitroselüloz membranların üzerine uygulanmış ve 5 dk beklenmiştir. Bekleme süresi sonrasında membranların üzerindeki fazla ECL solüsyonu kurutma kağıdı ile alınarak membranlar ve fotoğraf filmi western kasetine yerleştirilmiş membrandaki antikor bağlanmalarının görüntüsü fotoğraf filmine (Hyperfilm) aktarılmıştır.

Görüntülerin yarı kantitatif analizi için bilgisayar ortamına aktarılan film paternleri, bilgisayar yazılımı (image J paket programı) yardımı ile değerlendirilmiş ve sonuçlar her grup için, iNOS/ β aktin, COX-2/ β aktin şeklinde beta aktin proteininin miktarına oranlanarak ayrı ayrı hesaplanmıştır.

3.3. İstatistiksel Analiz

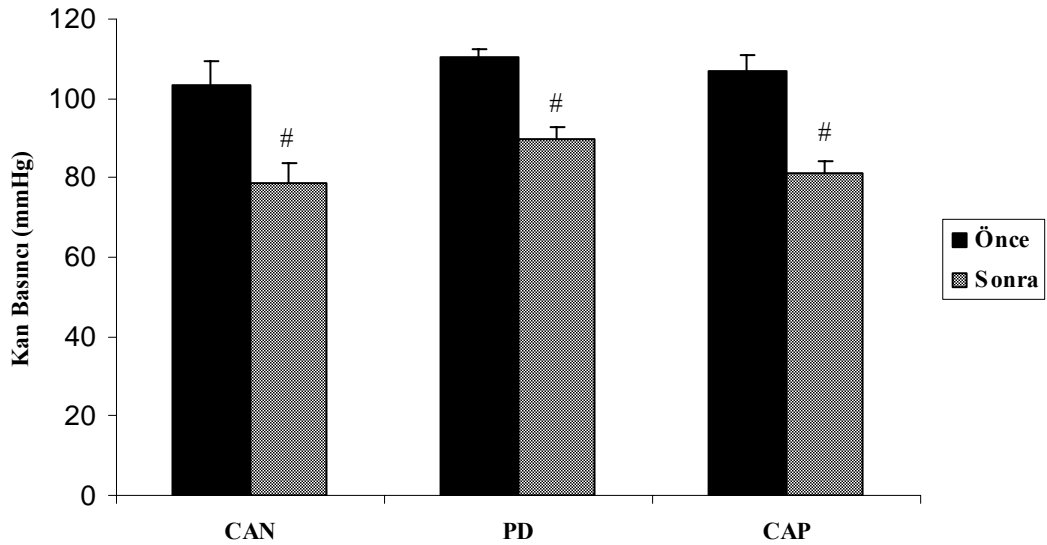
İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Versiyon 15.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm parametreler için gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis Varyans Analizi ile ikili gruplar arasındaki farklar ise Mann-Whitney U Testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edilmiştir. Bütün analizlerde $p < 0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Yapılan analizler sonucunda kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel fark bulunmadığı için deney gruplarının sonuçları, sham grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

4.1. Kan Basıncı Değerleri

Ortalama kan basıncı değerleri Candesartan, PD123319 ve Captopril uygulamalarından önce sırasıyla 103.50 ± 5.94 , 110.60 ± 1.75 ve 106.80 ± 4.00 mmHg olarak ölçülmüştür. Bloker uygulamalarından sonra ise kan basıncı değerlerinin sırasıyla 78.56 ± 5.38 , 89.50 ± 3.44 ve 81.25 ± 2.72 mmHg değerlerine düştüğü gözlenmiştir. Uygulama öncesi ve sonrası farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4. Candesartan, PD123319 ve Captopril'in kan basıncı değerlerine etkisi. Kan basıncı ölçümleri reseptör blokerleri ve ACE inhibitörü verilmeden önce ve verildikten sonra yapılmıştır.

CAN: Candesartan, Ang II tip 1 reseptör blokeri

PD: PD123319, Ang II tip 2 reseptör blokeri

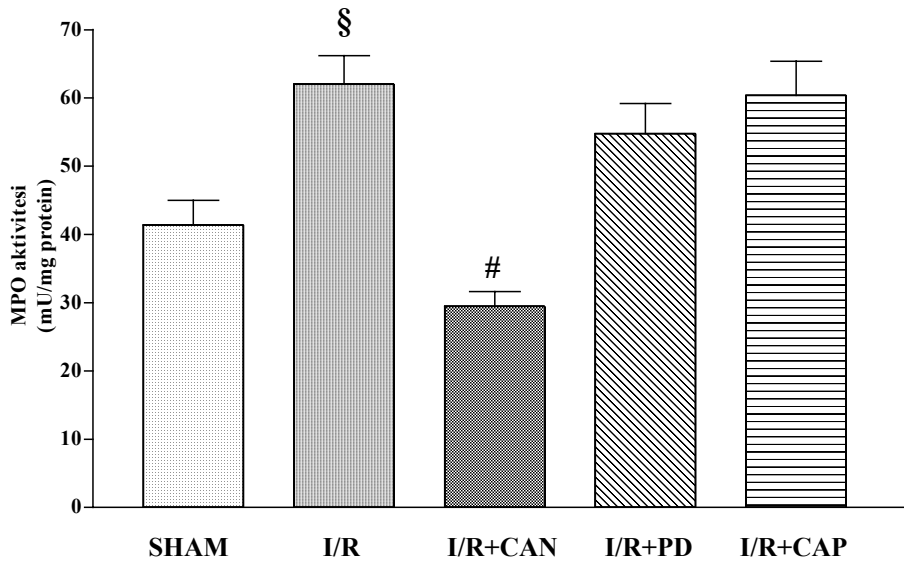
CAP: Captopril, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

$p < 0.05$ Reseptör blokerlerinin ve inhibitörün uygulanmasından önceki kan basıncı değerine göre fark

4.2. MPO Aktivitesi

Mide dokusunda nötrofil birikiminin göstergesi olan MPO enziminin aktivitesinin sham grubunda 41.44 ± 3.6 mU/mg protein iken, I/R'a bağlı olarak belirgin bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir (62.04 ± 4.2 mU/mg protein, $p < 0.01$).

Ang II'nin tip 1 reseptör blokeri olan candesartanın, I/R'a bağlı olarak yükselen MPO aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (29.47 ± 2.17 mU/mg protein, $p < 0.01$). MPO aktivitesi, I/R + PD123319 uygulanan grupta 54.76 ± 4.4 mU/mg protein, I/R + Captopril uygulanan grupta ise 60.37 ± 5 mU/mg protein olarak saptanmıştır. Anjiyotensin II tip 2 reseptör blokeri ve ACE inhibitörü uygulanan I/R gruplarında MPO aktivitesi, I/R uygulanan gruba göre farklı bulunmamıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. 30 dakika iskemi, 24 saat reperfüzyon modeli uygulanmış sıçan midesinde miyeloperoksidaz aktivitesi

CAN: Candesartan, Ang II tip 1 reseptör blokeri

PD: PD123319, Ang II tip 2 reseptör blokeri

CAP: Captopril, Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

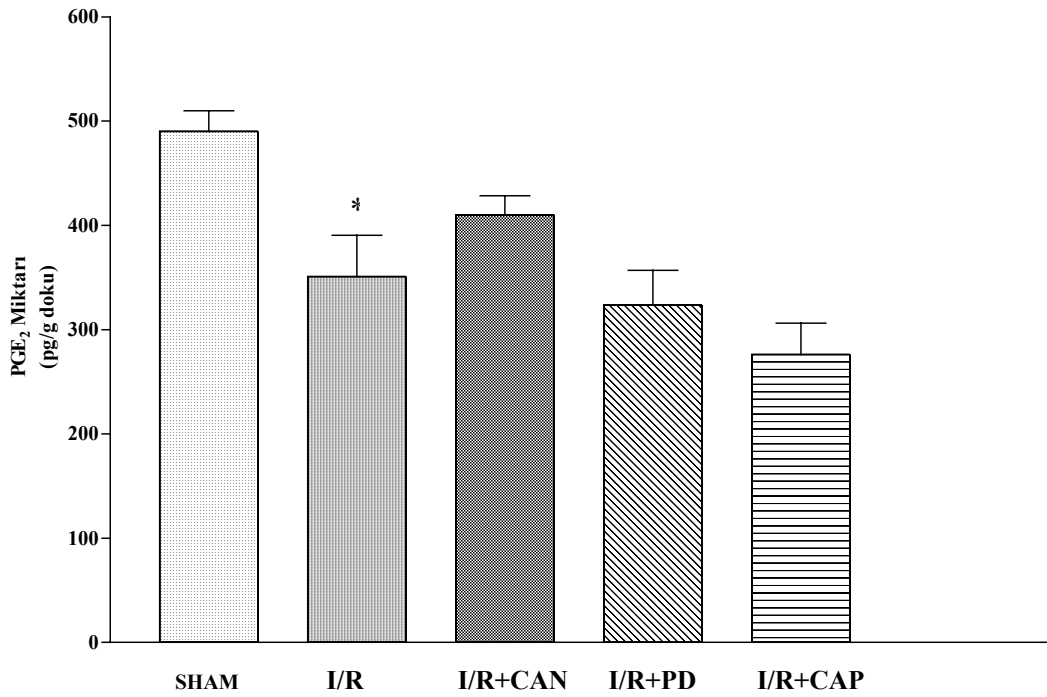
§ $p < 0.01$ Sham grubuna göre fark

$p < 0.01$ I/R grubuna göre fark

4.3. PGE₂ Miktarı

Sham grubunda 490.00 ± 19.87 pg/g doku olan PGE₂ miktarının, I/R grubunda belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir (351.56 ± 39.60 pg /g doku, $p < 0.05$).

PGE₂ miktarı, I/R + Candesartan uygulaması yapılan grupta 410.30 ± 18.27 pg /g doku, I/R + PD123319 uygulaması yapılan grupta 323.48 ± 33.40 pg /g doku, I/R + Captopril uygulaması yapılan grupta ise 276.17 ± 30.07 pg /g doku olarak ölçülmüş olup, I/R grubuna göre herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. 30 dakika iskemi, 24 saat reperfüzyon modeli uygulanmış sıçan mide mukozasında PGE₂ miktarı

CAN: Candesartan, Ang II tip 1 reseptör blokeri

PD: PD123319, Ang II tip 2 reseptör blokeri

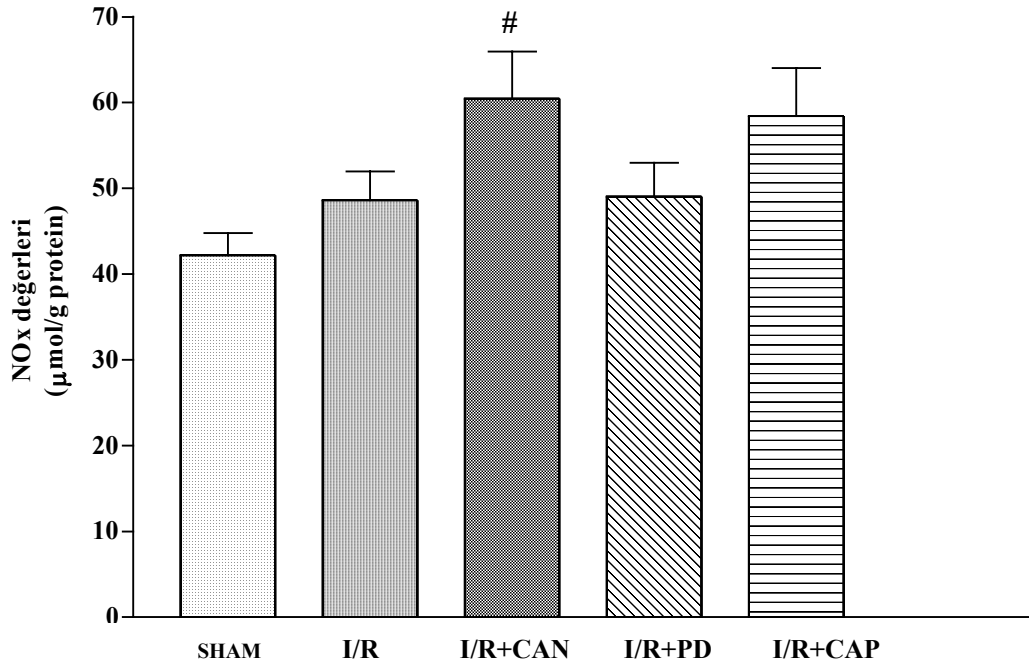
CAP: Captopril, Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

* $p < 0.05$ I/R grubunun sham grubuna göre farkı

4.4. NOx Değerleri

Mide mukozasında ölçülen nitrit ve nitrat değerlerinin toplanması ile elde edilen NOx değeri, sham grubunda 42.20 ± 2.58 $\mu\text{mol/g}$ protein iken, I/R grubunda 48.61 ± 3.35 $\mu\text{mol/g}$ protein, I/R + Candesartan uygulaması yapılan grupta 60.46 ± 5.48 $\mu\text{mol/g}$ protein, I/R + PD123319 uygulaması yapılan grupta ise 49.03 ± 3.93 $\mu\text{mol/g}$ protein, ve I/R + Captopril uygulaması yapılan grupta 58.43 ± 5.6 $\mu\text{mol/g}$ protein saptanmıştır.

Sonuçlar karşılaştırıldığında, I/R + Candesartan uygulaması yapılan grupta I/R grubuna göre artış tespit edilmiştir ($p < 0.05$ Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. 30 dakika iskemi, 24 saat reperfüzyon modeli uygulanmış sıçan midesinde NOx (nitrit+nitrat) değerleri

CAN: Candesartan, Ang II tip 1 reseptör blokleri

PD: PD123319, Ang II tip 2 reseptör blokleri

CAP: Captopril, Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

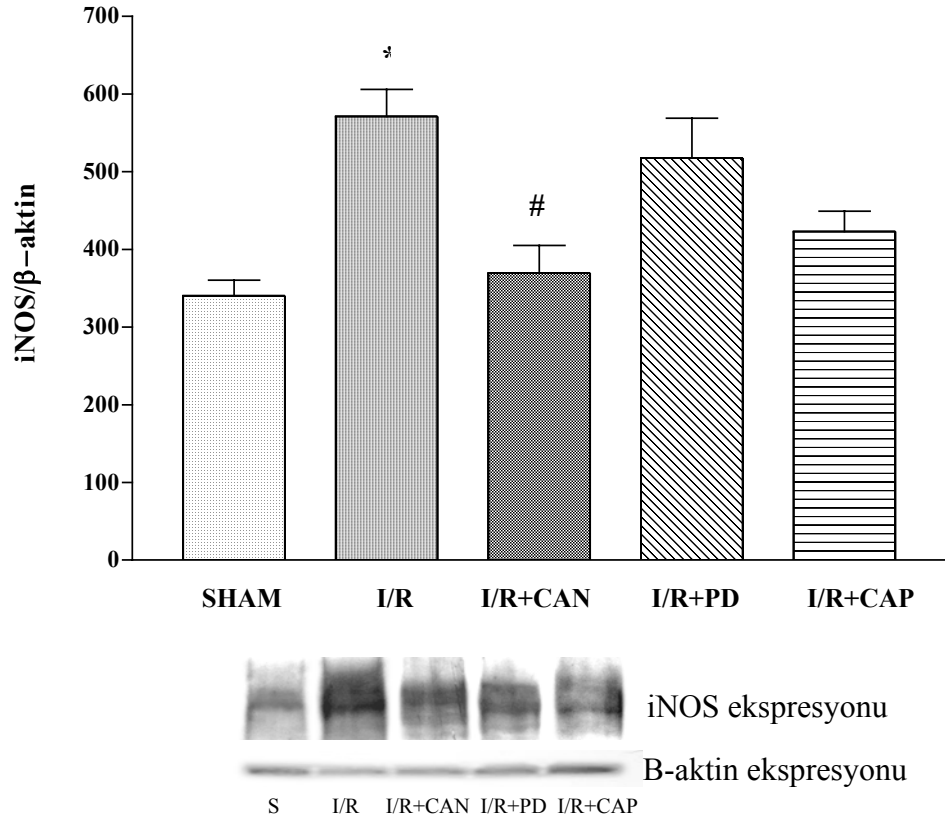
$p < 0.05$ I/R grubuna göre fark

4.5. iNOS ve COX-2 Ekspresyonları

4.5.1 iNOS Ekspresyonu

Mide dokusundan alınan örneklerde iNOS miktarının, aktin miktarına oranı, sham grubunda 340.26 ± 20.26 iken, I/R grubunda belirgin bir şekilde yükseldiği, (571.35 ± 34.55 , $p < 0.05$) I/R + Candesartan uygulaması yapılan grupta ise (369.53 ± 35.73 , $p < 0.05$) düştüğü tespit edilmiştir.

iNOS/ β -aktin, I/R + PD123319 uygulaması yapılan grupta 517.71 ± 51.32 , I/R + Captopril uygulaması yapılan grupta ise 422.91 ± 26.43 olarak saptanmıştır. Anjiyotensin II tip 2 reseptör blokleri ve ACE inhibitörü uygulanan I/R gruplarında iNOS ekspresyonu, I/R uygulanan gruba göre farklı bulunmamıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. 30 dakika iskemi, 24 saat reperfüzyon modeli uygulanmış sıçan midesinde iNOS ekspresyonu

CAN: Candesartan, Ang II tip 1 reseptör blokleri

PD: PD123319, Ang II tip 2 reseptör blokleri

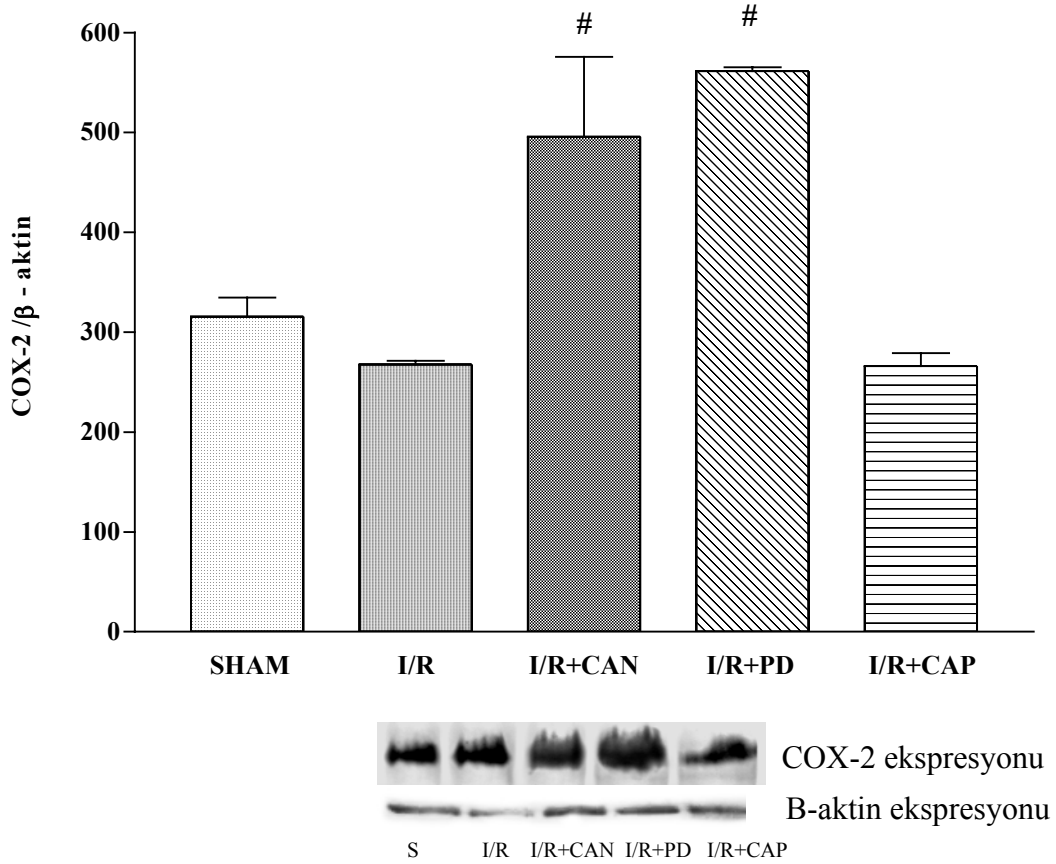
CAP: Captopril, Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

p<0.05 I/R grubuna göre fark
* p<0.05 Sham grubuna göre fark

4.5.2. COX-2 Ekspresyonu

Mide dokusundan alınan örneklerde COX-2 miktarının, β -aktin miktarına oranı, sham grubunda 315.55 ± 19.18 iken, I/R + Candesartan ve I/R + PD123319 gruplarında belirgin bir şekilde yükseldiği, (495.71 ± 80.00 , 561.35 ± 4.00 , $p<0.05$) tespit edilmiştir.

COX-2/ β -aktin oranı, I/R grubunda (267.55 ± 4.00) ve ACE inhibitörü uygulanan I/R gruplarında (265.91 ± 13.40) ise değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. 30 dakika iskemi, 24 saat reperfüzyon modeli uygulanmış sıçan midesinde COX-2 ekspresyonu

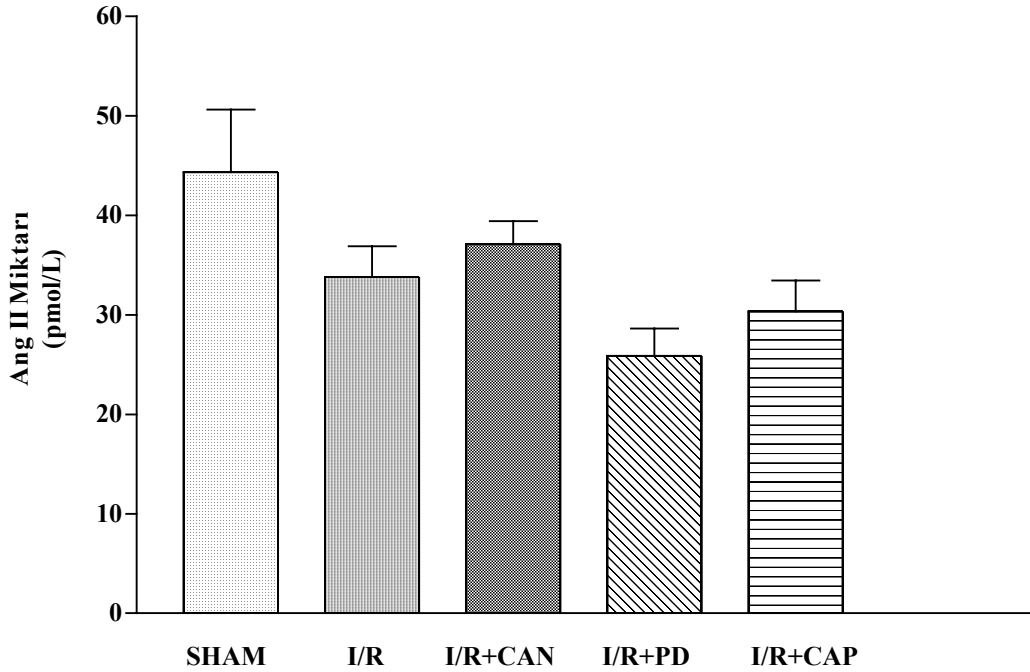
CAN: Candesartan, Ang II tip 1 reseptör blokeri
PD: PD123319, Ang II tip 2 reseptör blokeri
CAP: Captopril, Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

p< 0.05 I/R grubuna göre fark

4.6. Plazma Ang II Miktarı

Kan plazmasından ölçülen Ang II miktarı sham grubunda 44.37 ± 6.29 pmol/L, I/R grubunda 33.82 ± 3.08 pmol/L, I/R + Candesartan uygulaması yapılan grupta 37.13 ± 2.31 pmol/L, I/R + PD123319 uygulaması yapılan grupta 25.88 ± 2.76 pmol/L ve I/R + Captopril uygulaması yapılan grupta 30.35 ± 3.12 pmol/L olarak ölçülmüştür.

30 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon sonrası ölçülen plazma Ang II düzeyi deney grupları arasındaki farksız bulunmuştur (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Sıçan midesine uygulanan 30 dakika iskemi, 24 saat reperfüzyon sonrasında plazma Ang II düzeyleri

CAN: Candesartan, Ang II tip 1 reseptör blokeri

PD: PD123319, Ang II tip 2 reseptör blokeri

CAP: Captopril, Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

TARTIŞMA

I/R'a bağlı inflamatuvar süreçte yer alan iNOS ve COX-2 ekspresyonunda Ang II'nin rolünü belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada, çöliak arter bağlanarak mide dokusuna 30 dakika iskemi ve ardından 24 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Yapılan analizler sonucunda, uygulanan I/R'un mide dokusunda nötrofil birikimi ile beraber iNOS ekspresyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Ang II'nin tip I reseptörünün bloke edilmesi, I/R'a bağlı nötrofil birikiminin, ve iNOS ekspresyonunun baskılanmasına, mide dokusunda NO miktarının, COX-2 ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. Ang II tip 2 reseptör blokeri de COX-2 ekspresyonunu artırmıştır.

Çalışmada, ajanların kullanıldığı dozlarda etkinliğini saptamak amacıyla bir ön çalışma yapılmış ve kan basıncı değerlerindeki değişiklikler tespit edilmiştir. AT₁ reseptör blokeri olan candesartan'ın kullanımına bağlı olarak beklentimiz doğrultusunda vazomotor gevşemeyle ilişkili olarak kan basıncı düşüşü olmuştur. Çünkü Ang II'nin vazokonstriktör etkisi AT₁ reseptörü, eNOS proteinini artırıcı etkisi ise AT₂ reseptörü üzerinden olmaktadır [113, 114]. Candesartan uygulamasına bağlı olarak AT₁ reseptörünün işlevinin engellenmesiyle birlikte, AT₂ reseptörüne bağlanan Ang II'nin etkisiyle oluşan eNOS aktivasyonu ile ilişkili olarak vazorelaksasyon gerçekleşmiştir. Bu görüş doğrultusunda Ang II Tip 2 reseptör blokeri olan PD123319'un kullanımı ile kan basıncında artış beklenmiştir. Fakat elde ettiğimiz bulgular, PD123319'un kan basıncını düşürdüğünü göstermiştir. Bu bulgumuz, Thai ve ark.'larının [115] çalışmasıyla uyumlu olup, Ang II'nin AT₂ reseptörünün bloke edilmesiyle gözlenen kan basıncı düşüşünün mekanizması bilinmemektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, PD123319'un kan basıncını düşürücü etkisinin eNOS aktivasyonunu inhibe edici etkisine göre daha baskın olduğunu göstermektedir.

I/R; nötrofil aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda yapımı ve mikrovasküler fonksiyon bozukluğu ile ortaya çıkan mide lezyonları için iyi bilinen bir modeldir. Mide mukozal bariyerinin bileşeni olan prostaglandinlerin ve nitrik oksit'in bu lezyonların oluşumunda ve iyileşmesindeki rolleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, iskeminin mide mukozal bariyerini zayıflattığını, mukozadan asit geri emilimini arttırdığını ve bu nedenle mukozanın daha kolay tahrip edilebilir duruma geldiğini göstermiştir [8, 22]. Reperfüzyon ile dokunun yeniden kanlanması ile oluşan reaktif oksijen türleri ve nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonunu artırarak, mide asidinin zararlı etkisiyle birlikte hücre ölümüne ve mukozal hasara neden olmaktadır [116]. Midede I/R hasarı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir [38]. Çöliak arter klemplenerek iskemi oluşturulmuş ve devamında sağlanan kanlanma ile 24 saate kadar derinleşen mide lezyonları meydana gelmiştir.

Başlangıçta yüzeysel kanama şeklindeki lezyonlar dokuda nötrofil birikimiyle birlikte ülserleşmiş lezyonlar haline dönüşmektedir [38].

MPO nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan, hem kapsayan bir enzimdir ve bu enzimin aktivitesi dokudaki nötrofil birikiminin göstergesidir. Ang II'nin I/R uygulanan dokuya nötrofil geçişini arttırdığı bilinmektedir [117]. Candesartan'ın nötrofil birikimini baskılaması mide mukozasının I/R hasarından korunmasında önemlidir [20]. Lökosit aracılı doku hasarı, oksidatif patlama, proteolitik enzim salınımı, kapiller tıkanma ve vazokonstriktör prostanoidlerin salınımı ile oluşur [20, 21, 22]. İskemik dokuya nötrofil birikimi iskemiden sonraki 12-24 saat içinde olur ve 3-4 gün maksimum düzeyde kalır. Sonra yerini makrofajlar alır. İskemi sonrası reperfüzyon, nötrofil birikimini hızlandırır [21].

Ang II'nin dokuya nötrofil geçişini arttırıcı etkisinin AT₁ reseptörü üzerinden olduğunu gösteren bulgumuz, barsak dokusu ile çalışan Takagi ve ark.'larını [20] destekler niteliktedir. Ang II, AT₁ reseptörü aracılığı ile IL-1, IL-8, MIP-2 gibi kemokinlerin salınımını sağlayarak, ayrıca endotel-nötrofil etkileşiminde görevli ICAM, VCAM gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonu ile nötrofillerin dokuya geçişini arttırmaktadır. AT₁ reseptörünün bloke edilmesi I/R uygulanan dokuda MPO aktivitesini baskılamaktadır.

Ang II'nin I/R uygulanan dokuya nötrofil geçişini arttırması göz önüne alınarak, Ang II oluşumunda görevli ACE'nin inhibe edilmesi sonucu iskemik dokuya nötrofil geçişinin azalması beklenmiştir. Ancak çalışmamızın sonucunda Fischer ve ark.'larının [118] çalışmasına benzer şekilde iske mi ve perfüzyon öncesi uygulanan captopril'in dokudaki MPO aktivitesini de ğiştirmedi ği tespit edilmiştir. Bunun nedeni anjiyotensin sisteminin immünomodülatör etkisi olabilir. Constantinescu ve ark.'ları [119] captopril'in bir proinflatuar sitokin olan TNF- α yapımını azalttığını belirtmişlerdir. Captopril'in sitokinlerin yapımı üzerine etkisinin mekanizması henüz bilinmemektedir. Captopril'in iskemik doku üzerine olan koruyucu etkisi bu inflamatuar ve koruyucu sistemler arasındaki etkileşime ba ğlı olabilir.

Prostaglandin sentezi, eikosanoidlerin sentezinde bir hız sınırlandırıcı enzim olan COX'un aktivitesine ba ğlıdır. COX enziminin, COX-1 olarak isimlendirilen yapısal formu normal koşullarda PG yapımından sorumlu olup mukozal bütünlüğün ve mukozal kan akımının sürdürülmesi gibi fizyolojik fonksiyonlarda önemlidir. Stimüle edilebilir formu olan COX-2 dokularda yapısal olarak bulunmaz, inflamasyon koşullarında ortaya çıkar. COX-2'nin gen ekspresyonu, I/R sırasında artan IL-1 β ve TNF- α gibi proinflatuar sitokinler tarafından stimüle edilir [120, 121].

Daha önceki birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da, I/R'a maruz kalmış mide mukozasında PGE₂ yapımı azalmıştır [15, 122]. PGE₂ yapımı lezyonların iyileşmesi döneminde önem kazanmaktadır. Bu dönemde özellikle COX-2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [122, 123]. Bu durum, COX-2'nin mukozal lezyonların sınırlandırılması ve lezyon iyileşmesi ile ilgili olduğu fikrini vermektedir. COX-1 sağlam mukozada yaygın olarak bulunduğu halde, I/R uygulanmış veya

inflamasyonlu dokuda belirgin olarak azalmaktadır. COX-2 ise inflamasyon olan dokuda, lezyona yakın olan bölgede artmaktadır [123, 124]. Hiratsuka ve ark.ları'nın [125] çalışmasında mide dokusuna uygulanan iskemi reperfüzyon sonrasında COX-2 ekspresyonunun mide mukozasında koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir. Selektif COX-2 inhibitörü uygulanması sonucu ICAM-1 ekspresyonunun artması, COX-2'nin adezyon molekülleri için baskılayıcı özelliğini ortaya koymaktadır. Nötrofillerin dokuya girişini engelleyen bu özellik, COX-2'nin mukozal hasara karşı koruyucu olduğunu düşündürmektedir. Cheng ve ark.'larının çalışmasında, Ang II infüzyonu renal kortikal COX-2 ekspresyonunu baskılayarak, anjiyotensin reseptör blokerlerinin özellikle AT₁ reseptör blokerinin kullanılması ile, COX-2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [126].

Benzer şekilde bizim çalışmamızda da, Ang II tip 1 reseptör blokeri uygulanan I/R gruplarında COX-2 ekspresyonu artmış olup, bu artış, COX-2 etkisi ile azalan ICAM ekspresyonu aracılı MPO aktivitesindeki azalma ile uyumludur. NO'nun COX-2 ekspresyonu için önemli bir düzenleyici molekül olduğu bilinmektedir. NO, COX-2 ekspresyonunu artırarak hasarlı mukozanın iyileşmesine katkıda bulunur. Çalışmamızda Ang II reseptör blokeri uygulanan I/R gruplarında artan COX-2 ekspresyonu NO artışı ile örtüşmektedir.

COX-2 enzim inhibitörü verilerek yapılan çalışmalarda, çeşitli faktörlerle lezyon oluşturulan midede PG yapımının sadece ülser bölgesinde azaldığı gösterilmiştir. Diğer bir deyişle, inflamatuvar faktöre bağlı olarak gelişen lezyonların olduğu bir midede, COX-2 mRNA ve protein ekspresyonu sadece lezyon bölgesinde olmaktadır [56]. Bu nedenle çalışmamızda, I/R'a bağlı olarak PGE₂ düzeyi düşük bulunmuş, COX-2 ekspresyonu değişmemiş olabilir. Anjiyotensinin PGE₂ sentezi üzerine etkisi AT₂ reseptörü aracılığıyla TNF- α ve GM-CSF yapımına bağlıdır [120], [127]. AT₁ reseptörünün bloke edildiği durumda AT₂ reseptörüne bağlanan Ang II'nin etkisi ile PGE₂ miktarında artış beklenebilir. Ancak AT₂ reseptörünün midedeki yoğunluğu AT₁ reseptörüne göre azdır [120]. Bu nedenle candesartan kullanılan grubun I/R'a maruz kalmış mide dokularında PGE₂ miktarındaki artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. PD123319 ve captopril verilen gruplarda da PGE₂ miktarında azalma eğilimi olmasına rağmen istatistiksel olarak fark saptanmamıştır.

NO, biyolojik sistemlerde L-arjinin'in guanidin grubundan, NOS enziminin varlığında oluşan, bir molekül olup, geniş bir etki alanı, serbest oksijen radikalleri ve geçiş metallerini içeren farklı hedefleri vardır [128]. Süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit molekülünü yapar. Peroksinitrit dokularda oluşan I/R hasarı için önemli role sahiptir [129]. NO'nun indüklenebilir NOS (iNOS) aracılığı ile aşırı olarak sentezlenmesi bağırsakta oluşan I/R hasarının oluşumuna katkıda bulunur. Sıçanda mezenterik reperfüzyon ile indüklenen inflamasyonda, iNOS ekspresyonu artar [22]. Çalışmamızda I/R uygulanan gruptaki iNOS ekspresyonunun artışı literatürle uygun olarak, beklentimiz doğrultusundadır.

Ang II, inflamatuvar cevaba, lökosit aktivasyonunu sağlayarak ve iNOS gibi NO üretici faktörlerin regülasyonunu sağlayarak katılır. Bu görevini, inflamasyonla ilişkili olan NF- κ B'nin aktivasyonunu artırarak yaptığı bilinmektedir [21].

Anjiyotensin II'nin ACE inhibitörleri ve/veya AT₁ reseptör blokerleri ile inhibisyonu sonucu iNOS ekspresyonu azalır. Çalışmamızda I/R uygulaması sonucu artan, AT₁ reseptör blokeri candesartan uygulanan I/R grubunda azalan iNOS ekspresyonu, I/R'a bağlı iNOS ekspresyonundaki artışın AT₁ reseptörü aracılığı ile Ang II'ye bağlı olabileceğini göstermektedir. AT₂ reseptör blokeri PD123319 ve ACE inhibitörü captopril uygulanan I/R gruplarında ise azalma vardır, ancak istatistiksel olarak önemli değildir.

Mide mukozasının nitrit + nitrat konsantrasyonu, cNOS ve/veya iNOS'a bağlı NO yapımının bir göstergesidir. Çünkü dokudaki NOS etkisiyle yapılan NO hızla metabolitleri olan nitrit ve nitrate parçalanır [130]. Bu nedenle, dokudaki NOS artışının nitrit + nitrat miktarını da arttıracığı düşünülmüştür. Çalışmamızda 30 dakika iskemi ve 24 saatlik reperfüzyon sonrasında iNOS miktarı artmış olmasına karşın NO miktarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgumuz aynı deney modelini kullanan araştırmacıların sonuçları ile uyumludur [128]. Çalışmamızda cNOS miktarına bakılmamıştır. Ancak I/R sonrası cNOS miktarının azaldığı, iNOS miktarının arttığı bilinmektedir. cNOS miktarındaki azalmaya bağlı olarak, sadece lezyona yakın bölgede artmış olan iNOS etkisiyle yapılmış olan NO miktarı shamden farksız bulunmuş olabilir. Bu bulgunun bir diğer açıklaması 24 saatlik reperfüzyon sonrasında çeşitli adaptif mekanizmaların etkisiyle NO yapımındaki artışın baskılanmış olmasıdır. Nitekim Nilakantan ve arkadaşlarının [128] çalışmasında mideye uygulanan 30 dk iskemi ve 3 saatlik reperfüzyon modelinde iNOS miktarı ile birlikte NO'nun artmış olması ve 24 saatlik reperfüzyon sonucunda iNOS miktarındaki artış devam etmesine rağmen NO'nun sham ile aynı olması çalışmamızı destekler niteliktedir. Çalışmamızda candesartan ve captopril verilen I/R gruplarında mide NO_x miktarlarının azalmış olmasını beklemekteydik. Fakat her iki grupta da captopril grubunda istatistiksel fark olmamasına rağmen, artış tespit edilmiştir. Captopril grubundan elde ettiğimiz sonuç literatür ile uyumlu olup, NO_x miktarındaki artış iki mekanizma ile açıklanabilir. ACE inhibisyonu bradikinin yıkımını önleyerek bradikinin aracılı NO salınımını arttırmaktadır [131, 132]. ACE bradikinin için yüksek afiniteli bir peptid olup, yıkımına neden olur. ACE inhibisyonu bradikinin aracılı NO salınımını artırır [132]. Bunun yanı sıra captopril iNOS aktivitesini artırarak NO_x artışını sağlamış olabilir. ACE inhibitörlerinin NOS aktivitesini arttırdığına dair bulgular vardır [42, 133, 134]. Candesartan veya losartanın da AT₂ reseptörü aracılığıyla bradikinin-NO yolağını aktive ederek NO salınımını artırdığına dair bulgular bizim bulgumuzu desteklemektedir [130, 135].

I/R, uygulandığı dokuda Ang II oluşumunu tetikleyen bir süreçtir. Lokal Ang II oluşumu ACE'den bağımsız yolaklarla (kinazlar, serin proteazlar gibi) ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda çöliak arter bağlanması ile oluşturulan 30 dk'lık iskemi ve 24 saatlik reperfüzyon sonucunda Ang II düzeyinde artış tespit edilmemiştir. ACE inhibitörü captopril ise Ang II düzeyini shame göre azaltmış, ancak tam bir inhibisyon gözlenmemiştir.

SONUÇLAR

- 1) I/R uygulanan mide dokusunda artan nötrofil birikimi, Ang II'nin tip 1 reseptörünün bloke edilmesiyle önlenebilmektedir.
- 2) I/R uygulanan mide dokusunda artan iNOS ekspresyonu, Ang II'nin tip 1 reseptörünün bloke edilmesiyle önlenebilir.
- 3) I/R uygulamasına bağlı olarak mide dokusunda değişmeyen COX-2 ekspresyonu, Ang II'nin tip 1 ve tip 2 reseptör blokerlerinin kullanımı ile artmaktadır.
- 4) Ang II'ni tip 1 reseptör blokerin kullanımı I/R uygulanan mide dokusunda NO salınımını artırmaktadır.

Kısaca; Ang II'nin AT₁ reseptörü aracılığı ile I/R'a bağlı inflamatuvar süreçte mide dokusundaki artmış iNOS ekspresyonundan sorumlu olabileceği ve COX-2 ekspresyonunu azaltabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Suzuki Y., Ruperez M., and Egido J.: Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10(3): 321-9, 2001.
2. Saavedra J. M.: Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol.* 25(3-4): 485-512, 2005.
3. Suzuki Y., Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Ruperez M., Esteban V., and Egido J.: Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(6): 881-900, 2003.
4. Miyazaki M. and Takai S.: Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res.* 24(3): 189-93, 2001.
5. Riaz A. A., Wang Y., Schramm R., Sato T., Menger M. D., Jeppsson B., and Thorlacius H.: Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon. *FASEB J.* 18(7): 881-3, 2004.
6. Surh Y. J., Chun K. S., Cha H. H., Han S. S., Keum Y. S., Park K. K., and Lee S. S.: Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* 480-481: 243-68, 2001.
7. Rankin J. A.: Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues.* 15(1): 3-17, 2004.
8. de Groot H. and Rauen U.: Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc.* 39(2): 481-4, 2007.
9. Jiang B., Xu S., Hou X., Pimentel D. R., and Cohen R. A.: Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK. *J Biol Chem.* 279(19): 20363-8, 2004.
10. Chanani N. K., Cowan D. B., Takeuchi K., Poutias D. N., Garcia L. M., del Nido P. J., and McGowan F. X., Jr.: Differential effects of amrinone and

milrinone upon myocardial inflammatory signaling. *Circulation*. 106(12 Suppl 1): I284-9, 2002.

11. Victor V. M., Rocha M., and De la Fuente M.: Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol*. 4(3): 327-47, 2004.
12. Sanz-Rosa D., Oubina M. P., Cediel E., de Las Heras N., Vegazo O., Jimenez J., Lahera V., and Cachofeiro V.: Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288(1): H111-5, 2005.
13. Playford R. J. and Ghosh S.: Cytokines and growth factor modulators in intestinal inflammation and repair. *J Pathol*. 205(4): 417-25, 2005.
14. Wallace J. L.: Recent advances in gastric ulcer therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 5(6): 573-7, 2005.
15. Derin N., Izgut-Uysal V. N., Agac A., Aliciguzel Y., and Demir N.: L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J Physiol Pharmacol*. 55(3): 595-606, 2004.
16. Majno G. and Joris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 146(1): 3-15, 1995.
17. Cotran RS K. V., Robbins SL. [Çevikbaş U (Çeviren)]: Onarım:Hücre Büyümesi,Rejenerasyon ve Yara iyileşmesi. *Temel patoloji*. Nobel ve Yüce. İstanbul 5. Baskı.:(1995.
18. Zimmerman B. J. and Granger D. N.: Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*. 72(1): 65-83, 1992.
19. Parks D. A. and Granger D. N.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. 250(6 Pt 1): G749-53, 1986.
20. Takagi T., Yoshida N., Isozaki Y., Shimosawa M., Katada K., Manabe H., Hanada O., Kokura S., Ichikawa H., Naito Y., Okanoue T., and Yoshikawa T.: CV-11974, angiotensin II type I receptor antagonist, protects against ischemia-reperfusion injury of the small intestine in rats. *Eur J Pharmacol*. 535(1-3): 283-90, 2006.
21. de Gusmao F. M., Becker C., Carvalho M. H., and Barros L. F.: Angiotensin II inhibition during myocardial ischemia-reperfusion in dogs: effects on leukocyte infiltration, nitric oxide synthase isoenzymes activity and left ventricular ejection fraction. *Int J Cardiol*. 100(3): 363-70, 2005.

22. Cerqueira N. F., Hussni C. A., and Yoshida W. B.: Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras.* 20(4): 336-43, 2005.
23. Bilbao G., Contreras J. L., Eckhoff D. E., Mikheeva G., Krasnykh V., Douglas J. T., Thomas F. T., Thomas J. M., and Curiel D. T.: Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg.* 230(2): 185-93, 1999.
24. Lu Y. T., Hellewell P. G., and Evans T. W.: Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1): L46-54, 1997.
25. Symon L.: The scientific basis of cerebral infarction. In: Suzuki J. *Advances in surgery of cerebral stroke proceedings of the international symposium on surgery for cerebral stroke.* Springer-Verlag Press. 25(3-4): 237-9, 1987.
26. Winyard PG M. C., Winrow VR, Zaidi M, Blake DR. In: Rice-Evans CA, Burdon RH: *Free radical damage and its control.* Elsevier Science Press, England. 361-381, 1994.
27. İşlekel H., S. İ. L., GÜNER G.: Biochemical Mechanism And Tissue Injury Of Cerebral Ischemia And Reperfusion. *Curr Opin Gastroenterol.* 22(6): 599-606, 2000.
28. Reilly P. M., Schiller H. J., and Bulkley G. B.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 161(4): 488-503, 1991.
29. Braunwald E. and Kloner R. A.: Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest.* 76(5): 1713-9, 1985.
30. Chamoun F., Burne M., O'Donnell M., and Rabb H.: Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci.* 5: E103-9, 2000.
31. Matsui N., Kasajima K., Hada M., Nagata T., Senga N., Yasui Y., Fukuishi N., and Akagi M.: Inhibition of NF-kappaB activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Toxicol Sci.* 30(2): 103-10, 2005.
32. Serracino-Inglott F., Habib N. A., and Mathie R. T.: Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 181(2): 160-6, 2001.
33. Yabe Y., Kobayashi N., Nishihashi T., Takahashi R., Nishikawa M., Takakura Y., and Hashida M.: Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther.* 298(3): 894-9, 2001.

34. Dong M. H. and Kaunitz J. D.: Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol.* 22(6): 599-606, 2006.
35. Takeeda M., Hayashi Y., Yamato M., Murakami M., and Takeuchi K.: Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach. *J Physiol Pharmacol.* 55(1 Pt 2): 193-205, 2004.
36. Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., and Salvemini D.: Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 53(1): 135-59, 2001.
37. Shah D. M., Bock D. E., Darling R. C., 3rd, Chang B. B., Kupinski A. M., and Leather R. P.: Beneficial effects of hypertonic mannitol in acute ischemia--reperfusion injuries in humans. *Cardiovasc Surg.* 4(1): 97-100, 1996.
38. Wada K., Kamisaki Y., Ohkura T., Kanda G., Nakamoto K., Kishimoto Y., Ashida K., and Itoh T.: Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol.* 274(3 Pt 1): G465-71, 1998.
39. Delabar J. M., Nicole A., D'Auriol L., Jacob Y., Meunier-Rotival M., Galibert F., Sinet P. M., and Jerome H.: Cloning and sequencing of a rat CuZn superoxide dismutase cDNA. Correlation between CuZn superoxide dismutase mRNA level and enzyme activity in rat and mouse tissues. *Eur J Biochem.* 166(1): 181-7, 1987.
40. Slater T. F.: Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 222(1): 1-15, 1984.
41. Prem J. T., Eppinger M., Lemmon G., Miller S., Nolan D., and Peoples J.: The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg.* 178(2): 147-50, 1999.
42. Ibrahim M. A., Kanzaki T., Yamagata S., Satoh N., and Ueda S.: Effect of diabetes on aortic nitric oxide synthesis in spontaneously hypertensive rats; does captopril modulate this effect? *Life Sci.* 77(9): 1003-14, 2005.
43. Nejadkey F., Nahavandi A., Dehpour A. R., and Mani A. R.: Role of nitric oxide in the gastro-protective effect of lithium. *Pathophysiology.* 13(2): 85-9, 2006.
44. Gilad E., Wong H. R., Zingarelli B., Virag L., O'Connor M., Salzman A. L., and Szabo C.: Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.* 12(9): 685-93, 1998.

45. Patel K. P., Li Y. F., and Hirooka Y.: Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. *Exp Biol Med (Maywood)*. 226(9): 814-24, 2001.
46. Clancy R., Varenika B., Huang W., Ballou L., Attur M., Amin A. R., and Abramson S. B.: Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol*. 165(3): 1582-7, 2000.
47. Park E. K., Shin Y. W., Lee H. U., Kim S. S., Lee Y. C., Lee B. Y., and Kim D. H.: Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull*. 28(4): 652-6, 2005.
48. Guo J. S., Chau F. L., Cho C. H., and Koo M. W.: Worsening effect of partial sleep deprivation on indomethacin-induced gastric mucosal damage. *Pharmacol Biochem Behav*. 82(3): 515-21, 2005.
49. Qiao W. L., Wang L., Zhang J. F., and Zhang Y. M.: Effects of gastric ischemia-reperfusion on gastric mucosal cellular apoptosis and proliferation in rats. *Sheng Li Xue Bao*. 58(3): 237-43, 2006.
50. Flemstrom G. and Isenberg J. I.: Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. *News Physiol Sci*. 16: 23-8, 2001.
51. Mojzis J., Hegedusova R., and Mirossay L.: Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res*. 49(4): 441-6, 2000.
52. Tan R., Bulbul M., Ongut G., Tosun O., and Izgut-Uysal V. N.: Prostaglandins, capsaicin-sensitive sensory nerves and neutrophil infiltration, but not nitric oxide, contribute to cold restraint stress-induced gastric adaptation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 33(10): 946-51, 2006.
53. Nie S. N., Sun H. C., Wu X. H., and Qian X. M.: Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. *World J Gastroenterol*. 10(23): 3537-41, 2004.
54. Holzer P.: Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*. 16(6): 469-78, 2000.
55. Bhandari P., Bateman A. C., Mehta R. L., and Patel P.: Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. *Histopathology*. 46(3): 280-6, 2005.
56. Brzozowski T., Konturek P. C., Konturek S. J., Brzozowska I., and Pawlik T.: Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*. 56 Suppl 5: 33-55, 2005.

57. Liang Y. C., Huang Y. T., Tsai S. H., Lin-Shiau S. Y., Chen C. F., and Lin J. K.: Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*. 20(10): 1945-52, 1999.
58. Jin M., Otaka M., Okuyama A., Itoh S., Otani S., Odashima M., Iwabuchi A., Konishi N., Wada I., Pacheco I., Itoh H., Tashima Y., Masamune O., and Watanabe S.: Association of 72-kDa heat shock protein expression with adaptation to aspirin in rat gastric mucosa. *Dig Dis Sci*. 44(7): 1401-7, 1999.
59. Takahashi S., Takeuchi K., and Okabe S.: EP4 receptor mediation of prostaglandin E2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol*. 58(12): 1997-2002, 1999.
60. Takeuchi K., Suzuki K., Araki H., Mizoguchi H., Sugamoto S., and Umeda M.: Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. *J Physiol Paris*. 93(5): 423-31, 1999.
61. Slomiany B. L., Piotrowski J., and Slomiany A.: Suppression of caspase-3 and nitric-oxide synthase-2 during buccal mucosal ulcer healing: effect of chronic alcohol ingestion. *IUBMB Life*. 48(1): 121-5, 1999.
62. Akiba Y. and Kaunitz J. D.: Regulation of intracellular pH and blood flow in rat duodenal epithelium in vivo. *Am J Physiol*. 276(1 Pt 1): G293-302, 1999.
63. Holzer P.: Gastroduodenal mucosal defense: coordination by a network of messengers and mediators. *Curr Opin Gastroenterol*. 17(6): 489-96, 2001.
64. Lichtenberger L. M.: Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*. 15(6): 463, 1999.
65. Kawano S. and Tsuji S.: Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol*. 15 Suppl(D1-6), 2000.
66. Fischer H., Becker J. C., Boknik P., Huber V., Luss H., Neumann J., Schmitz W., Domschke W., Stachura J., and Konturek J. W.: Expression of constitutive nitric oxide synthase in rat and human gastrointestinal tract. *Biochim Biophys Acta*. 1450(3): 414-22, 1999.
67. Perdue M. H.: Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol*. 277(1 Pt 1): G1-5, 1999.

68. Podolsky D. K.: Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol.* 277(3 Pt 1): G495-9, 1999.
69. Slomiany B. L., Piotrowski J., and Slomiany A.: Role of endothelin-1 and constitutive nitric oxide synthase in gastric mucosal resistance to indomethacin injury: effect of antiulcer agents. *Scand J Gastroenterol.* 34(5): 459-64, 1999.
70. Domotor A., Peidl Z., Vincze A., Hunyady B., Szolcsanyi J., Kereskay L., Szekeres G., and Mozsik G.: Immunohistochemical distribution of vanilloid receptor, calcitonin-gene related peptide and substance P in gastrointestinal mucosa of patients with different gastrointestinal disorders. *Inflammopharmacology.* 13(1-3): 161-77, 2005.
71. Horie S., Michael G. J., and Priestley J. V.: Co-localization of TRPV1-expressing nerve fibers with calcitonin-gene-related peptide and substance P in fundus of rat stomach. *Inflammopharmacology.* 13(1-3): 127-37, 2005.
72. Pohle T., Shahin M., Domschke W., and Konturek J. W.: Effect of basic fibroblast growth factor on gastric ulcer healing and its own mRNA expression. *Aliment Pharmacol Ther.* 13(11): 1543-51, 1999.
73. Birnbaum Y., Ye Y., Rosanio S., Tavaackoli S., Hu Z. Y., Schwarz E. R., and Uretsky B. F.: Prostaglandins mediate the cardioprotective effects of atorvastatin against ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 65(2): 345-55, 2005.
74. Halter F., Tarnawski A. S., Schmassmann A., and Peskar B. M.: Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut.* 49(3): 443-53, 2001.
75. Warner T. D. and Mitchell J. A.: Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J.* 18(7): 790-804, 2004.
76. Sasaki K., Murohara T., Ikeda H., Sugaya T., Shimada T., Shintani S., and Imaizumi T.: Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 109(5): 603-11, 2002.
77. Sadoshima J.: Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res.* 86(12): 1187-9, 2000.
78. Burnier M.: Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation.* 103(6): 904-12, 2001.
79. Xu Y., Kumar D., Dyck J. R., Ford W. R., Clanachan A. S., Lopaschuk G. D., and Jugdutt B. I.: AT(1) and AT(2) receptor expression and blockade after

acute ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282(4): H1206-15, 2002.

80. Silverstein R. L. and Ram C. V.: Angiotensin-receptor blockers: benefits beyond lowering blood pressure. *Cleve Clin J Med.* 72(9): 825-32, 2005.
81. Miyamoto A., Wada R., Inoue A., Ishiguro S., Liao J. K., and Nishio A.: Role of angiotensin II receptor subtypes in porcine basilar artery: functional, radioligand binding, and cell culture studies. *Life Sci.* 78(9): 943-9, 2006.
82. Murphy T. J., Alexander R. W., Griendling K. K., Runge M. S., and Bernstein K. E.: Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature.* 351(6323): 233-6, 1991.
83. Sasaki K., Yamano Y., Bardhan S., Iwai N., Murray J. J., Hasegawa M., Matsuda Y., and Inagami T.: Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature.* 351(6323): 230-3, 1991.
84. Kambayashi Y., Bardhan S., Takahashi K., Tsuzuki S., Inui H., Hamakubo T., and Inagami T.: Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 268(33): 24543-6, 1993.
85. Mukoyama M., Nakajima M., Horiuchi M., Sasamura H., Pratt R. E., and Dzau V. J.: Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 268(33): 24539-42, 1993.
86. Chaki S. and Inagami T.: Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 182(1): 388-94, 1992.
87. Swanson G. N., Hanesworth J. M., Sardinia M. F., Coleman J. K., Wright J. W., Hall K. L., Miller-Wing A. V., Stobb J. W., Cook V. I., Harding E. C., and et al.: Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept.* 40(3): 409-19, 1992.
88. de Gasparo M., Husain A., Alexander W., Catt K. J., Chiu A. T., Drew M., Goodfriend T., Harding J. W., Inagami T., and Timmermans P. B.: Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension.* 25(5): 924-7, 1995.
89. Suzuki Y., Ruiz-Ortega M., and Egido J.: Angiotensin II: a double-edged sword in inflammation. *J Nephrol.* 13 Suppl 3: S101-10, 2000.

90. Lodwick D., Kaiser M. A., Harris J., Cumin F., Vincent M., and Samani N. J.: Analysis of the role of angiotensinogen in spontaneous hypertension. *Hypertension*. 25(6): 1245-51, 1995.
91. Schramek H., Coroneos E., and Dunn M. J.: Interactions of the vasoconstrictor peptides, angiotensin II and endothelin-1, with vasodilatory prostaglandins. *Semin Nephrol*. 15(3): 195-204, 1995.
92. Otani A., Takagi H., Oh H., Suzuma K., Matsumura M., Ikeda E., and Honda Y.: Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41(5): 1192-9, 2000.
93. Guba M., Steinbauer M., Buchner M., Frolich D., Farkas S., Jauch K. W., and Anthuber M.: Differential effects of short-term ace- and AT1-receptor inhibition on postischemic injury and leukocyte adherence in vivo and in vitro. *Shock*. 13(3): 190-6, 2000.
94. Gomez R. A., Norling L. L., Wilfong N., Isakson P., Lynch K. R., Hock R., and Quesenberry P.: Leukocytes synthesize angiotensinogen. *Hypertension*. 21(4): 470-5, 1993.
95. Mattana J., Sankaran R. T., and Singhal P. C.: Repetitive mechanical strain suppresses macrophage uptake of immunoglobulin G complexes and enhances cyclic adenosine monophosphate synthesis. *Am J Pathol*. 147(2): 529-40, 1995.
96. Lapteva N., Nieda M., Ando Y., Ide K., Hatta-Ohashi Y., Dymshits G., Ishikawa Y., Juji T., and Tokunaga K.: Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun*. 285(4): 1059-65, 2001.
97. Okamura A., Rakugi H., Ohishi M., Yanagitani Y., Takiuchi S., Moriguchi K., Fennessy P. A., Higaki J., and Ogihara T.: Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens*. 17(4): 537-45, 1999.
98. Klickstein L. B., Kaempfer C. E., and Wintroub B. U.: The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. *J Biol Chem*. 257(24): 15042-6, 1982.
99. Weinstock J. V., Ehrinpreis M. N., Boros D. L., and Gee J. B.: Effect of SQ 14225, an inhibitor of angiotensin I-converting enzyme, on the granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs in mice. *J Clin Invest*. 67(4): 931-6, 1981.
100. Guijarro C. and Egido J.: Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int*. 59(2): 415-24, 2001.

101. Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., and Egido J.: Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int.* 57(6): 2285-98, 2000.
102. Wolf G., Wenzel U., Burns K. D., Harris R. C., Stahl R. A., and Thaiss F.: Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int.* 61(6): 1986-95, 2002.
103. Chen X. L., Tummala P. E., Olbrych M. T., Alexander R. W., and Medford R. M.: Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 83(9): 952-9, 1998.
104. Mezzano S. A., Ruiz-Ortega M., and Egido J.: Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension.* 38(3 Pt 2): 635-8, 2001.
105. Unger T.: Inhibiting angiotensin receptors in the brain: possible therapeutic implications. *Curr Med Res Opin.* 19(5): 449-51, 2003.
106. Nio Y., Matsubara H., Murasawa S., Kanasaki M., and Inada M.: Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest.* 95(1): 46-54, 1995.
107. Quilley C. P., Chiba S., Quilley J., and McGiff J. C.: Aspirin enhances the antihypertensive effect of captopril in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 10(3): 294-302, 1987.
108. Baldus S., Eiserich J. P., Mani A., Castro L., Figueroa M., Chumley P., Ma W., Tousson A., White C. R., Bullard D. C., Brennan M. L., Lusis A. J., Moore K. P., and Freeman B. A.: Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest.* 108(12): 1759-70, 2001.
109. Chen L. Y., Mehta P., and Mehta J. L.: Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation.* 93(9): 1740-6, 1996.
110. Chen C. W., Lee S. T., Wu W. T., Fu W. M., Ho F. M., and Lin W. W.: Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol.* 140(6): 1077-87, 2003.
111. Bories P. N. and Bories C.: Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem.* 41(6 Pt 1): 904-7, 1995.

112. Murakami K., Okajima K., Uchiba M., Harada N., Liu W., Okabe H., and Takatsuki K.: Role of granulocyte elastase in indomethacin-induced gastric mucosal lesion formation in rats. *J Lab Clin Med.* 130(3): 307-13, 1997.
113. Unger T.: Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. *J Hypertens Suppl.* 21(6): S3-7, 2003.
114. Kaschina E. and Unger T.: Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 12(2): 70-88, 2003.
115. Thai H., Wollmuth J., Goldman S., and Gaballa M.: Angiotensin subtype 1 rReceptor (AT1) blockade improves vasorelaxation in heart failure by up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase via activation of the AT2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 307(3): 1171-8, 2003.
116. Derin N., Agac A., Bayram Z., Asar M., and Izgut-Uysal V. N.: Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochem Funct.* 24(5): 437-42, 2006.
117. Liu K. X., Wu W. K., He W., and Liu C. L.: Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide. *World J Gastroenterol.* 13(2): 299-305, 2007.
118. Fischer S., Maclean A. A., Liu M., Kalirai B., and Keshavjee S.: Inhibition of angiotensin-converting enzyme by captopril: a novel approach to reduce ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 120(3): 573-80, 2000.
119. Constantinescu C. S., Goodman D. B., and Ventura E. S.: Captopril and lisinopril suppress production of interleukin-12 by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Lett.* 62(1): 25-31, 1998.
120. Bregonzio C., Armando I., Ando H., Jezova M., Baiardi G., and Saavedra J. M.: Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285(2): G414-23, 2003.
121. Brzozowski T., Konturek P. C., Konturek S. J., Sliwowski Z., Drozdowicz D., Stachura J., Pajdo R., and Hahn E. G.: Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. *Eur J Pharmacol.* 385(1): 47-61, 1999.
122. Brzozowski T., Konturek P. C., Konturek S. J., Drozdowicz D., Pajdo R., Pawlik M., Brzozowska I., and Hahn E. G.: Expression of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in adaptive cytoprotection induced by mild stress. *J Physiol Paris.* 94(2): 83-91, 2000.

123. Kishimoto Y., Wada K., Nakamoto K., Ashida K., Kamisaki Y., Kawasaki H., and Itoh T.: Quantitative analysis of cyclooxygenase-2 gene expression on acute gastric injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sci.* 60(8): PL127-33, 1997.
124. Kishimoto Y., Wada K., Nakamoto K., Kawasaki H., and Hasegawa J.: Levels of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA expression at various stages of acute gastric injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Arch Biochem Biophys.* 352(1): 153-7, 1998.
125. Hiratsuka T., Futagami S., Tatsuguchi A., Suzuki K., Shinji Y., Kusunoki M., Shinoki K., Nishigaki H., Fujimori S., Wada K., Miyake K., Gudis K., Tsukui T., and Sakamoto C.: COX-1 and COX-2 conversely promote and suppress ischemia-reperfusion gastric injury in mice. *Scand J Gastroenterol.* 40(8): 903-13, 2005.
126. Zhang M. Z., Yao B., Cheng H. F., Wang S. W., Inagami T., and Harris R. C.: Renal cortical cyclooxygenase 2 expression is differentially regulated by angiotensin II AT(1) and AT(2) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(43): 16045-50, 2006.
127. Kim M. P., Zhou M., and Wahl L. M.: Angiotensin II increases human monocyte matrix metalloproteinase-1 through the AT2 receptor and prostaglandin E2: implications for atherosclerotic plaque rupture. *J Leukoc Biol.* 78(1): 195-201, 2005.
128. Nilakantan V., Hilton G., Maenpaa C., Van Why S. K., Pieper G. M., Johnson C. P., and Shames B. D.: Favorable balance of anti-oxidant/pro-oxidant systems and ablated oxidative stress in Brown Norway rats in renal ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 2007. (Basım aşamasında)
129. Gurel A., Armutcu F., Sahin S., Sogut S., Ozyurt H., Gulec M., Kutlu N. O., and Akyol O.: Protective role of alpha-tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clin Chim Acta.* 339(1-2): 33-41, 2004.
130. Jugdutt B. I.: Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev.* 7(4): 391-405, 2002.
131. Johnston C. I., Mendelsohn F. A., Cubela R. B., Jackson B., Kohzuki M., and Fabris B.: Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) in plasma and tissues: studies ex vivo after administration of ACE inhibitors. *J Hypertens Suppl.* 6(3): S17-22, 1988.
132. Landmesser U. and Drexler H.: Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonism on endothelial function: role of bradykinin and nitric oxide. *J Hypertens Suppl.* 24(1): S39-43, 2006.

133. Gonzalez Bosc L., Kurnjek M. L., Muller A., and Basso N.: Effect of chronic angiotensin II inhibition on the cardiovascular system of the normal rat. *Am J Hypertens.* 13(12): 1301-7, 2000.
134. Linz W., Jessen T., Becker R. H., Scholkens B. A., and Wiemer G.: Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation.* 96(9): 3164-72, 1997.
135. Barsotti A., Di Napoli P., Taccardi A. A., Spina R., Stuppia L., Palka G., Barbacane R. C., De Caterina R., and Conti P.: MK-954 (losartan potassium) exerts endothelial protective effects against reperfusion injury: evidence of an e-NOS mRNA overexpression after global ischemia. *Atherosclerosis.* 155(1): 53-9, 2001.

ÖZGEÇMİŞ

01. 01. 1981 yılında Ankara’da dünyaya gelen Burcu GEMİCİ, ilk ve orta öğrenimini Balıkesir’de tamamladıktan sonra 1999 yılında Antalya Lisesi’nden mezun oldu. Aynı yıl Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek öğrenimine başladı. 2003 yılında lisans diplomasını aldı. 2004-Eylül döneminde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizioloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen burada araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.