

48103

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Selma YILMAZER

**GASTRİK ASİD SEKRESYONU İNHİBİSYONUNUN GASTRİN VE
SOMATOSTATİN HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
NONRADYOAKTİF İN SİTU HİBRİDİZASYON VE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

M.Sc. Sema BOLKENT

48103

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İstanbul-1996

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mide	5
2.2. Gastrin (G) hücreleri.....	7
2.3. Somatostatin (D) hücreleri.....	8
2.4. Omeprazol.....	10
2.5. İmmunohistokimya.....	13
2.6. Protein A gold	14
2.7. İn situ hibridizasyon.....	14
3.MATERYAL VE METOT	17
3.1. Doku işlemi.....	18
3.2. İn situ hibridizasyon	18
3.3. İmmunohistokimya.....	19
3.4. Elektron mikroskopik inceleme.....	20
3.5. İstatistiksel inceleme.....	21
3.6. Radioimmunoassay ile inceleme.....	21
4.BULGULAR	22
4.1. Serum gastrin sonuçları.....	22
4.2. İmmunohistokimya bulguları.....	23
4.2.1. Kontrol grubu gastrin hücreleri.....	23
4.2.2. Dört gün süreyle 20mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri.....	23
4.2.3. Dört gün süreyle 100mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri.....	23
4.2.4. İki ay süreyle 20mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri.....	25
4.2.5. İki ay süreyle 100mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri.....	25
4.2.6. Kontrol grubu somatostatin hücreleri.....	26
4.2.7. Dört gün süreyle 20mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri.....	26
4.2.8. Dört gün süreyle 100mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri.....	26
4.2.9. İki ay süreyle 20mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri.....	28
4.2.10 İki ay süreyle 100mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri.....	28
4.3. İn situ hibridizasyon bulguları.....	28
4.3.1. Gastrin hücreleri.....	28
4.3.2. Somatostatin hücreleri.....	29
4.4. Elektron mikroskopik bulgular.....	30
4.4.1. Gastrin hücreleri.....	30
4.4.2. Somatostatin hücreleri.....	32

	SAYFA
5.TARTIŞMA.....	.59
6.ÖZET.....	.66
7.SUMMARY.....	.68
8.KAYNAKLAR.....	.70
ÖZGEÇMİŞ	
TEŞEKKÜR	



Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 562/060593

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gastrin ve somatostatin gastrointestinal kanalda önemli rolleri olan iki güçlü regülatör peptiddir. Gastrin, mide asid salgılanmasını arttıran hormonal bir düzenleyici (145) ve asid üreten mide mukozasının DNA, RNA ve protein sentezini artıran bir uyarandır (128). Antral gastrin salınması; vagotomi, antral şişme, protein, amino asidler ve bombesin enjeksiyonu ile uyanılırken, gastrin salınmasının baskılanması ise antral asidleşme ile gerçekleşmektedir (31,124,144). Ultrastrüktürel ve immünohistokimyasal çalışmalar, gastrin (G) hücrelerinin sitolojik özelliklerini belirgin olarak açığa çıkarmıştır (43,47,56,76,96,100,139). Gastrik asid sekresyonu; nöral (asetil kolin), hormonal (gastrin) ve parakrin (histamin,somatostatin) mekanizmaların karmaşık etkileşimiyle düzenlenir (121,123,124). Mide lümenindeki asid ortamın gastrin salgılanmasını inhibe ederken, somatostatin üzerinde uyarıcı bir etki gösterdiği bildirilmiştir (120,126,149).

Somatostatin, Brazeau ve arkadaşları (18) tarafından 1973'de koyun hipotalamusundan izole edilen bir tetradekapeptiddir. Bu peptidin mide asid sekresyonu yanısıra birçok hormonun sekresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (6,22,26,70,77,106,127,146). Somatostatin immünreaktivitesi mide mukozasında somatostatin (D) hücrelerinde çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Ayrıca bu polipeptid gastrointestinal kanalın kas tabakasındaki nöral dokuda da mevcuttur (2,65,66,79,99,110,125,131). Mide asidinin, pilor D hücrelerinden salınan somatostatin aracılığıyla, gastrin salınmasını inhibe ettiği hipotezi ortaya konmuştur (17,25,53,91,99,123). Fakat somatostatinin gastrin gen ekspresyonunu inhibe edip etmediği kesin olarak bilinmemektedir(17,150).

Benzimidazol türevi olan omeprazol mide asid sekresyonunda güçlü bir inhibitördür(23,57,71,75,93).Benzimidazol türevlerinin alınımının çeşitli deney hayvanları ve insanlarda mide endokrin sisteminde meydana gelen değişiklik ile aklorhidri (achlorhydria) oluşturduğu bildirilmiştir (10,17,64,111).

Omeprazolün mide parietal hücrelerine ait olduğu bilinen bir proton pompası olan, H^+,K^+ -ATPaz inhibisyonu yolu ile etki ettiği gösterilmiştir (39,57,75,93,118,136). Asid sekresyonunun hem akut hem de kronik inhibisyonunun mide mukoza morfolojisi üzerine, özellikle parietal hücelere etkisi iyi bilinmektedir. H^+,K^+ -ATPazın parietal hücrelerin membranı üzerinde proton pompasını oluşturduğu ve protonların transportunu katalizlediği bildirilmektedir (15,39,46,118,141,142). Omeprazolün sağlıklı kişilerde, ülserli hastalarda ve çeşitli deney hayvanlarında bazal ve uyarılmış mide asid sekresyonunu inhibe ettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (23,34,35,71,93). Ayrıca in vitro çalışmalarda omeprazol ve diğer benzer kimyasal maddelerin, farklı memeli türlerinden izole edilen mukoza örneklerinde mide asid üretimini inhibe ettiğini göstermiştir (37,39,57). Çeşitli canlılardaki incelemeler, omeprazol ile mide asid sekresyonunun uzun süreli blokajının, hypergastrinemi (10,27,51,67,94) oluşturduğunu ve korpus mukozasında enterokromaffin-like hücrelerin (ECL) hiperplazisini göstermiştir (10,24,51,74,116,132,137). Hayvanların tüm yaşamları süresince çok yüksek doz kullanılarak yapılan toksikolojik incelemelerde, ECL hücre çoğalmalarının sonunda karsinoid tümörleri geliştirdiği bulunmuştur (13,51,54,72).

Pilor somatostatin hücreleri, mide asid sekresyonunun veya komşu gastrin hücrelerinin fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynuyorsa, D hücrelerinin sayısı ve fonksiyonunun mide asid sekresyonuna veya komşu G hücrelerine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (27,67,90,94). G/D hücre oranının gastrik asid sekresyonuna bağlı olduğu yani hipoklorhidri (vagotomi) ve aklorhidri (pernicious anaemia) li hastalarda bu oran artarken, hiperklorhidri (gastrinoma) li hastalarda azaldığı bildirilmiştir (8). Gastrik ülser, duodenal ülser, Zollinger-Ellison sendromu, reflü özofajit ve gastro-özofajial reflü'ya sahip hastaların tedavisinde kullanılan omeprazol gibi proton pompa inhibitörleri histamin H_2 -reseptör antagonistlerine göre büyük bir hamle yapmıştır (75).

H^+,K^+ -ATPaz inhibitörü olan omeprazol ile, asid sekresyonunun kronik blokajının hypergastrinemi oluşturduğu ve uzamış tedavinin G hücre hiperplazisine neden olduğu bildirilmektedir (1,10,94). Polak ve arkadaşları

(111), aklorhidrili insanlarda yüksek gastrin seviyesi ve artmış G hücre sayısı bildirmişlerdir. Bu immunohistokimya bulguları, aklorhidrinin G hücrelerinde gastrin gen ekspresyonunu stimüle ettiğini düşündürmektedir. Çeşitli araştırmacılar, asid inhibisyonu sırasında gastrin sentezi artarken, somatostatin sentezinde azalma saptadıklarını bildirmektedirler (1,9,10,27,94). Brand ve Stone (17), omeprazol alınmasıyla oluşan asid inhibisyonu esnasında gastrin sentezinin arttığını, buna zıt olarak somatostatin sentezinin azaldığını bildirmişlerdir. Bununla beraber antral gastrin hücre aktivitesinde artışın, azalmış somatostatin konsantrasyonu veya salınması ile ilgili olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (28,29,72).

Yüksek doz omeprazol ile meydana gelen tam aklorhidri etkisi gastrinin esas kaynağının çıkarıldığı antrektomize sıçanlarda çalışılmıştır. Sıçanlarda H^+,K^+ -ATPaz enzimini bloke eden yüksek doz omeprazol ile asid sekresyonunun 24 saatlik inhibisyonu sonucunda (23,141), pilor gastrin hücrelerinin sayısında artış, somatostatin hücrelerinin sıklığında azalma olduğu bildirilmiştir. Ayrıca mide asid sekresyonunun inhibisyonu, pilor gastrin hücrelerinden salınan plasma gastrin konsantrasyonunu yükseltmektedir (1,36,72,83,107). Harty ve arkadaşları (53), gastrin salınmasının somatostatin ile inhibisyonunun posttranslasyonel olaylar içerdiğinden bahsetmektedirler. Birkaç çalışma midede aklorhidrinin gastrin mRNA'sının fazla ekspresyonuna ve buna zıt olarak somatostatin mRNA'sında azalmaya yol açtığını dot blot ve Northern blot teknikleri ile göstermiştir (17,149,150). Wu ve arkadaşları (151), açlık esnasında moleküler problemler kullanarak gastrin ve somatostatin sentezinin zıt olarak düzenlendiğini bildirmişlerdir. Asid inhibisyonunun gastrin ve somatostatin üzerindeki etkilerini göstermek amacıyla yapılan çalışmalarda, mRNA değişimleri Northern blot tekniği ile saptanmış olup, bu değişimlerin dokuda gösterilmesini sağlayan in situ hibridizasyon yöntemi ile herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Hücrede transkripsiyon ve translasyon olayların açığa çıkarılabilmesi için in situ hibridizasyon yöntemi ile mRNA ve immunohistokimya ile peptid ürünlerinin gösterilmesi önemli katkılar sağlamaktadır. Ayrıca mide asid inhibisyonunun gastrin ve somatostatin

hücrelerindeki etkileri üzerinde çelişkili immunohistokimyasal bulgular mevcuttur (1,27,28,72).

- Bu çalışmada, digoxigenin işaretli oligonükleotid problrı kullanarak, nonradyoaktif in situ hibridizasyon ile gastrin ve somatostatin mRNA larını pilor parafin kesitlerinde göstermek üzere bu yöntemi geliştirmeyi,
- Yöntem başarılı olduğu takdirde, omeprazol ile oluşturulan asid sekresyonu inhibisyonuna cevaben sıçan pilor gastrin ve somatostatin mRNA larındaki değişimi inceleyerek, bu iki peptidin resiprokal olarak regüle edildiği hipotezinin geçerli olup olmadığını araştırmayı,
- Immunohistokimyasal olarak gastrin ve somatostatin polipeptidlerini işaretleyerek, aynı genin transkriptlerinin ve protein ürünlerinin dağılımını karşılaştırmalı olarak araştırmayı,
- Ayrıca bu hücreleri immunogold tekniği ile işaretleyerek elektron mikroskobu seviyesinde incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

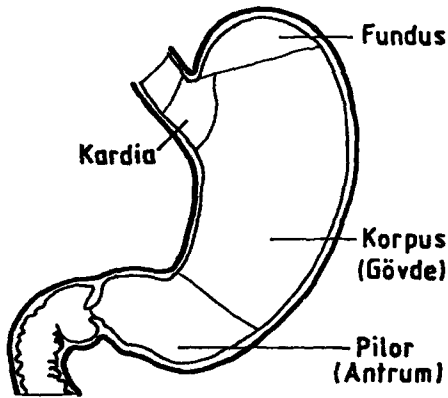
2.1. MİDE

Mide yiyecekleri sindiren ve hormon salgılayan hem ekzokrin hem de endokrin bir organ olup, sindirim kanalının subdiyafragmatik kısmının kese tarzında genişlemiş bir bölümüdür. Sindirim sisteminin özofagus ile bağırsaklar arasında kalan bir bölümü olan mide, besinlerin sindirimi esnasında, yaklaşık iki saat süre ile mekanik ve kimyasal parçalanma olaylarının içinde geçtiği yerdir.

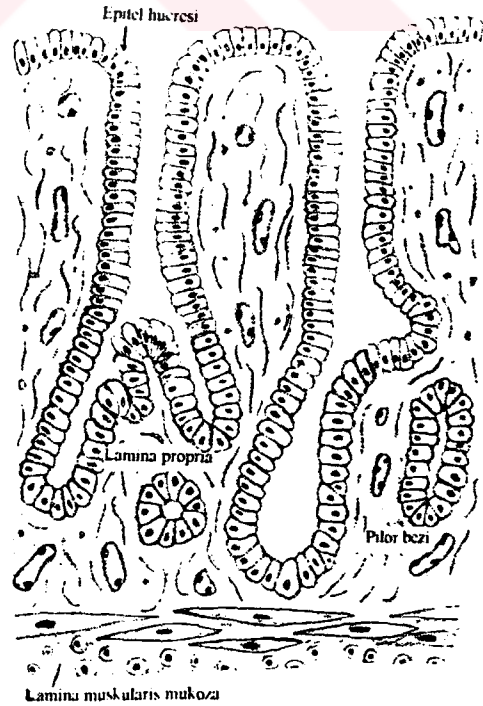
Fizyolojik olarak midenin iki ana işlevi vardır. 1) Besinlerin hazmında ve hematopoezde görevli maddeler salgılamak. 2) Yiyecek ve içecekleri depolamak, mekanik olarak parçalamak ve barsağa göndermek.

Midenin esas fonksiyonları; ağızda başlayan karbohidrat sindirimini devam ettirmek, sindirilmiş yiyeceklere asidik bir sıvı eklemek, bunları muskular aktiviteyle visköz bir kitle (kimus) haline dönüştürmek, pepsin enzimi ile protein sindirimini başlatmaktır. Alkol, bazı ilaçlar ve az miktarda suyun emilimi midede olur (58,62,103).

Midenin anatomik yapısı özofagustan itibaren; 1) Kardias, 2) Fundus, 3) Korpus (gövde), 4) Pilor (antrum) bölgeleri halinde gözlenir (Şekil:1).



Şekil 1: Midenin dört anatomik bölgesi, yan şekil pilor histolojik görünüm.



PILOR

Fundus ve korpus histolojik yapı olarak aynıdır. Kardias , mideye giriş bölgesi olup, mukoid kardias bezleri taşır. Fundus ve korpus esas sindirimle ilgili bezlerin bulunduğu ve HCl ile pepsinin salgılandığı mide kısmıdır. Mide ile barsağın birleştiği bölgeye pilor adı verilir. Pilor derin gastrik çukurlara sahiptir ve bunların içine dallanmış tubular bezler açılır. Bu bezler lizozim enzimi ve mukus salgılar. Mide mukoza alanının % 15-20'sinden ibaret pilor bölgesinde bu bezler kısa fakat kıvrıntılıdır. Başlıca hücresi mukus ve pepsinojen salgılayan boyun mukus hücresidir. Bunlar arasına serpilmiş endokrin fonksiyonlu gastrin sentezleyen G hücresi, somatostatin sentezleyen D hücresi, serotonin sentezleyen ve depolayan enterokromafin EC hücreleri de vardır (58,114).

Mide duvarında histolojik olarak içten dışa doğru dört tabaka vardır. I. Tunika mukoza. a-Lamina epitelyalis, b- Lamina propria, c- Lamina muskularis mukoza. II. Tunika submukoza. III. Tunika muskularis. IV. Tunika seroza.

I. Mide mukozası, değişik uzunluklarda lamina propria içine uzanarak çukurcuklar oluşturan bir yüzey epiteli ile örtülüdür. Mide epiteli tek katlı prizmatik, sekretuar bir epitelidir. Epitel hücrelerinin hepsi mukus salgılar, salgılanan mukus kalın bir tabaka oluşturarak hücreleri, mide tarafından salgılanan kuvvetli asidin etkisinden korur, ayrıca yüzeye kayganlık verir. Lamina propria, gevşek bağ dokusundan oluşmuştur, içinde düz kas hücreleri ve lenfoid hücreler bulunur. Lamina propria içinde mide bezleri gömülüdür. Mukoza altındaki submukozadan bir düz kas tabakası olan muskularis mukoza ile ayrılır.

II. Tunika submukoza gevşek bağ dokusu, kan ve lenf damarlarından oluşmuştur. Lenfoid hücreler, makrofajlar ve mast hücreleri içerir.

III. Tunika muskularis 3 yönde düzenlenmiş düz kas liflerinden oluşmuştur. Dış tabaka longitudinal, orta tabaka sirküler, iç tabaka obliktir. Pilorda orta tabaka çok kalındır ve pilorik sfinkteri oluşturur.

IV. Tunika seroza incedir ve mezotelyum ile örtülüdür.

Mide sempatik ve parasempatik sinirler alır. Parasempatik sinir nervus vagustur. Sempatik sinirler plexus coeliacus'dan gelirler. Nervus vagusun

mideye etkisi plexus myentericus ve plexus submukosus yoluyla olur (62,85,103).

2.2. GASTRİN (G) HÜCRELERİ

Gastrin çeşitli moleküler oluşumlar şeklinde dolaşımında ve dokularda mevcuttur. Hem mide pilor mukozasında hem de gastrinoma tümör dokusunda 17 amino asidlik peptid (G17) olan heptadekapeptiddir. Memeli dokularında bu peptid ya sülfatlanmış (Gastrin II) ya da sülfatlanmamış (Gastrin I) şekilde olabilir. Gastrinin sülfatlanmış şekli heptadekapeptidin (G17) 11. amino asidinin tirozil kısmının esterleşmesiyle gerçekleşir. Pilorda gastrinin % 90-95'i G17'dir (97,145).

Gastrin, midenin pilor bölgesinde yaygın olmak üzere mukozada tek tek dağılmış gastrin (G) hücrelerinin sitoplazmasında salgı granüllerinde bulunur. Gastrin hücreleri çoğunlukla pilorik bezlerin orta veya dip kısımlarına yerleşmişlerdir. Gastrin hücreleri mikrovillusları ile apikal bez lümenine sıklıkla ulaşırlar yani açık tip hücrelerdir. Gastrin hücrelerinin elektron mikroskopda salgı granülleri yuvarlak, 180-300nm çaplı, granül içeriği değişen elektron yoğunlukta olup, belirgin bir membranla çevrilidirler. Gastrin hücrelerinin farklı elektron yoğunlukta granüller içerdikleri bildirilmektedir. Bunlar yoğun, açık ve boş granüller şeklinde tanımlanmaktadır. Gastrin hücrelerinden gastrinin salınma şekli olarak tubular füzyon, ekzokrin salınım ileri sürülmektedir. Gastrin hücreleri tarafından yapılan gastrinin büyük bir kısmı kana verilir, bir kısmı da mide lümenine salgılanır. Sistemik dolaşım ile parietal hücreye gelen gastrin HCl salgılanmasını artırır (7,19,43,46,100,108,124,139).

Gastrin salınmasında esas fizyolojik uyarı olarak beslenme düşünülür. Protein sindirim ürünleri olan amino asitler ve peptidler ile uyarıcı etki oluşur. Dolaşıma gastrinin salınması; antral şişme, vagal veya kolinerjik uyarı ve β adrenerjik uyarı ile olur. Gastrin salgısını inhibe eden en önemli etken mide asiditesidir, pH 1'e düşüncü gastrin yapımı %100 inhibe olur. Ayrıca duodenumda yağların mevcudiyeti gastrini inhibe eden hormonların salgılanmasına neden olur. Somatostatin hormonunun da gastrin salınmasının inhibisyonunda rolü olduğu bildirilmektedir. Somatostatin ile gastrin

salınmasının inhibisyonunda lokal olarak salınmış somatostatinin parakrin etkisinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Genellikle somatostatin içeren hücreler gastrin hücreleri ile yakın ilişkide olup sıklıkla somatostatin hücrelerinden gastrin hücrelere uzanan sitoplazmik uzantılar gösterilmiştir. Somatostatinin parietal hücreler üzerine direkt etki ederek, mide asid sekresyonunu inhibe ettiği ve pilordan gastrin salınmasını baskıladığı belirtilmektedir (31,48,68,103,128).

Gastrinin esas fonksiyonu parietal hücrelerden HCl sekresyonunu uyarmasıdır. Besinler iyice karışıp, kimus halinde pilor bölgesine dolunca bunların baskısı ve içlerindeki maddelerin uyarıcı etkisiyle pilor bölgesindeki gastrin hücrelerinden gastrin hormonu salgılanır. Gastrin hormonu kana karışır ve kan yoluyla midenin salgı bezlerine ulaşarak mide enzimlerinin bol miktarda salgılanmasını sağlar. Gastrin mide, ince bağırsak, kolon ve pankreas için trofik bir maddedir. Gastrinin diğer biyolojik etkileri; mide, pankreas, karaciğer, duodenumda su ve elektrolit sekresyonunun uyarılması, mide, ince bağırsak ve pankreasda kan akımının uyarılması, keza insülin ve kalsitonin salınmasının da uyarılmasıdır. Alt özofajial sfinkter, mide, ince bağırsak, kolon ve safra kesesinde düz kas kontraksiyonunu uyarır. İnce bağırsakda glukoz, elektrolit ve su absorpsiyonu gastrin tarafından inhibe edildiği gibi pilorik sfinkterin düz kasının kasılması da gastrin ile inhibe edilir (20,97,128).

2.3. SOMATOSTATİN (D) HÜCRELERİ

Somatostatin Brazeu ve arkadaşları (18) tarafından 1973'de koyun hipotalamusundan izole edilen bir tetradekapeptiddir. Prosomatostatinin posttransyonel ayrılmasından türevlenen, biyolojik olarak aktif olan; somatostatin-14(SS-14) ve somatostatin-28 (SS-28) peptidleridir. Somatostatin hem endokrin (D) hücrelerinde hem de nöral yapılarda bulunur. Ayrıca sıçan ve insanların mide, pankreas ve bağırsak kas tabakalarında SS-14 baskındır. SS-28 hipotalamik kortiko releasing faktör, hipofiz büyüme hormonu ve tiroid uyarıcı hormon sekresyonunun, insülin sekresyonunun ve ekzokrin pankreas sekresyonunun inhibisyonu için SS-14'den nispeten daha seçici davranır, oysa SS-14'ün kortikal nöronlar, glukagon , mide asid inhibisyonu ve gastrointestinal

hareket ve dolaşım üzerine SS-28'den daha güçlü etki gösterdiği bildirilmiştir (18,41,49,65,79,113,127,146).

Sıçan ve tavşanda SS hücreleri mukozanın bazale yakın 1/3'lük kısmında daha yoğun olmak üzere daha üstlerde tek tek dağılmışlardır. Oysa kedi, köpek ve insan pilor mukozasında hücreler mukozanın alttan 1/3, üstten 2/3 arasındaki bölgede yerleşmişlerdir. D hücre granülleri 150-300 nm büyüklüğünde, yuvarlak, membranla çevrili ve orta derecede elektron yoğun, ince granüllü bir merkez içerir. Somatostatin granüllerinin ortalama çapı sıçanda 155-170 nm bulunmuştur. Her D hücresi bazalinde, bir veya daha fazla ince uzun uzantıya sahiptir, bunlar pilorda gastrin hücrelerine, korpusda parietal hücrelere veya esas hücrelere veya enterokromafin hücrelerine uzanırlar. Bu hücrelerde salgı granüllerinin yukarıdan aşağıya doğru taşındığı gösterilmiştir. Korpusda D hücreleri yuvarlak kapalı tip olarak gözükür. Oysa pilordaki bu hücreler, mikrovillusları ile lümenle ilişkidirler. D hücreleri komşu hücrelere yoğun membran interdigitasyonlarıyla karakterize edilir (2,22,68,77,82,84). D hücrelerinin gerçek endokrin etkiden ziyade lokal (parakrin) etki ettikleri bilinmektedir. Ayrıca paranöron etki şekli de öne sürülmüştür. Somatostatin hücresinin tokmak gibi şişkin uzun bazal uzantılarının pilorda gastrin hücreleri, korpus mukozasında parietal hücreler gibi efektör hücrelere uzandığının ışık mikroskopunda immunreaktif olarak gözlenmesi, bu kavramı daha da desteklemektedir. Parakrin etkinin yanısıra kan damarları içine endokrin salınma ve açık tip pilor D hücrelerinde apikal hücre uzantıları yoluyla ekzokrin salınma da öne sürülmektedir. Fakat elektron mikroskop seviyesinde henüz gösterilmemiştir. Midenin pilor ve korpus bölgelerinde asid sekresyonun düzenlenmesinde, somatostatinin parakrin rol oynadığı öne sürülmüştür (3,59,66,78,91). İn vitro incelemeler somatostatinin hem adenilat siklaz /siklik adenzin monofosfat (cAMP) hem de inositol fosfolipid / protein kinaz C ile parietal hücre fonksiyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (32,53,101).

İnsanda yiyecek alınımı kana SS sekresyonunu uyarır. Özellikle yağ ve protein SS salınımı için güçlü bir uyarandır. Oysa karbohidrat daha zayıf bir uyarıcıdır. Ayrıca insülin, hipoglisemi ile vagal uyarı dolaşımında somatostatini

yükseltir. Bombesin ve kolesistokinin gibi çeşitli gastrointestinal polipeptidler somatostatin sekresyonunu uyarırlar (89,99,125,138).

Somatostatinin gastrointestinal kanal üzerinde güçlü inhibitör etkisi vardır. Ekzokrin sekresyon olarak; gastrin, sekretin, kolesistokinin, vasoaktif intestinal peptid, glukagon, motilin, pankreatik polipeptid, insülin, gastrik inhibitör peptid sekresyonunu inhibe eder. Endokrin sekresyon olarak; gastrik asid ve pepsin, pankreatik bikarbonat ve enzimler, barsak sıvısı ve safra sekresyonunun inhibisyonunda rol oynar. Ayrıca mide boşalması, safra kesesi kontraksiyonu ve ince bağırsak geçişinin inhibisyonunda rolü vardır. Glukoz ve amino asidlerin absorpsiyonunun inhibisyonu, mezenterik ve çöliak kan akımının azalması, gastrointestinal mukozanın büyümesinin azalmasında rolü vardır (26,70,89,106,115).

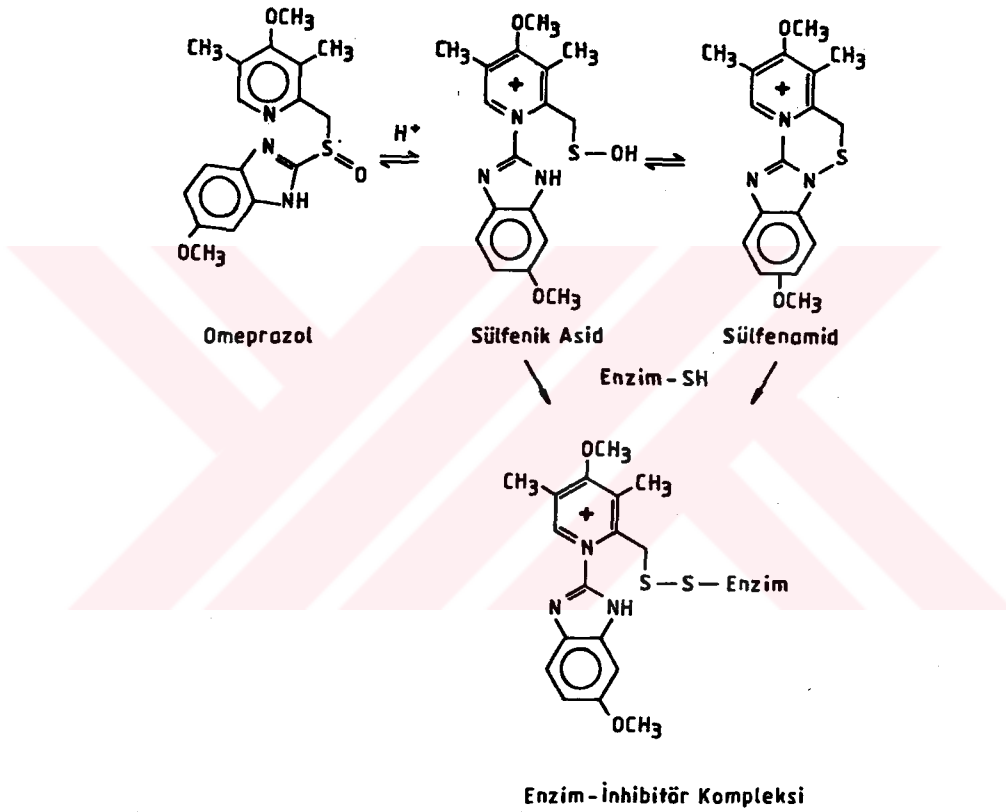
2.4. OMEPRAZOL

Bir benzimidazol türevi olan omeprazol gastrik asit sekresyonunda uzun etkili bir inhibitördür (23,39,71,73,93,142). Omeprazolün parietal hücrelere ait olduğu bilinen bir proton pompası olan hidrojen, potasyum-adenozin trifosfatazı (H^+,K^+ -ATPaz) inhibe ederek mide asid sekresyonunu güçlü bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir (39,42,140,142). Sıçanda 1033 amino asidden oluşan bu enzim ≈ 114 kd moleküler ağırlığa sahiptir. Parietal hücrenin apikal yüzeyindeki H^+,K^+ -ATPaz enzim sistemi, mide mukozasında asid (proton) pompası olarak kabul edilir (46,93,118). Omeprazol, asid üretiminin son adımını bloke ettiği için mide asid pompa inhibitörü olarak tanımlanabilir. Omeprazolün doza bağlı olarak ülserli hastalarda ve sağlıklı kişilerde hem bazal hem de uyarılmış asid sekresyonunu aynı şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (71,88,142).

H^+,K^+ -ATPaz bir elektronötral H^+ / K^+ değıştiricisidir. H^+,K^+ -ATPaz ve KCl transport yollarının kombinasyonu ile bir hidrojen ve bir klorid iyonu parietal hücreden ayrılırken K^+ iyonları parietal hücrede yeniden absorbe olurlar (92,118,129,142).

Omeprazolün sıçan, köpek ve insanda plazma yarı ömrü 40-60 dakikadır. Antisekretuvar etki, plazma yarı ömrü çok kısa olmasına rağmen

omeprazolün parietal H^+,K^+ -ATPaz enzimine bağlanmasından dolayı daha uzun sürer (39,71,93). Omeprazolün plazma seviyesi ve antisekretuar etkisi arasında bir ilişki yoktur (142). Omeprazol protonlaştığı parietal hücre asid kanalcıkları içine kandan hızlıca alınır. Bu şekilde kanalcıklarda konsantredir. Yüklü molekül iken parietal hücre sitosolüne yavaşça yayılır. Omeprazol asid ortamda sülfenamid türevi olan bir tetrasiklik bileşene dönüşür. Böylece H^+,K^+ -ATPaz luminal kısımda sülfidril grupları ile reaksiyona girerek inhibitör kompleks şeklini oluşturur (46,93,129,142). (Şekil:2).



Şekil 2: H^+,K^+ -ATPaz inhibisyonuna yol açan omeprazolün kimyasal reaksiyonları

Çok sayıda çalışma omeprazolün antisekretuar etki mekanizmasını açığa çıkarmıştır. Proton pompası için omeprazolün yüksek seçiciliği hem H^+,K^+ -ATPaz'ın lokalizasyonuna hem de bileşenlerin kimyasal özelliklerine bağlıdır. H^+,K^+ -ATPaz enziminin (proton pompasının) çok seçici inhibisyonunun 3 ana basamağı şöyledir: 1) Zayıf baz özelliğinden dolayı (pK 4) omeprazol düşük pH'da protonlaşabilir. 2) Protonlaşma, omeprazolün aktif

şekline dönüşmesine neden olur. Omeprazol düşük pH'da (pKa 3'ün altında) sadece aktiveşebilir. 3) Aktive olan omeprazol H⁺,K⁺-ATPaza bağlanır. Bu parietal hücrenin apikal membranında diğer iyonları etkilemeksizin enzim inhibisyonuna yol açar (73,140). Omeprazolün fizikokimyasal özelliklerinden dolayı (çok az suda çözünmesi ve asidde dayanıksızlığı) omeprazolün oral alınımının temel farmokinetik incelemeleri, omeprazolün solüsyonları olan polietilen glikol ve sodyum bikarbonatla başarılmaktadır (4,5,17,32, 71,117,150).

Sıçanlara uzun süreli yüksek doz omeprazol uygulanması sürekli asid sekresyonu inhibisyonu yaratır ki bunun iki yıl süre ile verilmesinin hipergastrinemi, ECL hücre hiperplazisi ve karsinoid oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (23,52,54,72,109). Oysa fare, hamster, kobay, tavşan ve köpeklerde omeprazole cevap olarak ECL hiperplazisi gelişmesine rağmen, karsinoid tümörlerin belirgin olarak gelişmediği açıklanmıştır (11). İnsanlarda omeprazole uzun süreli çalışmalar (2-6 yıl) önemsiz değişiklikler oluştuğunu ve karsinoid tümör oluşmadığını göstermiştir (10,93,133).

Omeprazol aktif gastrik ülser, duodenal ülser, reflü özofajit, Zollinger-Ellison sendromunda ve etki mekanizmasının farklılığı nedeni ile H₂ reseptör antagonistleriyle tedavi edilemeyen peptik ülser hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır (46,93).

Oral alınımından sonra omeprazolün antisekretuar etkisinin başlangıcı 1 saat içinde meydana gelir ve maksimum etki 2 saat içerisinde oluşur. Omeprazol alındıktan 2 saat sonra, mide asiditesini kontrol altına alarak semptomları hafifletir. Tedavinin tam tesiri 3-5 gün içinde görülür. 24 saat içinde sekresyon inhibisyonu maksimumun ≈ % 50'sidir ve 72 saate kadar inhibisyon süresi devam eder. Omeprazolün 24 saati aşan etki süresi H⁺,K⁺-ATPaz'a kovalent olarak bağlanmasındandır. Hayvan çalışmaları göstermiştir ki omeprazol plazmadan hızla kaybolduktan sonra mide mukozasında bir gün veya daha fazla bulunabilmektedir. İlaç bırakıldığı zaman sekretuar aktivite dereceli olarak geri döner, bu 3 ila 5 gündür (46,55,93,102,129).

Omeprazol absorpsiyonu takiben oksidatif reaksiyonlarla karaciğerde sitokrom P-450 sistemiyle tamamen metabolize olur ve % 80'i idrarla hızla

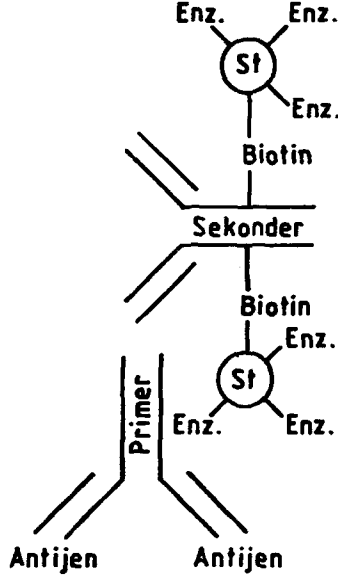
atılır. Eliminasyon yarı ömrü 0.5-1.5 saat kadardır. Esas plazma metabolitleri omeprazol sülfon ve hidroksoimeprazoldür. İdrardaki ana metabolitleri ise hidroksoimeprazol ve onun ürünü karboksilik asiddir. Omeprazolün ihmal edilir miktarları ve omeprazol sülfon böbreklerden atılırken, geri kalan \approx % 20'si dışkı ile atılmaktadır (5,93,95,112).

2.5. İMMÜNOHİSTOKİMYA

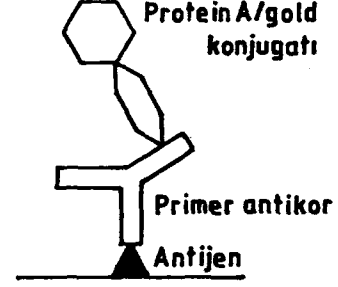
İmmünohistokimya; belli bir dokuda bulunan antijenlerin gösterilmesi için işaretlenmiş antikörlerin kullanılmasıdır. Belirli antijenler içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikörler içeren bir solüsyonda inkübe edildiği zaman, antikörler spesifik olarak antijenlere bağlanır. Böylece antijen-antikör komplekslerinin yerleşimleri ya ışık (immunohistokimya) ya da elektron mikroskopla (ultrastrüktürel immunositokimya) gözlemlenebilir.

İmmunohistokimyasal metodlar uygulamalarına göre ikiye ayrılır. 1) Direkt metotta; antijene karşı oluşturulan antikör işaretlenerek (bu bir enzim veya fluoresan bir madde veya radyoaktif madde veya bir metal olabilir), antijen-antikör kompleksi esasına göre sonuç alınır. 2) İndirekt metod; herhangi bir antijene karşı antikör çeşitli hayvanlarda üretilir. Örn; tavşan. Tavşan immunoglobulinleri, keçi ve koyun gibi bir başka hayvanda, bir antikör cevabının başlatılmasından sorumlu olup, böylelikle bir antiantikör oluşur. Antijeni içeren bir doku kesiti işaretlenmemiş tavşan antiantikörleri ile inkübe edilir. Yıkamadan sonra, işaretlenmiş tavşan antiantikörleri eklenir ve antijenin yeri işaretlemeye uygun olan mikroskopla görülebilir. Her bir antiantijen antikörü, işaretlenmiş antiantikörün bazı moleküllerini bağladığı için indirekt yöntem direkt yöntemden daha duyarlıdır. İndirekt immun işaretleme yöntemlerinden biri olan Streptavidin Biotin Peroksidaz tayin yöntemi şekil 3 de görülmektedir.

Streptavidin, *Streptomyces avidinii*'den izole edilen bir proteindir. Streptavidin molekülü (60 kD) herbiri bir biotin molekülüne bağlanabilen 4 subüniteye sahiptir. Biotin, çeşitli proteinlere ve nükleik asitlere bağlanabilen, suda çözünen bir vitamindir. Streptavidin-biotin sistemi, streptavidin ve biotin arasındaki kuvvetli bağlanma özelliğine ($K_d=10^{-15}$ M) dayanır. Bu yöntemde



Şekil 3 : Streptavidin Biotin Peroksidaz tayin yöntemi Primer⇒Primer antikor
Sekonder⇒Sekonder antikor
St⇒Streptavidin , Enz⇒Enzim



Şekil 4 : Elektron mikroskop için immunogold boyama tekniğinin şematik gösterilmesi

primer antikora bağlanan, biotin ile işaretlenmiş ikinci antikor kullanılır. Horse Radish Peroksidaz (HRP) işaretli streptavidin, biotinle işaretli ikinci antikora bağlanır. Kromojen/substrat solusyonu olarak AEC (3-amino-9-ethylcarbozole) kullanılır ve dokudaki antijen/antikor/enzim kompleksi etrafında yoğun kırmızı renk reaksiyonu oluşur (12,58).

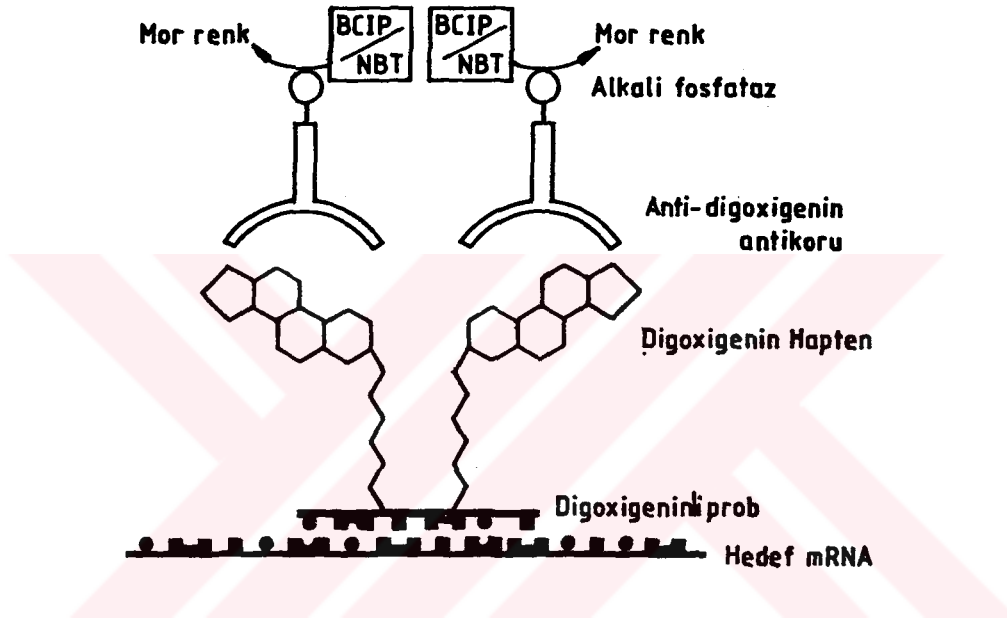
2.6. PROTEİN A GOLD

Staphylococcus aureus bakteri hücre duvarından elde edilen protein A çeşitli memeli türlerinde IgG molekülünün Fc kısmına bağlanır. Protein A uygun enzimler veya koloidal gold ile işaretlendiği zaman elektron mikroskopda antijenlerin gösterilmesinde kullanılır (12,58,153) (Şekil:4).

2.7. İN SİTU HİBRİDİZASYON

İn situ hibridizasyon teknikleri, morfolojik olarak korunmuş kromozomlarda, hücrelerde veya doku kesitlerinde spesifik nükleik asid dizilerinin tayinini sağlar. DNA veya RNA'nın spesifik dizilerinin belirlenmesine imkan veren nükleik asid hibridizasyon tekniği, bu nükleik asidlerin tek iplik segmentlerinin

daha önceden işaretlenmiş, bilinen tamamlayıcı nükleik asid serilerine spesifik olarak, bağlanabilme yeteneğine dayanır. Bu bilinen diziler laboratuvarında üretilip prob olarak adlandırılır ve radyoizotop veya biotin veya digoxigeninli nükleotidlerin eşleşmesiyle işaretlenir. İzotop işaretli prob otoradyografi ile, biotin işaretli prob ise avidine yüksek afinitesi ile, digoxigenin ise alkalın fosfataz ile belirlenebilir. Digoxigenin ile işaretli prob kullanarak uygulanan in situ hibridizasyon şekil 5 'de görülmektedir.



Şekil 5: Digoxigenin ile işaretli prob kullanarak in situ hibridizasyon

Nonizotopik in situ hibridizasyon, kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin immunolojik ya da afinite reaksiyonları ile fluoresan veya enzimatik olarak görüntülenmesi prensibine dayanır. Nonradyoaktif ISH metodları 2 tipe ayrılır. 1) Direkt metotta; saptanacak molekül (fluorescein) nükleik asid probuna direkt olarak bağlıdır. Hedef nükleik asidle hibridizasyondan sonra oluşan hibrid mikroskopda görülebilir. 2) İndirekt metotta; prob tayin edilecek molekülü kimyasal veya enzimatik olarak taşıyıcı ve bu immunositokimya yardımı ile tayin edilir. Saptanacak molekül antikorlara kolayca bağlanır. Böylece birçok haptent modifikasyonları tarif edilmiştir. Bunlardan ilk kullanılanı biotin-streptavidin sistemidir. İndirekt yöntemler daha hassastır. Çalışmamızda

digoxigenin sistemini kullandık. Digoxigenin sistemi digitalis bitkilerinden(Digitalis purpurea ve Digitalis lanata) izole edilen bir steroide dayanır. Digoxigenin nükleik asid proplarına enzimatik olarak bağlanır. Digoxigenin, deoksiuridin-trifosfata (dUTP) 11. atom ile bağlıdır. Hibride olmuş digoxigenin proplarının tayini, alkali fosfataz, peroksidaz, fluorescein veya rhodamin gibi bileşenlerin anti-digoxigenin antikorlarına yüksek afiniteleri aracılığı ile olur. Enzime bağlı antikorlar renk reaksiyonu için substrat kullanımı gerektirir. Renk substratı olarak BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfat) kullanılır ve NBT (Nitroblue tetrazolium) kromojeni ile hibridizasyon yerinde koyu mor reaksiyon ürünü oluşur (12,16,147).



3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 48 adet, 200-250 g ağırlığında, ergin, dişi Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar İ.Ü. DETAM'dan temin edildi. Tüm sıçanlar standart pelet yem ve çeşme suyu ile istedikleri kadar beslendiler ve 3 grup halinde düzenlendiler.

1.Grup : Kontrol grubu.

Deney gruplarına verilen omeprazolün çözündürme solüsyonu olan sodyum bikarbonatlı (10mM NaHCO₃) polietilen glikol 400 (PEG -400), her gün saat 10.00-11.00 arası , oral olarak verildi. Uzun ve kısa devre deney grupları gözönüne alınarak kontrol grubu 2 alt gruba ayrıldı.

1.1. Dört gün süre ile 1:1 oranında toplam 1 cc PEG-400 ve NaHCO₃ karışımının verildiği 8 hayvan.

1.2. İki ay süre ile yine 1:1 oranında toplam 1 cc PEG-400 ve NaHCO₃ karışımının verildiği diğer 8 hayvan.

2.Grup: 20 mg/kg/gün omeprazol uygulanan grup.

Hidrojen, potasyum adenozin trifosfat (H⁺,K⁺-ATPaz) inhibitörü olan omeprazol (Omeprazol ham maddesi Nobel İlaç Sanayii ve Ticaret A.Ş.) PEG-400'de çözündürüldü ve 10 mM/L sodyum bikarbonat tampon ile (1:1) dilue edilerek, intragastrik tüple, sabah saat 10.00-11.00 arası oral olarak verildi. Bu grup uygulama sürelerine bağlı olarak 2 alt gruba ayrıldı.

2.1. Dört gün süreyle omeprazol uygulanan 8 hayvan.

2.2. İki ay süreyle omeprazol uygulanan diğer 8 hayvan.

3.Grup: 100 mg/kg/gün omeprazol uygulanan grup.

İkinci gruptakine benzer şekilde omeprazol verilen denekler iki farklı süre için yine 2 alt gruba ayrıldı.

3.1. Dört gün süreyle omeprazol uygulanan 8 hayvan.

3.2. İki ay süreyle omeprazol uygulanan diğer 8 hayvan.

3.1. Doku işlemleri

Kontrol ve deney gruplarındaki tüm hayvanların haftalık ağırlık ölçümleri yapıldı. Deney süreleri sonunda bir gece aç bırakılan sıçanların sabah saat 10.00'da, eter anestezisi altında iken, midelerinin pilor bölgeleri alındı. Ayrıca, serumda gastrin ölçümü için hayvanlardan deney süreleri sonunda, kan örnekleri de alındı. Doku örnekleri fizyolojik suda yıkandıktan sonra, 6 saat % 4 paraformaldehitde fikse edilip, yükselen alkol serilerinden geçirilerek parafine gömüldü. İmmunohistokimya (IHK) ve nonradyoaktif in situ hibridizasyon (ISH) yöntemleri için parafin bloklardan kesilen 5µ'luk kesitler poli L-lisin ile kaplanmış lamlara alındı ve 37 C°de bir gece kurumaya bırakıldı.

3.2. İn situ hibridizasyon

Toluolde parafini giderilen kesitler, inen alkol serilerinden geçirilerek 0.1 M fosfat tuz tamponuna (PBS) alındı. Her aşamada dietilpirokarbonat (DEPC) ilave edilmiş Milli-Q su kullanıldı. Bu çalışmada in situ workstation British Biotechnology (BBT) katalog no BBS 2 ve in situ detection kit katalog no BBS 8 kullanıldı. PBS ile yıkanan kesitler 0.2 N HCl solusyonunda 10 dakika tutulduktan sonra yine PBS ile çalkalandılar. Daha sonra kesitler pepsin (% 0.02) ile 37 C°de 30 dakika muamele edildi. Kesitler taze hazırlanmış % 4'lük paraformaldehitde +4 C°de 20 dakika ikinci fiksasyona tabi tutuldular ve tekrar PBS ile çalkalandılar. Bundan sonra kesitler %0.25 asetik anhidrit, 0.1 M triethanolamin ve % 0.9 NaCl içeren solusyonda oda ısısında 10 dakika tutuldular. DEPC'li su ile çalkalanan kesitler, 20µl/mg levamisol eklenen hibridizasyon tamponunda 90 dakika bırakıldılar. Bu prehibridizasyon işlemlerinden sonra kesitler, digoxigenin işaretli sıçan somatostatin ve gastrin problemleri ile hibridizasyon tamponunda (0.6 M tuz, % 30 formamid ve 150 µg/ml salmon sperm DNA) bir gece 37 C°de hibridize edildiler. Somatostatin probu olarak 42 bazlık tek iplikli oligonukleotid (BBT katalog no BPR 34), gastrin probu olarak Fuller ve arkadaşlarının (44) belirttiği 23 bazlık yine digoxigenin işaretli oligonukleotid (BBT) kullanıldı. Somatostatin probun konsantrasyonu 400 ng/ml, gastrin probun ise 600 ng/ml idi. Hibridizasyondan sonra kesitler 1x sodyum tuz sitrat (SSC) 'da çalkalandılar. Takiben 1xSSC 'de 3 kez, 55

C°de, 30 dakika yıkandılar. Bundan sonra kesitler 1×modifiye Tris-tampon tuz (TBS) solusyonunda yani 50 mM Tris (pH=7.6), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, % 0.1 bovine serum albumin, % 0.1 triton solusyonunda 30 dakika oda ısısında yıkandılar. Daha sonra koyun anti-digoxigenin/alkalin fosfataz antiserumu (1:1000) 1×TBS'de dilue edildi ve kesitler bu solusyonda +4 C°de bir gece bırakıldı. Kesitler 3. gün 1×TBS'de 3 kez 30 dakika yıkandı. Daha sonra kesitler renk substratları 0.125 M Tris (pH=9.5), 1M NaCl, 0.5 MgCl₂, 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) ve nitro blue tetrazolium (NBT) kromojeninde 37°C de karanlıkta 2 saat inkübe edildiler. Anti-digoxigenin antikoruna bağlı alkalin fosfataz NBT/ BCIP ile digoxigenin işaretli prob, hibridizasyon yerinde koyu mor bir renk reaksiyonu verdi. Daha sonra kesitler PBS ile yıkanıp gliserin-PBS ile kapandılar.

3.3. İmmunohistokimya

Kesitler eğer çift boyama yani ISH'dan sonra immunohistokimya işlemine tabi tutulacaksa PBS 'den sonra absolu metanol ile hazırlanmış % 3'lük H₂O₂ solusyonunda 10 dakika oda ısısında bırakıldı. Eğer sadece IHK yapılacaksa parafini giderilip saf suya indirilen kesitler PBS ile yıkandıktan sonra absolu metanol ile hazırlanmış %3'lük H₂O₂ 'de 10 dakika bırakıldılar. Daha sonra kesitler 100 µl serum blocking solusyonunda (nonimmun serum) 10 dakika tutuldular. Her kesite 100 µl veya 2 damla primer antikor konarak, nemli ortamda +4 C°de bir gece bırakıldı. Kesitler tavşan gastrin antiserumu (Zymed katalog no 08-0062) veya tavşan somatostatin antiserumu (Zymed katalog no 08-0078) ile inkubasyonu takiben streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemine göre immün boyamaya devam edildi. IHK için Histostain-SP kit (Zymed katalog no 95-6143) kullanıldı. 2. gün kesitler PBS ile yıkandıktan sonra, 100 µl biotinli ikinci antikor ile 10 dakika inkübe edildiler. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kesitler, 100 µl enzim bileşeni yani streptavidin-peroksidaz ile 10 dakika inkübe edilip, PBS ile yıkandılar. Daha sonra kesitler substrat-kromojen karışımı ile 5-10 dakika inkübe edildiler. 3-amino-9-ethyl-carbozole (AEC) kromojeni ile antijenin lokalizasyonunu gösteren kırmızı renk reaksiyonu alındı. Daha sonra bazı preparatlara Hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Distile su ile çalkalanan kesitler gliserin-PBS ile kapatıldı.

Spesifik Kontroller:

1) Hibridizasyon tamponuna işaretli probun konulmaması ile, 2) hibridizasyondan önce kesitlerin RNaz muamelesi ile negatif sonuç alınarak digoxigenin işaretli proplar test edildi. Pozitif kontrol prob olarak ise poly dT oligonukleotid kullanıldığında dokudaki tüm mRNA 'lar tesbit edildi.

Özel antikor kontrolü olarak 1) Primer antikor basamağı atlandı. 2) Non-immun serumla kesitler boyandı. 3) Mide için uygun olmayan bir antikor kullanıldı. Bütün bunlar kesitlerde negatif sonuç verdi. Pozitif kontrol doku olarak duodenum ve pankreas kullanıldığında antijenin olduğu bilinen hücreler pozitif boyanma gösterdi.

3.4. Elektron mikroskopik inceleme

Pilor bölgesine ait 1 mm³'lük doku örnekleri Milloning tamponu ile hazırlanmış %4'lük glutaraldehit ile fikse edilip araldit gömme ortamına alındı. Bloklardan alınan yarı ince kesitlerin doymuş sodyum hidroksit ile rezini giderilip, IHK işlemi uygulandı. Pozitif hücrelerin olduğu tespit edilen kısımdan immunogold işlemi için nikel gridlere ince kesitler alındı ve protein A gold tekniği uygulandı. Bu kesitler önce % 10 H₂O₂'de 10 dakika tutuldular ve distile su ile yıkanan kesitler %1 ovalbuminde 30 dakika bırakıldılar. Daha sonra primer antikor ile +4 C°'de bir gece inkübe edildiler. Somatostatin ve gastrin antikorları (1/100-1/1000) olarak kullanıldılar. 2. gün, 4 kez, 5 dakika PBS ile yıkanan kesitler 1/15 dilüsyonda 15 nm'lik koloidal gold (49-1004 Zymed) ile 1 saat oda sıcaklığında tutuldu. Yine 4 kez, 5 dakika PBS ile yıkanan kesitler, deiyonize su ile yıkandıktan sonra zıt boyama olarak metanolla hazırlanmış %5'lik uranil asetat ile 1.5-2 dakika boyandı ve % 50'lik metanolde 1 dakika yıkanan kesitler, distile sudan geçirilip Reynold'un kurşun sitratı ile 45 saniye boyanıp, püskürtme distile su ile yıkanıp, incelemeye hazırlandı.

3.5. İstatistiksel inceleme

Serum gastrin sonuçları için student t-testi kullanıldı.

Somatostatin ve gastrin hücrelerinin sayımları için immünohistokimya uygulanan her bir sıçana ait tek bir kesitten rastgele 5 görüş alanı sayıldı. Morfometrik ölçümler için Carl Zeiss Jena ışık mikroskobu kullanıldı. Oküler büyütmesi $\times 10$, objektif büyütmesi $\times 40$ ve oküler alanı $\approx 0.1 \text{ mm}^2$, çapı 0.35 mm idi. Çift yönlü varyans analizi kullanılarak grup/zaman, grup *zaman ilişkileri araştırıldı. Ayrıntılı değerlendirme için de her zaman kesitinde grup değerleri (Kontrol, 20 mg/kg/gün, 100 mg/kg/gün) tek yönlü Anova ile kıyaslandı. Anlamalı durumlarda Post-Hoc kıyaslamalar Tukey testi ile yapıldı.

3.6. Radioimmunoassay ile inceleme

Radioimmunoassay (RIA) işlemleri için her bir sıçana ait serum örnekleri -20°C de saklandı. Çift antikor gastrin, serum gastrin ölçümü için ^{125}I radioimmunoassay işlemleri uygulandı. Gastrin-34, G-17 ve G-14 için geniş spektrumlu antikor ve çift antikor gastrin kiti Diagnostic Products Corporation (DPC) katalog no KGAD 1 kullanıldı. Kalibratörler kullanılarak örnek ve kontrol serumlarında gastrin ölçümü için işlemler şu sırayla yapıldı. 200 μl lik tüm serum örneklerine, 100 μl ^{125}I gastrin eklenerek tüpler kısaca çalkalandı. 100 μl gastrin antiserumu eklenerek tüpler karıştırıldı ve iki saat oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra tüplere 1 ml soğuk çöktürme solusyonu (polietilen glikolde sulandırılmış keçi anti-tavşan gama globulin) ilave edildi ve tüpler çalkalandı. Tüpler 15 dakika 3000xg de santrifüj edildi. Üst sıvı dökülerek kalan tortu gama sayıcısında her tüp için bir dakika süreyle sayıldı ve gastrin konsantrasyonları hesaplandı.

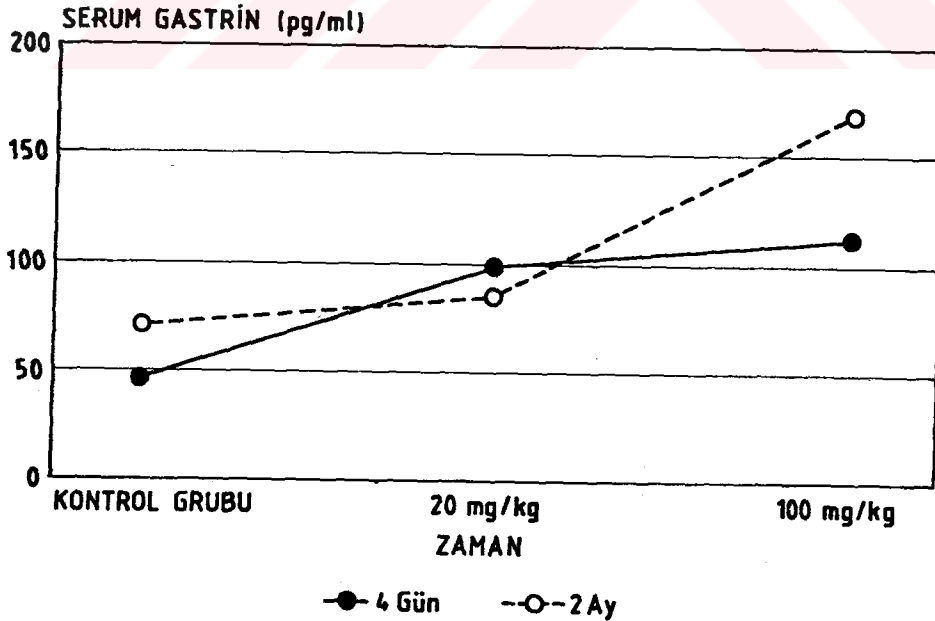
4.BULGULAR

4.1.Serum gastrin sonuçları:

Serum gastrin seviyeleri, radioimmunoassay (RIA) ile ölçüldüğünde omeprazol verilen sıçanlarda (Grup 2 ve Grup 3) kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (Grafik 1).

Dört gün süreli uygulamada serum gastrin seviyesi her iki dozda da kontrollere göre istatistiksel olarak artmıştı (Kontrol < 20mg/kg < 100mg/kg). Dört gün süre ile 20mg/kg omeprazol verilen grubun serum gastrin seviyesindeki artış kontrole kıyasla ileri düzeyde anlamlı idi ($p<0.001$). Dört gün süre ile 20 mg/kg ve 100mg/kg omeprazol uygulanan deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen grup ile 100 mg/kg omeprazol verilen grup arasında ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$) bir artış vardı (Kontrol<20mg/kg <100kg/kg). 20 mg/kg ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Oysa 100 mg/kg omeprazol verilen grup ile kontrol grubu arasında ileri düzeyde bir anlamlılık ($p<0.001$) vardı.



Grafik 1 : Kontrol ve omeprazol verilen gruplara ait serum gastrin seviyeleri

4.2. İmmunohistokimya bulguları

4.2.1. Kontrol grubu gastrin hücreleri

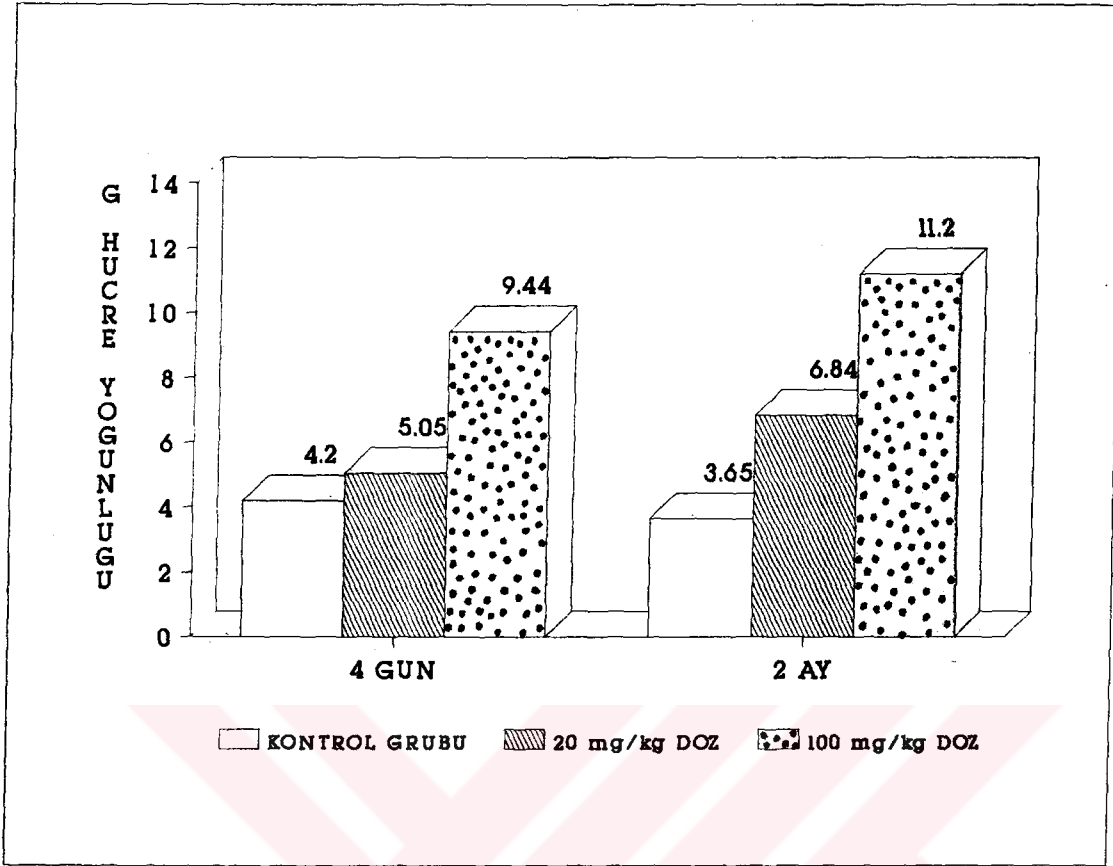
Kısa ve uzun süreli deney grupları göz önüne alınarak kontrol grubu iki alt grup halinde incelendi. Her iki kontrol grubuna ait pilor kesitleri gastrin antikorunu kullanılarak streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile boyanıp, ışık mikroskobu ile incelendiğinde gastrin hücreleri pilor bezlerinin dip kısımlarında dağınık olarak tek tek yerleşmişlerdi (Resim:1,2). Gastrin için immunreaktif hücreler büyük büyültmede incelendiğinde gastrin hormonunun hücrenin bazolateral bölgesinde yerleştiği gözlemlendi (Resim:3).

4.2.2. Dört gün süreyle 20 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri

Deney grubuna ait sıçanların pilor kesitleri, gastrin antikorunu kullanılarak, streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile boyandı ve bu kesitlere ışık mikroskobunda morfometrik ölçüm yapıldı. İstatistiksel sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında, daha fazla sayıda gastrin hücresi gözlemlendi. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Kontrol=20mg/kg), (Grafik:2), (Tablo:1). İmmun pozitif gastrin hücrelerinin pilor bezlerinin dip kısımlarında daha yoğun olmakla birlikte tüm mukozada dağınık olarak yerleştiği gözlemlendi (Resim:4). Bu grup preparatları kontroller ile karşılaştırıldığında hücrelerin sadece sayısında değil keza immun boyanma yoğunluğunda da belirgin bir artış vardı. Gastrin immunreaktivitesinin hücrelerin çoğunlukla bazolateral bazen hücrelerin hem bazolateral hem de supranuklear kısmında yer aldığı saptandı (Resim:5).

4.2.3. Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri

Bu deney grubuna ait sıçanların pilor kesitlerinin morfometrik ölçümleri yapıldığında yüksek doz omeprazol uygulaması ile pilor mukozasında her görüş alanı başına düşen ortalama immunreaktif gastrin hücre sayısında istatistiksel olarak ileri düzeyde bir anlamlılık saptandı ($p < 0.001$), (Grafik:2).



GRAFİK 2 : Kontrol ve omeprazol verilen sıçanlarda gastrin hücre sayısı

GASTRİN HÜCRELERİ	4 GÜN	2 AY
KONTROL	4.20 ± 1.67 *	3.65 ± 1.56
20 mg/kg	5.05 ± 1.50	6.84 ± 2.46
100 mg/kg	9.44 ± 2.95	11.20 ± 3.56

* Ortalama ± Standart sapma

TABLO 1 : Kontrol ve omeprazol verilen sıçanlarda gastrin hücre sayılarının morfolometrik değerleri

(Tablo:1). Pilor bölgesi kesitlerine gastrin antikoru kullanılarak yapılan immunohistakimya yöntemi sonuçları ışık mikroskobu ile incelendiğinde, gastrin hücreleri pilor bezlerinin dip kısımlarında daha yoğun olmakla birlikte tüm mukozada dağınık olarak gözlemlendi (Resim:6-8). Bu grupta da hücrelerin sadece sayısında değil keza immun boyanma yoğunluğunda da kontrole kıyasla belirgin bir artış gözlemlendi. Gastrin immunreaktivitesi hücrelerin çoğunlukla bazolateralinde, bazı hücrelerde ise nukleusun etrafında, tüm sitoplazmada yerleşmiş idi.

4.2.4. İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri

Bu gruba ait IHK sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her görüş alanı başına düşen ortalama immunreaktif gastrin hücre sayısında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlılık ($p<0.001$) saptandı (Grafik:2), (Tablo:1). İki ay 20 mg/kg omeprazol verilen sıçanların streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulanan pilor kesitleri, dört gün 20 mg/kg omeprazol verilen grup ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gastrin hücre sayısında artış vardı. Bu gruba ait preparatlar kontroller ile kıyaslandığında keza immun boyanma yoğunluğunda da belirgin bir artış gözlemlendi (Resim:9,10). Gastrin peptid içeriğinin genellikle bazolateral, bazen hem bazolateral hem de supranuklear kısımda yer aldığı saptandı.

4.2.5. İki ay süreyle 100 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu gastrin hücreleri

Bu gruba ait deney hayvanlarının pilor kesitlerine IHK yöntemi uygulanarak ışık mikroskobunda morfometrik ölçüm yapıldığında gastrin hücre sayısındaki artış en fazla bu grupta saptandı. Bu deney grubu, kontrol grubu ve iki ay süre ile 20mg/kg omeprazol uygulanan grupla karşılaştırıldığında gastrin hücre sayısı istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$) bulundu. Bu gruba ait sıçanların pilor gastrin hücrelerinde doza bağlı olarak artış gözlemlendi (Kontrol<20mg/kg <100mg/kg), (Grafik:2), (Tablo:1). Gastrin hücreleri pilor bezlerinin dip kısımlarında daha yoğun olmak üzere tüm mukozada

dağınık olarak gözlemlendi (Resim:11). Gastrin hücrelerinde peptid içeriğinin yerleşimi incelendiğinde, genellikle hücrelerin bazolateral bölgesinde yerleştiği, bazen de supranuklear kısımda yer aldığı saptandı (Resim:12).

4.2.6. Kontrol grubu somatostatin hücreleri

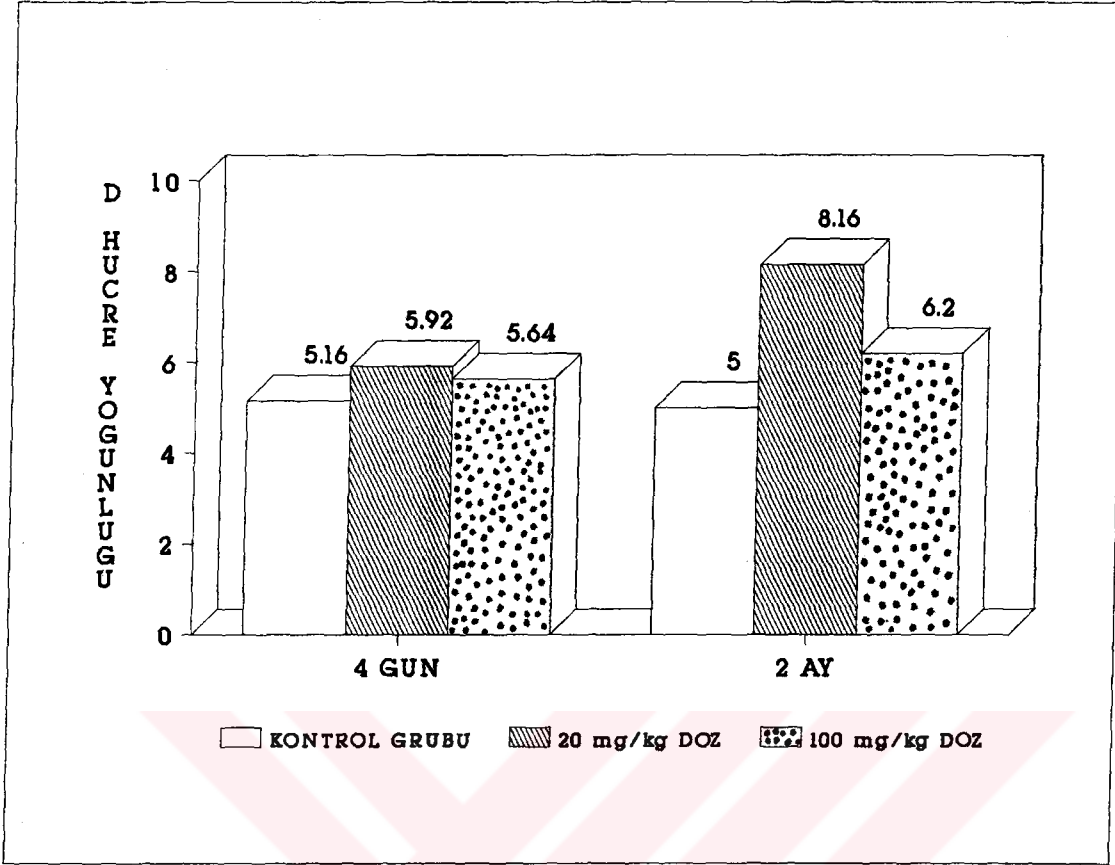
Kısa ve uzun süreli deney grupları göz önüne alınarak kontrol grubu iki alt grup halinde incelendi. Her iki kontrol grubuna ait pilor kesitleri somatostatin antikoru kullanılarak streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile boyanıp, ışık mikroskobu ile incelendiğinde somatostatin hücrelerine pilor bezlerinin 1/3'lük bazal kısmında daha fazla olmak üzere diğer kısımlarında da tek tek rastlandı (Resim:13). Somatostatin hücreleri büyük büyültmede incelendiğinde kuvvetli immunreaktif materyalin genellikle hücrenin bazolateral bölgesinde ve bazal uzantılarında yer aldığı gözlemlendi (Resim:14,15).

4.2.7. Dört gün süreyle 20 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri

Bu deney grubuna ait sıçanların streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile boyanmış pilor kesitleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde; somatostatin hücre sayısı kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmadı ($p>0.05$), (Grafik:3),(Tablo:2). İmmun pozitif somatostatin hücrelerinin tüm pilor mukozasındaki dağılımında ve immunreaktif materyalin hücre içi yerleşiminde kontrol grubuna göre bir farklılık gözlenmedi. İmmunreaktivite bazal uzantılarda da görüldü (Resim:16,17).

4.2.8. Dört gün süreyle 100 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri

Bu gruba ait deney hayvanlarının pilor kesitleri morfometrik olarak değerlendirildiğinde somatostatin hücre sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı bulunmadı ($p>0.05$), (Grafik:3), (Tablo:2). İmmunohistokimya yöntemi ile boyanan kesitlerde somatostatin hücrelerine pilor bezlerinin 1/3'lük bazal kısmında daha fazla olmak üzere üst



GRAFİK 3 : Kontrol ve omeprazol verilen sıçanlarda somatostatin hücre sayısı

SOMATOSTATİN HÜCRELERİ	4 GÜN	2 AY
KONTROL	5.16 ± 2.79 *	5.00 ± 2.32
20mg/kg	5.92 ± 2.59	8.16 ± 2.56
100mg/kg	5.64 ± 2.25	6.20 ± 2.66

* Ortalama ± Standart sapma

TABLO 2 : Kontrol ve omeprazol verilen sıçanlarda somatostatin hücre sayılarının morfolometrik değerleri

kısımlarda nadiren rastlandı (Resim:18). Peptid içeriğın genellikle bazolateral bölgede ve bazal uzantılarda mevcut olduğu saptandı. Ayrıca immunreaktivite şiddetinde de kontrollere göre değışim gözlenmedi (Resim:19).

4.2.9. İki ay süreyle 20 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri

Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile boyanmış pilor kesitleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde pilor mukozasında her görüş alanı başına düşen ortalama somatostatin hücre sayısında kontrol grubuna ve iki ay 100mg/kg omeprazol verilen gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p < 0.001$), (Grafik:3), (Tablo:2). Somatostatin (+) hücrelerin pilor mukozasındaki dağılımında diğeri gruplara göre bir farklılık gözlenmedi. (Resim:20). İntraselüler peptid içeriğın ise genellikle bazolateral bazen de supranuklear bölgede ve bazal uzantılarda mevcut olduğu gözlemlendi (Resim:21).

4.2.10 İki ay süreyle 100 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubu somatostatin hücreleri

Bu gruba ait sıçanların pilor mukozasında her görüş alanı başına düşen ortalama somatostatin hücre sayısı kontrollere göre istatistiksel olarak farklı bulunmadı ($p > 0.05$), (Grafik:3), (Tablo:2). İmmunohistokimya yöntemi uygulanan pilor kesitlerinde somatostatin hücreleri pilor bezlerinin dip kısımlarında daha yoğun olmak üzere tüm mukozada dağınık olarak gözlemlendi (Resim 22). Peptid içeriğın genellikle bazolateral bölgede olduğu saptandı (Resim:23).

4.3. İn situ hibridizasyon bulguları

4.3.1. Gastrin hücreleri

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçan pilor kesitlerine digoxigenin işaretli sıçan gastrin probu kullanılarak uygulanan nonradyoaktif in

situ hibridizasyon yöntemi ile hazırlanan preparatlarda gastrin mRNA sinyalleri gösterilebildi. Kontrol ve tüm deney grupları pilor kesitlerinde gastrin mRNA sinyali içeren hücrelerin genellikle pilor bezlerin üst kısımlarında yer aldıkları gözlemlendi (Resim: 24-28). Gastrin mRNA sinyallerinin genellikle nükleus çevresinde, tüm sitoplazmada (Resim: 24,25,29) bazen de hücrenin bazolateral kısmında yerleşmiş olduğu görüldü (Resim:28). Tüm deney gruplarına ait ISH yöntemi ile hazırlanmış pilor kesitleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla gastrin mRNA sinyali içeren hücrelerin sayıca değişiklik göstermedikleri gözlemlendi.

Önce in situ hibridizasyon sonra immunohistokimya uygulanan yani çift boyama yapılan pilor kesitlerinde gastrin peptidi içeren hücrelerin genellikle pilor bezlerinin dip kısımlarında yerleştiği, gastrin mRNA sinyali içeren hücrelerin ise genellikle pilor bezlerinin üst kısımlarında yerleştiği görüldü (Resim 30). Çift boyamada yer yer aynı gastrin hücresinde hem mRNA hem de peptid sinyali birlikte görüldü (Resim:31). Bazı hücrelerde ise sadece gastrin immunreaktivitesi saptanırken, diğer bazı gastrin hücrelerinde sadece gastrin mRNA sinyalleri gözlemlendi (Resim:32).

4.3.2. Somatostatin hücreleri

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçan pilor kesitlerine digoxigenin işaretli sıçan somatostatin probu kullanılarak uygulanan nonradyoaktif in situ hibridizasyon tekniği ile somatostatin mRNA sinyalleri gösterilebildi. Kontrol ve deney gruplarına ait in situ hibridizasyon yöntemi ile hazırlanmış preparatlar incelendiğinde somatostatin mRNA sinyallerinin genellikle pilor bezlerinin dip kısımlarında yer aldığı gözlemlendi (Resim:33-36). Somatostatin mRNA'larının hücrenin genellikle bazolateral bölgesinde yerleştiği görüldü (Resim:37). Omeprazol uygulanan tüm deney gruplarına ait pilor kesitlerinde gerek doku gerekse intrasellüler somatostatin mRNA dağılımında herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

Somatostatin mRNA ve peptid içeriğinin aynı kesit üzerinde görülebilmesi için digoxigenin işaretli somatostatin probu kullanarak önce ISH daha sonra IHK teknikleri uygulanarak yapılan çift boyama sonucu

somatostatin mRNA ve peptid ürünlerinin farklı hücrelerde bulunduğu saptandı. Somatostatin mRNA sinyali içeren hücreler, somatostatin pozitif peptid ürünü içeren hücelere kıyasla daha fazla idi.(Resim:38,39).

4.4. Elektron mikroskopik bulgular

4.4.1. Gastrin hücreleri

Kontrol grubuna ait immunogold yöntemi uygulanmış pilor ince kesitleri elektron mikroskopunda incelendiğinde gastrin hücreleri altın tanecikleri ile işaretlenmiş olarak tesbit edildi. İmmünreaktif gastrin hücreleri farklı elektron yoğunlukta çok sayıda salgı granülü içerir şekilde gözlemlendi. Salgı granülleri hücrenin bazal ve lateral sitoplazma bölgelerinde yerleşmişti. Apikal sitoplazmada ise salgı granülü yoktu. Salgı granülü içermeyen apikal sitoplazma bölgesi organelden zengin olup değişik şekillerde uzamış, oval mitokondriyonlar ve granüllü endoplazmik retikulum sistemaları içermekteydi. Salgı granülleri elektron yoğun, az elektron yoğun, boş ve köpüksü görünümlü olmak üzere dört farklı morfolojik görüntüde idi. Tüm salgı granüllerinin etrafında bir halo vardı. Genellikle elektron yoğun merkez içeren salgı granüllerinin daha çok sayıda altın partikülü ile işaretlenmiş olduğu görüldü. Boş ve köpüksü görünümlü salgı granüllerinin ise daha az veya hiç altın bağlamadığı gözlemlendi. Gastrin hücrelerinin nukleusları büyük ve oldukça düzgün konturlu idi. Bazı gastrin hücreleri bir kutupları ile bazal lamina diğer kutupların ile de bez lümenine ulaşmakta idi. Lümeneye erişen gastrin hücrelerinin apikal yüzeyleri az sayıda mikrovillus içermekteydi (Resim 40,41).

Dört gün süre ile 20mg/kg omeprazol verilen gruba ait gastrin hücrelerinin genellikle boş görüntüye sahip granüllerden zengin olduğu ve bu granüllerin tek tek altın partikülü içerdiği gözlemlendi. Az sayıda olan elektron yoğun salgı granüllerinin merkezi kısmına ise çok sayıda altın taneciği bağlandığı görüldü. Yer yer köpüğümsü manzarada merkezi kısım içeren granüllerinde yoğun granüllere göre daha zayıf immünreaktivite gösterdikleri

saptandı. İnterselüler aralıkların kontrole kıyasla genişlemiş olduğu görüldü (Resim 42,43).

Dört gün süre ile 100mg/kg omeprazol verilen gruba ait ince kesitlerde immunreaktif gastrin hücrelerinin elektron yoğun salgı granüllerinden oldukça zengin olduğu gözlemlendi. Nisbeten az sayıda köpüğümsü manzarada salgı granülleride mevcuttu. Bu gruba ait gastrin hücrelerinin nukleusları oldukça düzgün sınırlı periferik olarak yerleşmiş heterokromatin içerikli olarak gözlemlendi. (Resim 44,45). Bu grupta oldukça farklı morfolojiye sahip diğer bir hücre tipinde yer yer immunreaktif salgı granülleri görüldü. Bu granüller tipik gastrin hücrelerinden farklı olarak tek tip morfolojiye sahip olup, elektron yoğun bir merkez ve çevresini saran elektron geçirgen bir halodan oluşmaktaydı. Bu granüller oldukça çok sayıda altın partikülü bağlamakda olup granül miktarı tipik gastrin hücrelerine kıyasla çok az sayıda idi ve hücrenin bazal yüzeyine bakan kısımda yoğunlaşmıştı. Hücrenin apikal kutbunun lümene yakın fakat lümene açılmadığı gözlemlendi. Oldukça düzgün sınırlı periferik heterokromatin içeren nukleusa sahipti. Uzamış veya oval farklı şekillerde mitokondriyonlar içeriyordu (Resim 46).

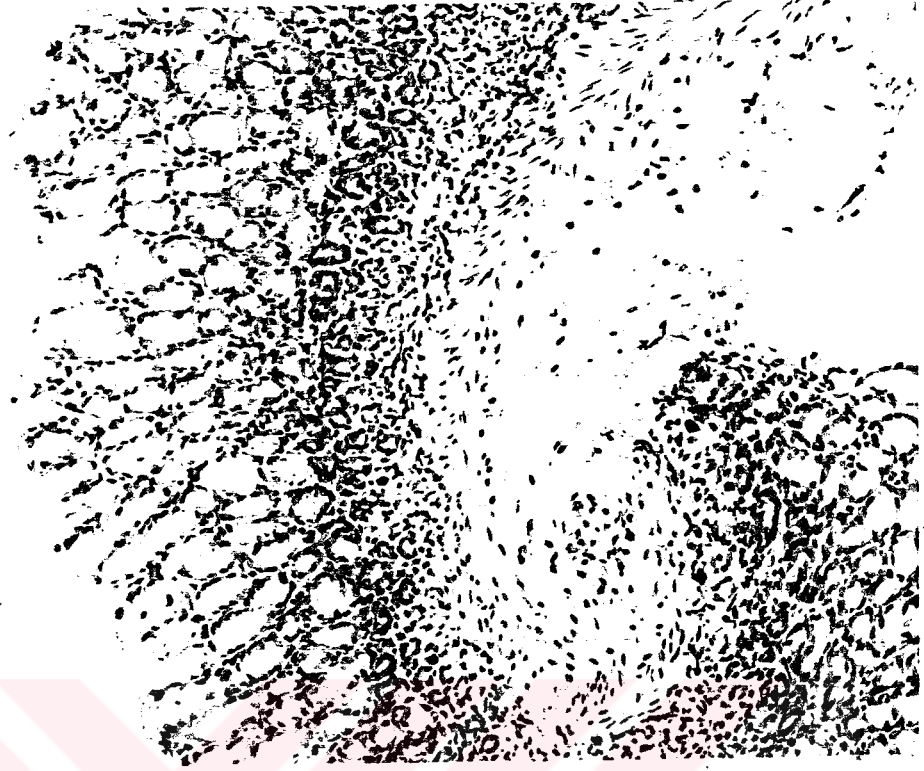
İki ay süre ile 20mg/kg omeprazol verilen gruba ait ince kesitler elektron mikroskopda incelendiğinde immunreaktif gastrin hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda salgı granülü gözlemlendi. Salgı granüllerinin çoğunluğu köpüğümsü manzarada merkezi kısım içeren tipde idi. Az sayıda elektron yoğun salgı granülü mevcut olup, kuvvetli immunreaktif olarak görüldü. Köpüğümsü görüntüde merkezi kısım içeren salgı granülleri ise yine tek tipde olmayıp birçok ara formlar içeren morfolojiye sahiptiler. Bu ara formlardan nisbeten daha koyu merkezi kısma sahip olanların daha çok altın bağladığı, daha açık olanların ise çok az sayıda veya bazen de hiç altın bağlamadığı görüldü. Bu grupta gastrin hücre nukleusları büyük ve yer yer düzensiz sınırlara sahipti. İnterselüler saha genişlemişti (Resim 47). Bazı pilor gastrin hücrelerinin bez lümenine eriştikleri ve bu hücrelerin apikal yüzeylerinde kontrole kıyasla çok sayıda mikrovillus içerdikleri görüldü. Bu tip

gastrin hücrelerinde hücrenin bazal,lateral ve supranuklear sitoplazmaları salgı granülleri ile dolu olmakla beraber apikal membran altındaki oldukça geniş bir sitoplazma bölgesinin salgı granülü içermediği dikkati çekti. Yer yer köpüğümsü tipde salgı granüllerinin lateral ve bazal plazma membranında ekzositozu görüldü. Ayrıca elektron yoğun salgı granüllerinde ekzositozu veya plazma membranına bitişik yerleştiği gözlendi. Bazı gastrin hücrelerinin sadece bazal laminaya temas ettiği diğer bazılarının ise ne bazal lamina ne de lümenle temasda olmadığı dikkati çekti (Resim 48).

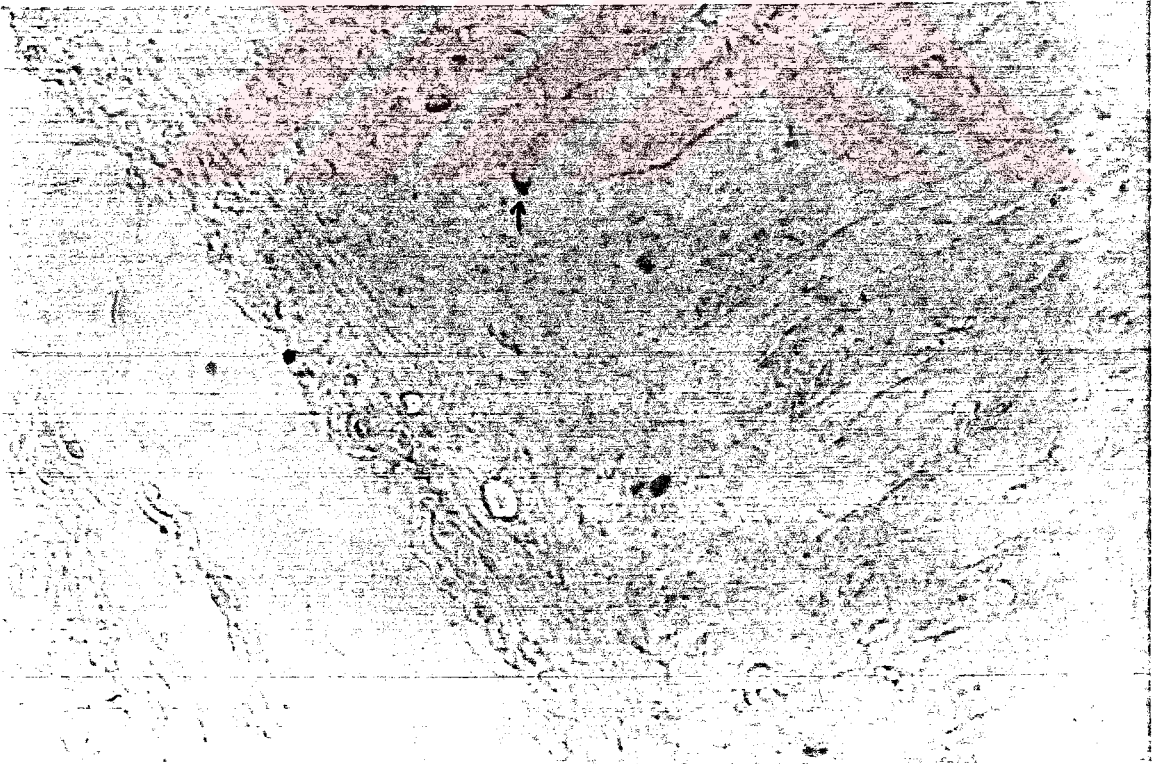
İki ay süre ile 100mg/kg omeprazol verilen gruba ait ince kesitlerde pilor bezlerinin dip kısımlarında gastrin hücrelerine sıklıkla rastlandı. Zaman zaman birbirine çok yakın olarak yerleşmiş iki veya üç gastrin hücresine rastlandı. İmmünreaktif gastrin hücrelerinin morfolojilerinde yer yer farklılıklar görüldü. Bazı hücreler çok miktarda boş, köpüğümsü ve nisbeten daha az yoğun salgı granülü içerirken diğer bazıları elektron yoğun salgı granüllerinden zengin olarak gözlendi (Resim 49-51).

4.4.2. Somatostatin hücreleri

Somatostatin antikoruna ile inkübasyonu takiben immunogold yöntemi uygulanan kontrol ve deney gruplarına ait pilor ince kesitleri elektron mikroskop ile incelendiğinde spesifik işaretlenme gözlenemedi. Somatostatin hücrelerinin morfolojik kriterler ile diğer endokrin hücrelerden kesin olarak ayırt edilmesi mümkün olmadığından bu hücreler ile ilgili ultrastrüktürel değerlendirme yapılamadı. Farklı antiserum konsantrasyonları denenmesine rağmen hiçbir konsantrasyonda spesifik immün işaretlenme elde edilemedi (Resim 52).



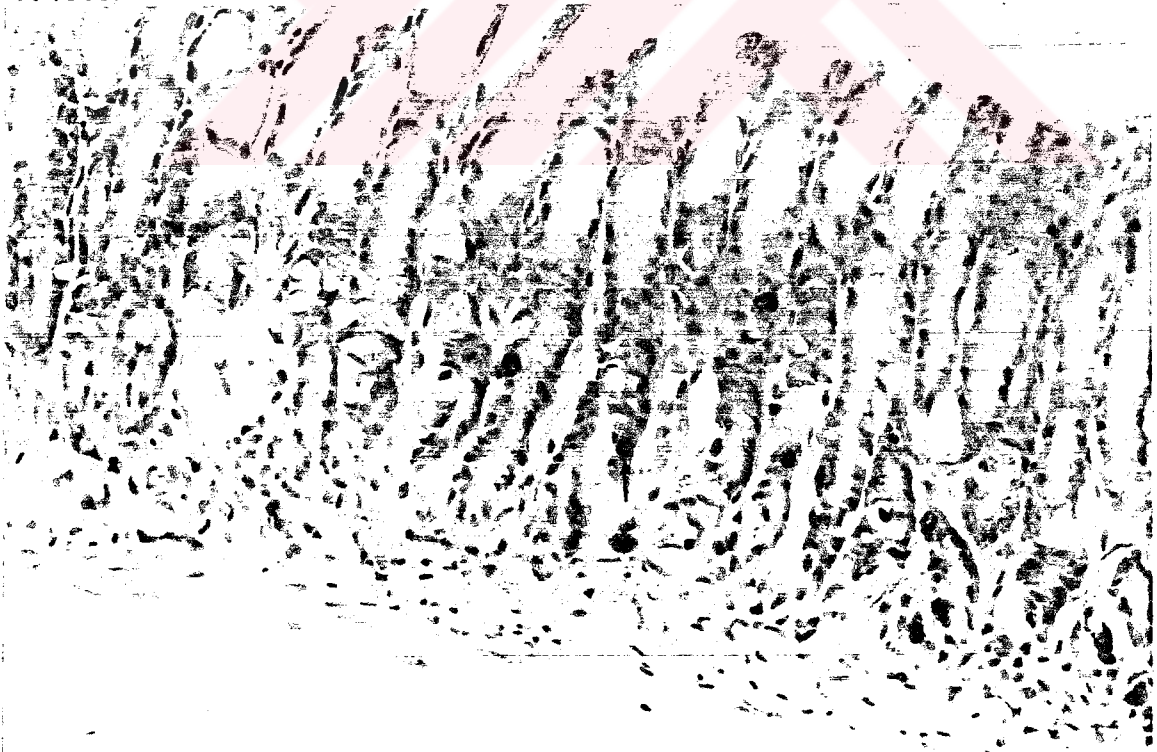
Resim 1: Kontrol grubuna (4 gün) ait sıçan pilor mukozasında immunreaktif gastrin hücreleri (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilin, X 200.



Resim 2: Kontrol grubuna (2 ay) ait pilor kesiti gastrin antikoru kullanılarak streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi ile boyandığında, immunreaktif gastrin hücreleri pilor bezlerinin dip kısımlarında dağınık olarak görülmekte (↑). X 400.



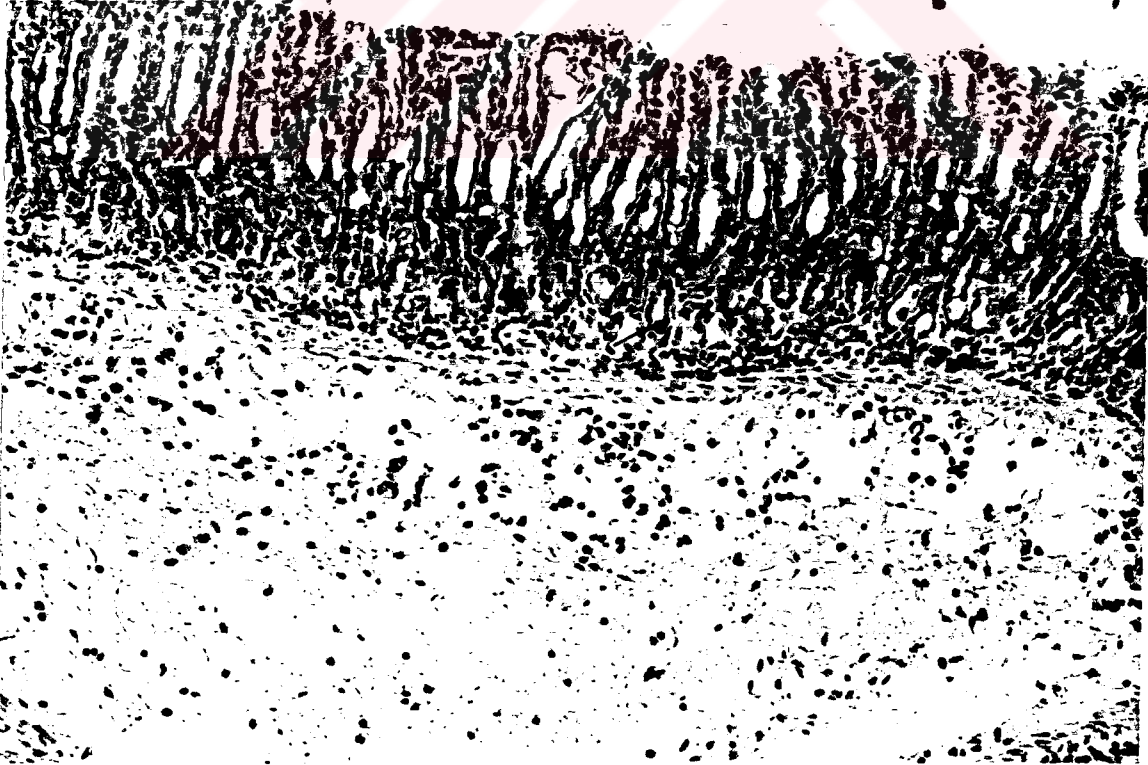
Resim 3: Kontrol grubuna (2 ay) ait sıçan pilor mukozası. İmmunreaktif gastrin hücrelerinde gastrin hormonu hücrelerin bazolateral bölgesinde gözlenmekte (▲). X 1000.



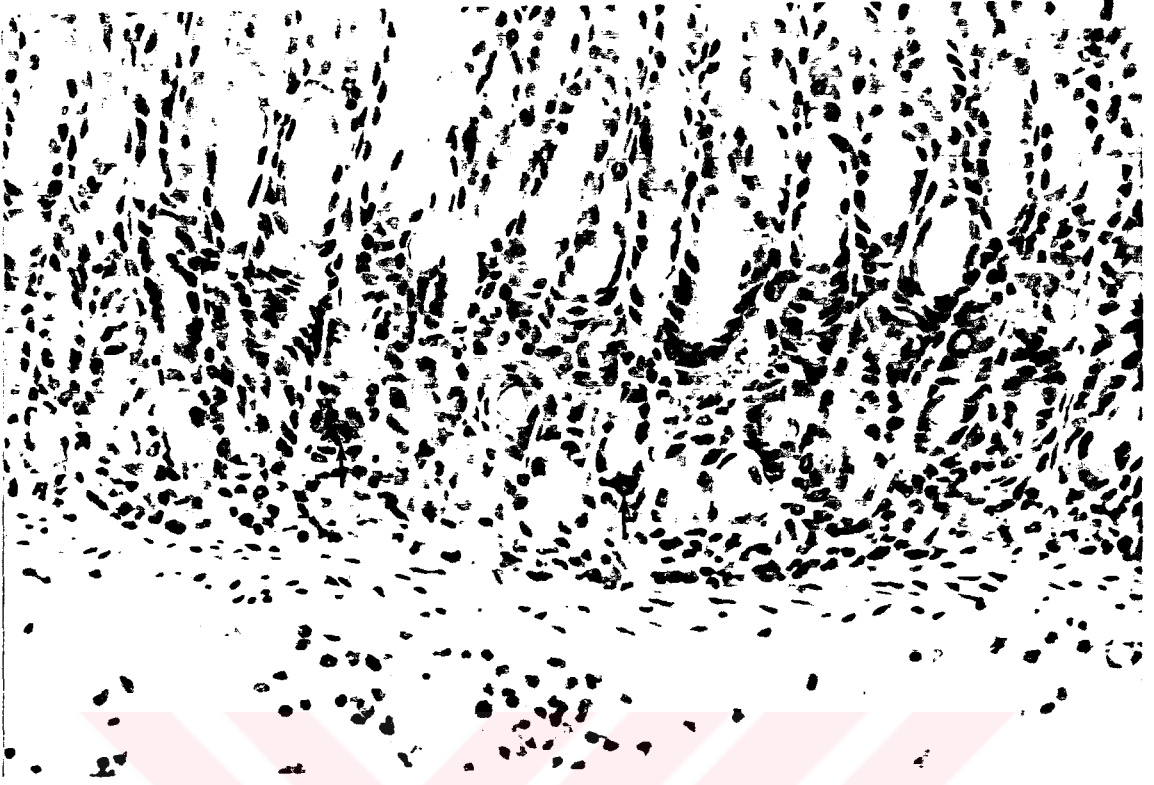
Resim 4: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubuna ait pilor mukozası. İmmun (+) gastrin hücreleri (↑) pilor bezlerinin dip kısımlarında daha yoğun olmakla birlikte tüm mukozada görülmekte. Streptavidin-biotin- peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 400.



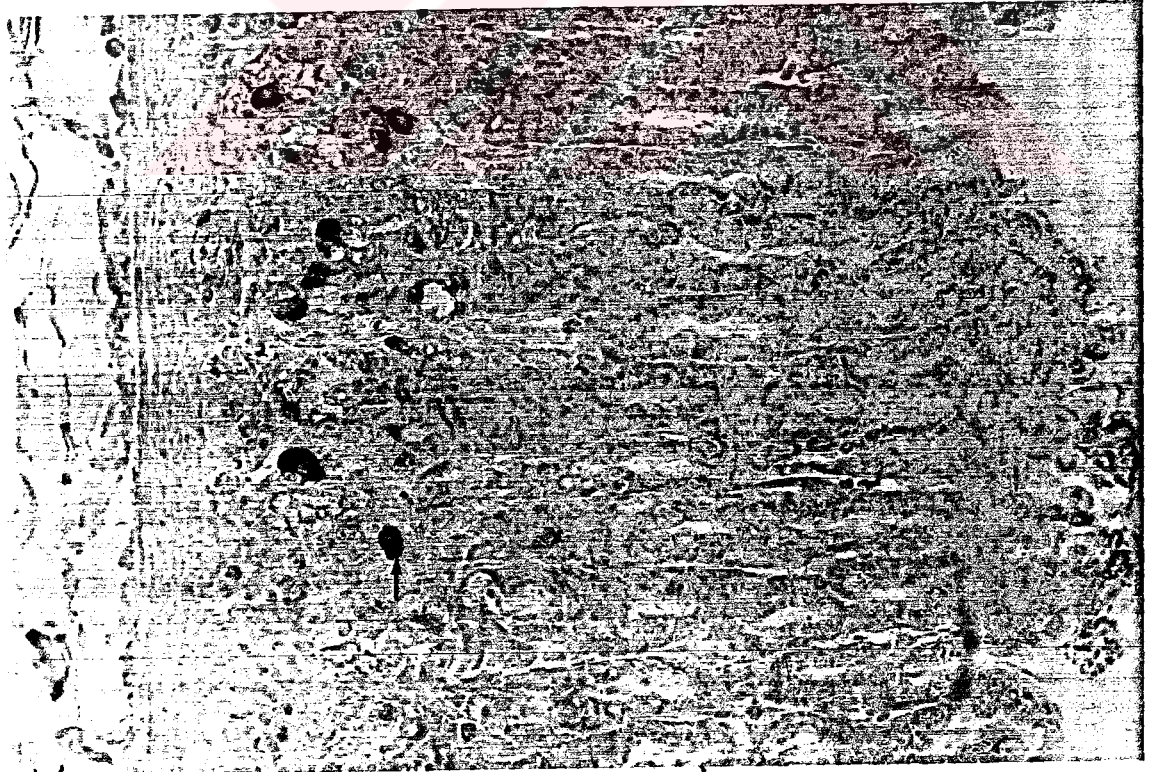
Resim 5: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubuna ait pilor mukozası. Gastrin immunreaktivitesi genellikle hücrelerin hem bazolateral hem de supranuklear kısmında yer almakta (▲). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 1000.



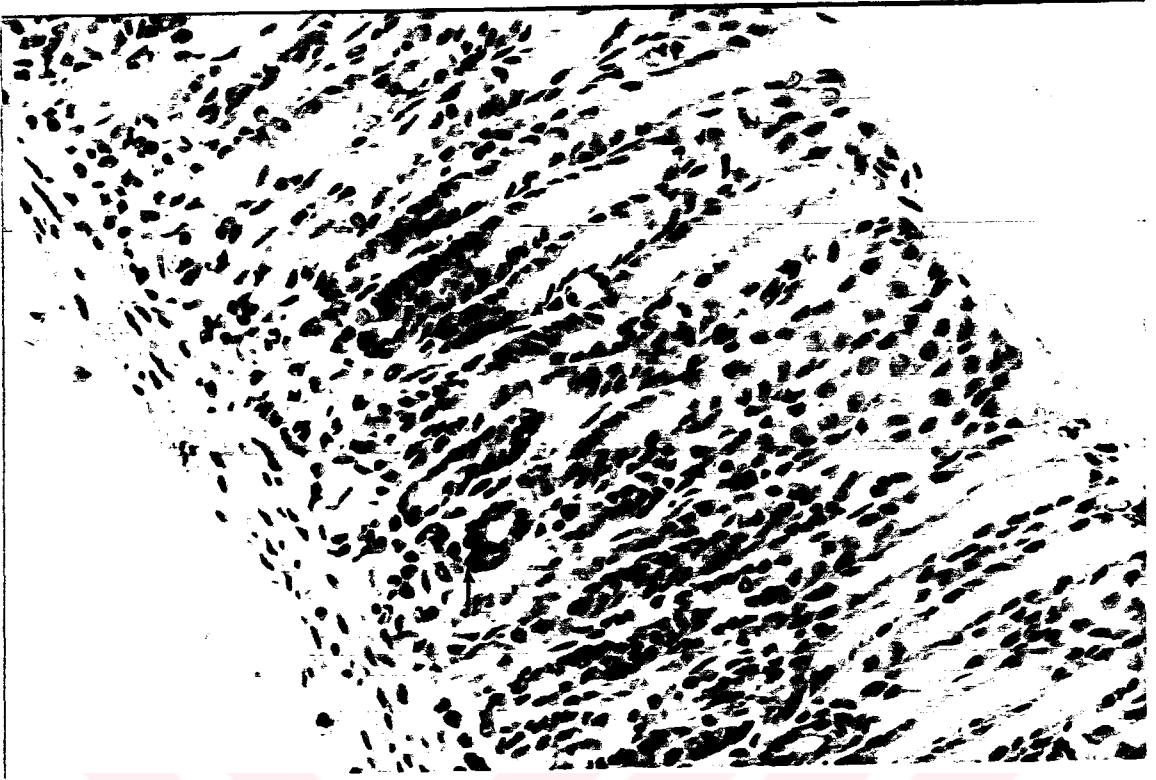
Resim 6: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan deney grubuna ait pilor. Tüm mukozada gastrin (+) hücreler (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 200.



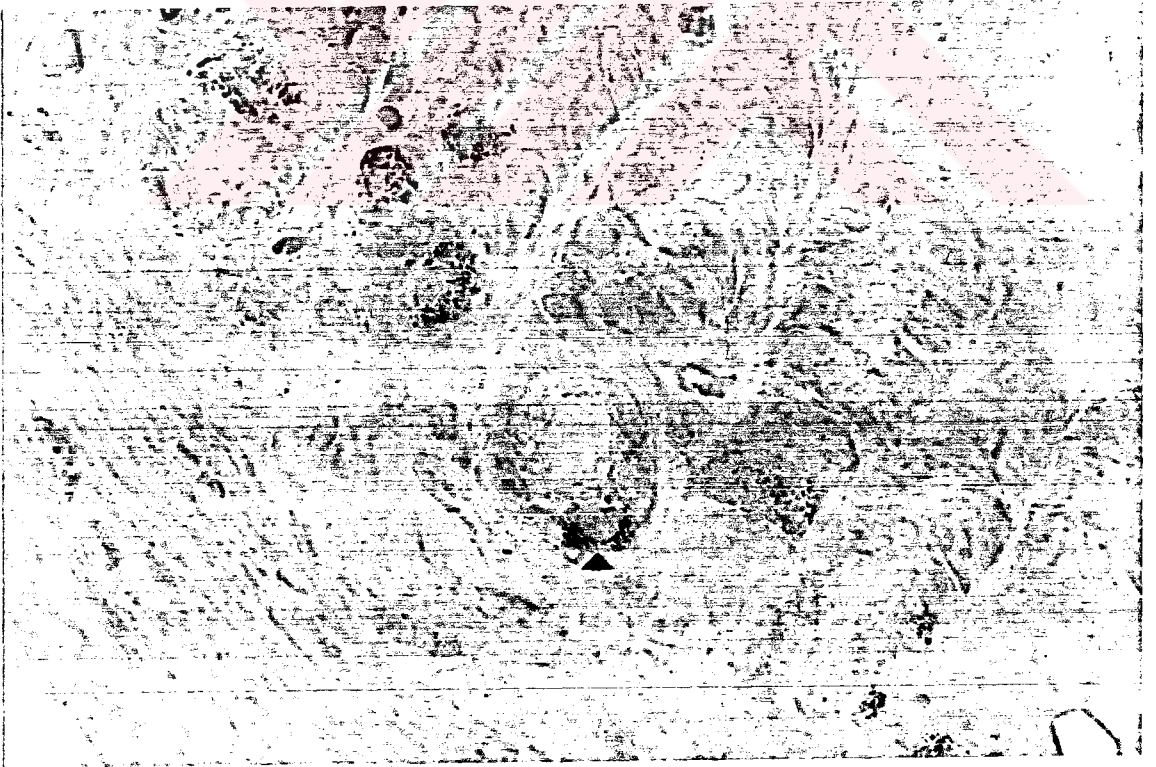
Resim 7: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen gruba ait pilor mukozası. Kuvvetli immun (+) gastrin hücreleri (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 400.



Resim 8: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen gruba ait pilor mukozası. Çok sayıda kuvvetli gastrin (+) reaksiyon veren hücreler (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 400.



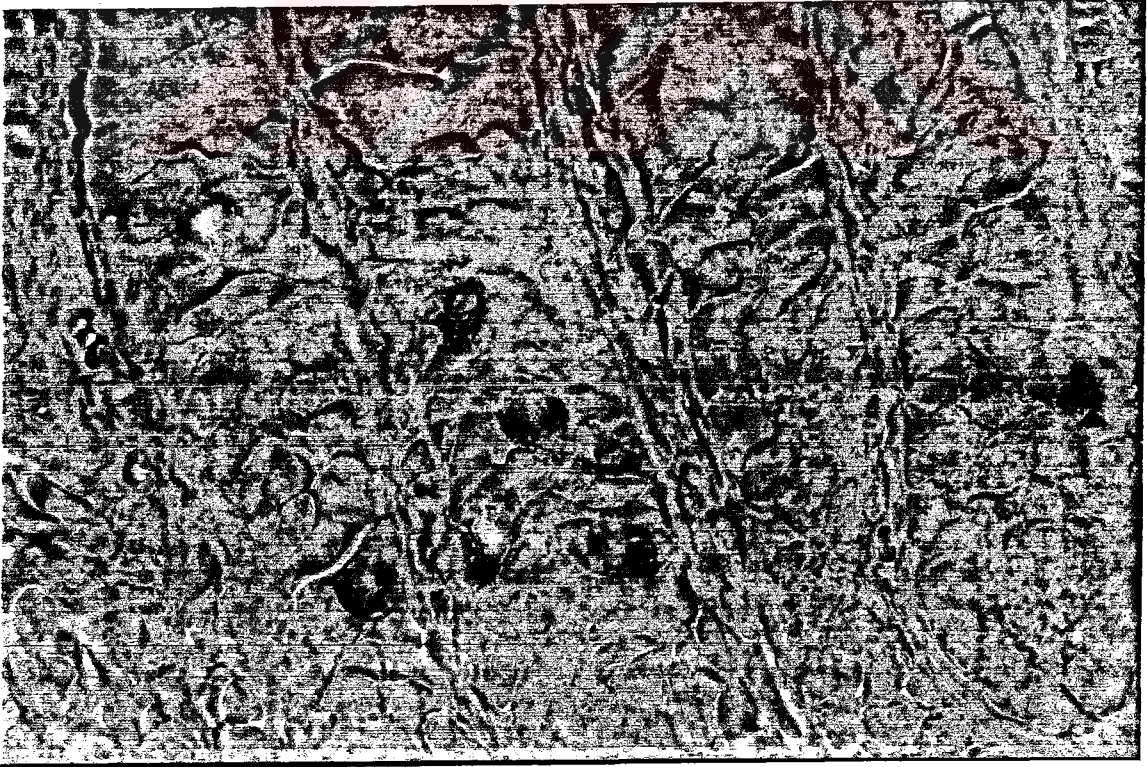
Resim 9: İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait pilor mukozasında kuvvetli immun (+) gastrin hücreleri (↑) görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz, zit boya hematoksilin. X 400.



Resim 10: İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait pilor mukozası daha büyük büyültmede incelendiğinde, gastrin immunreaktivitesi hücrelerin genellikle bazolateral bölgesinde görülmekte (▲). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zit boya hematoksilin. X 1000 .



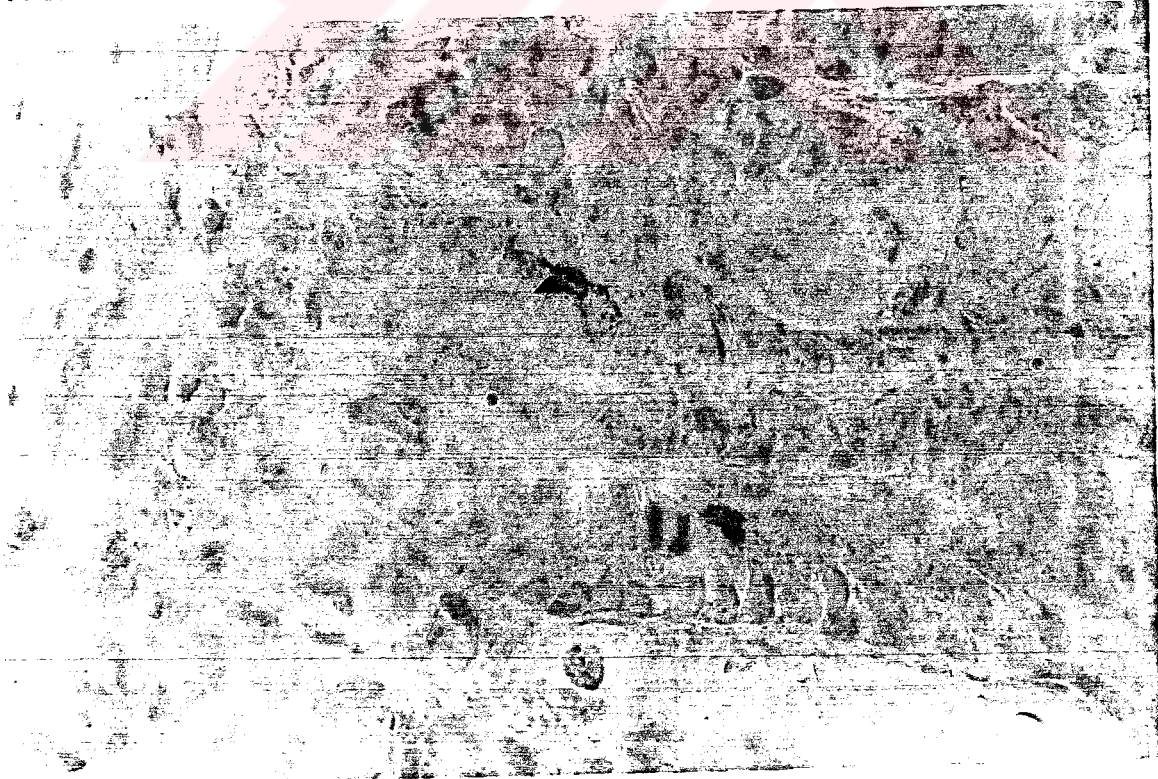
Resim 11: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında çok sayıda immun (+) gastrin hücresi (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 400.



Resim 12: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait immunreaktif gastrin hücrelerinde, peptid içeriğın (▲) genellikle bazolateral yerleştiği görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 1000.



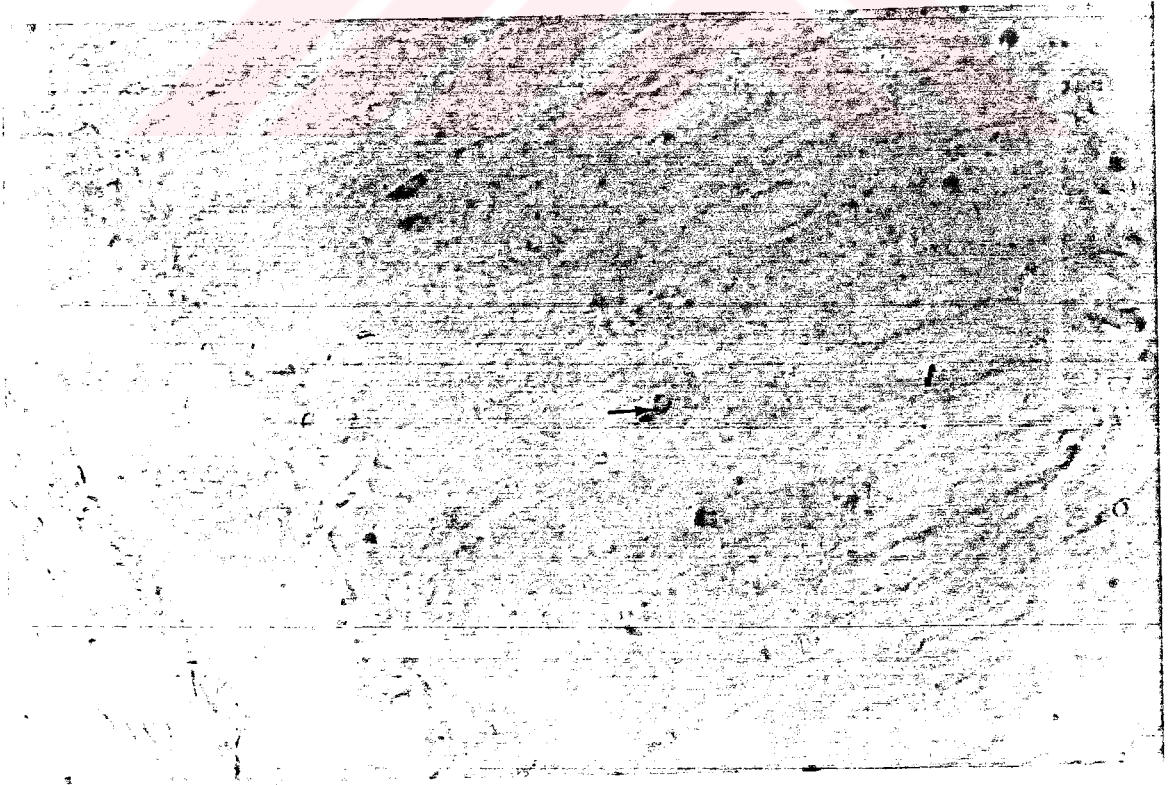
Resim 13: Kontrol grubuna (4 gün) ait sıçan pilor mukozasında immunreaktif somatostatin hücreleri (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 200.



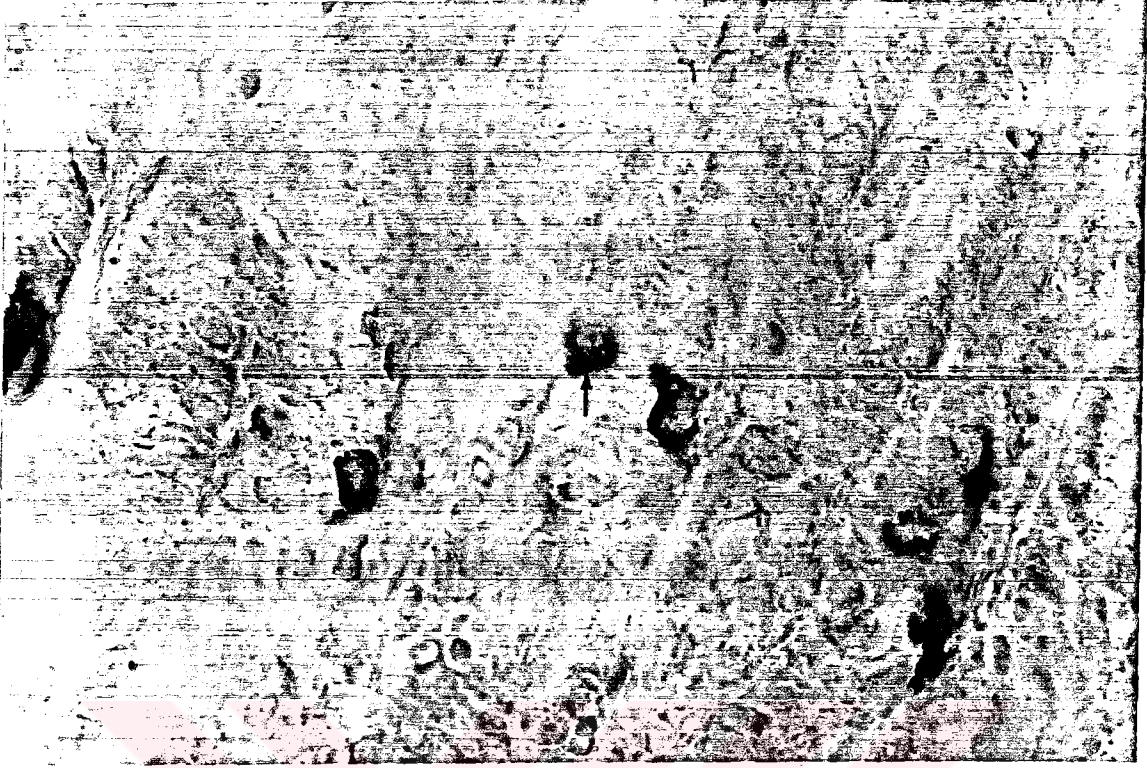
Resim 14: Kontrol grubuna (2 ay) ait sıçan pilor mukozası. Somatostatin (+) hücrenin bazal uzantısında immunreaktif materyal (▲) görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 1000.



Resim 15: Kontrol grubuna (2 ay) ait pilor mukozası. Immunreaktif somatostatin hücreleri (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 1000.



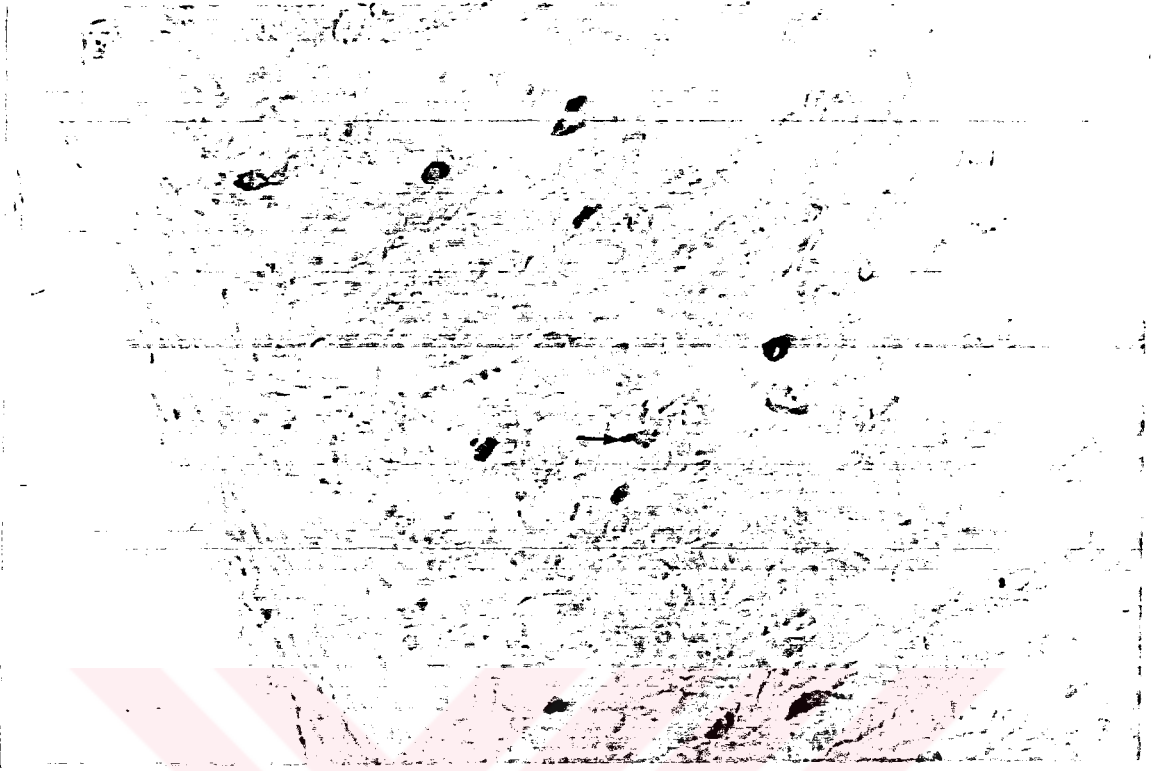
Resim 16: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait sıçan pilor mukozasında somatostatin (+) hücreler (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 400.



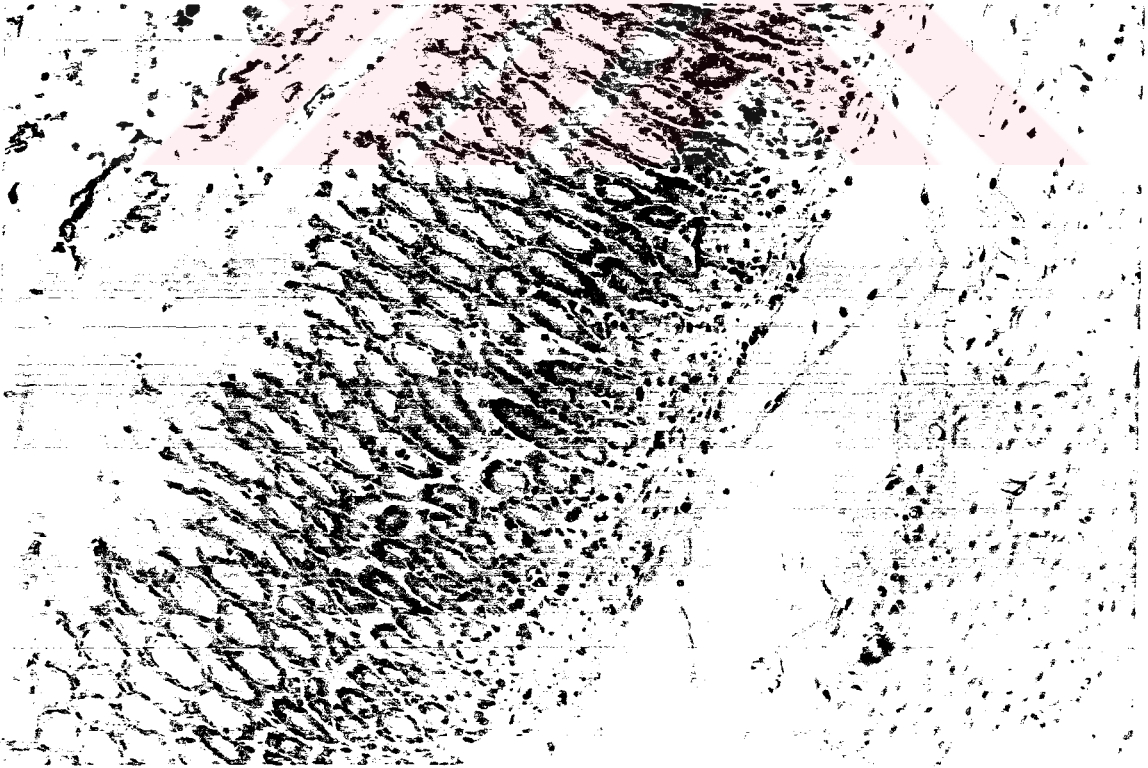
Resim 17: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait sıçan pilor mukozasında immun (+) somatostatin hücreleri (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 1000.



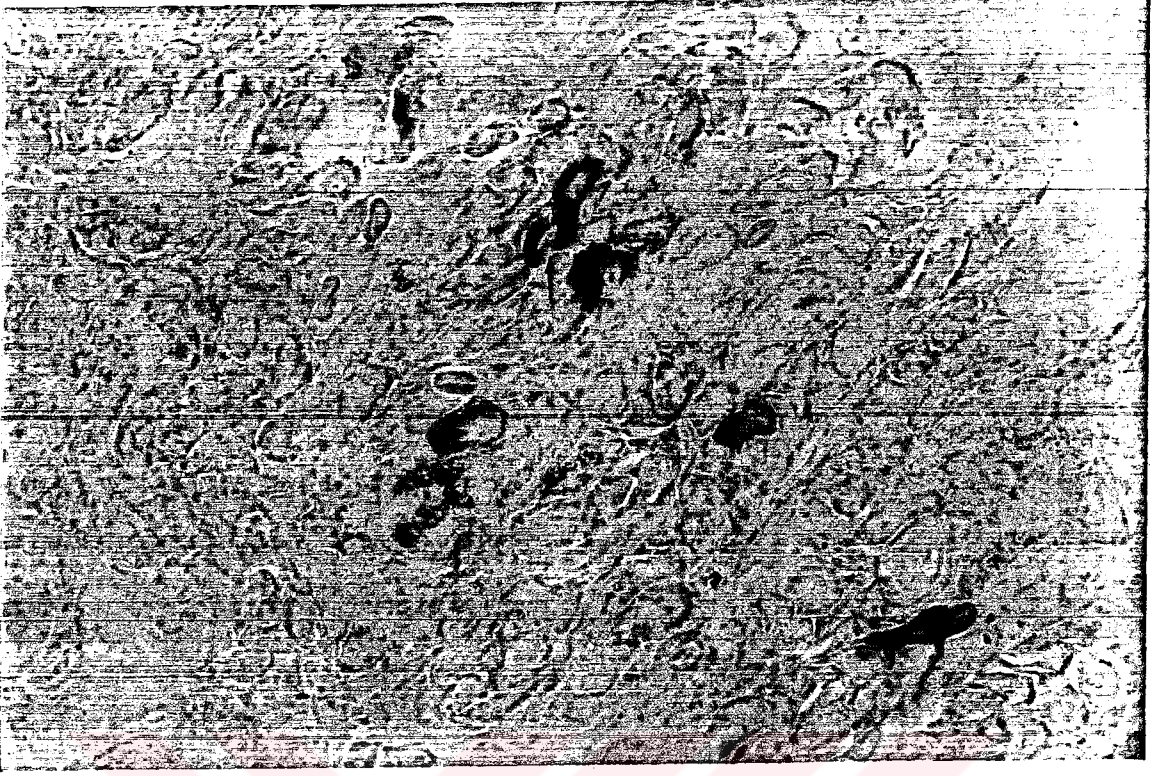
Resim 18: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında immunreaktif somatostatin hücreleri (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 1000.



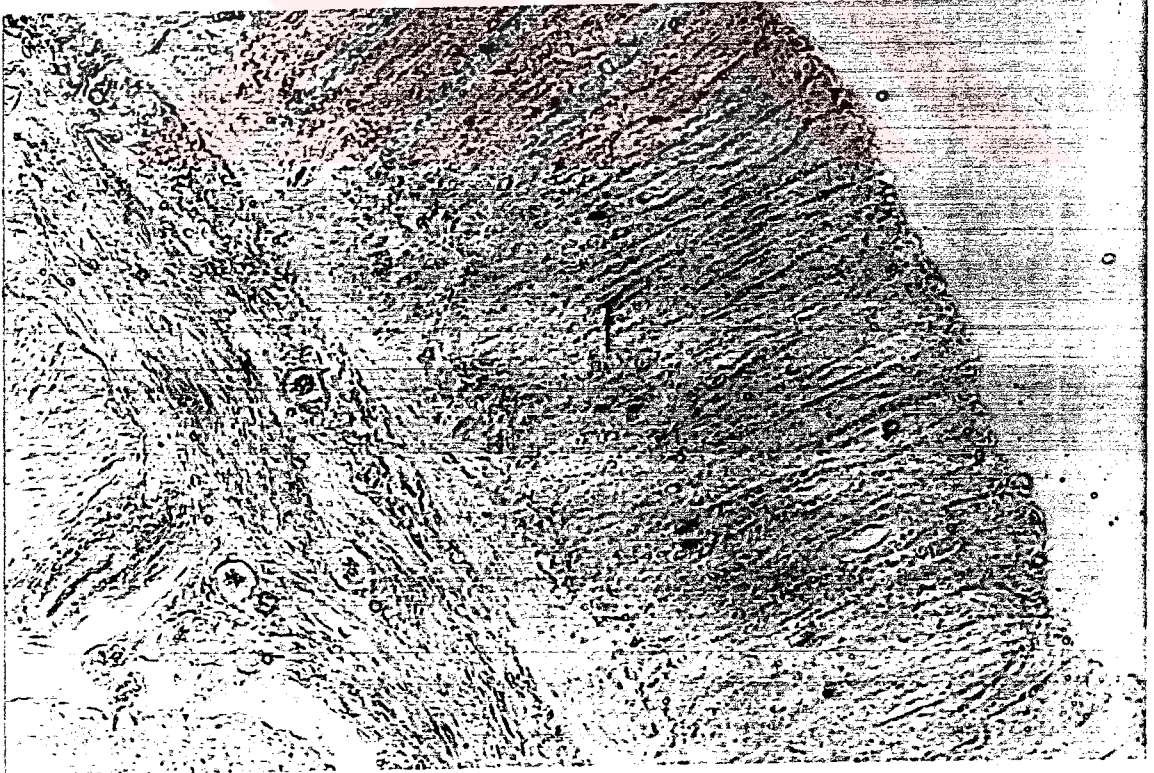
Resim 19: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında somatostatin (+) hücreler (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 400.



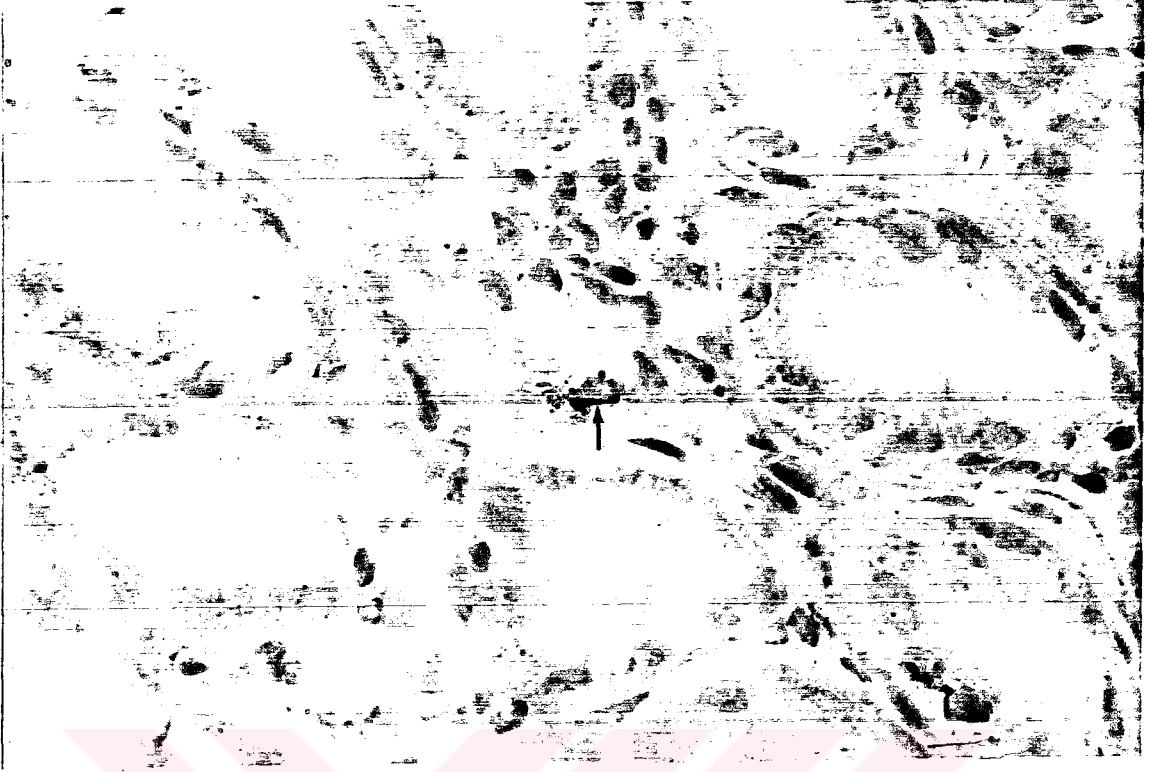
Resim 20: İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında immün (+) somatostatin hücrelerin genellikle bez diplerinde yerleştiği görülmekte (↑). Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 200.



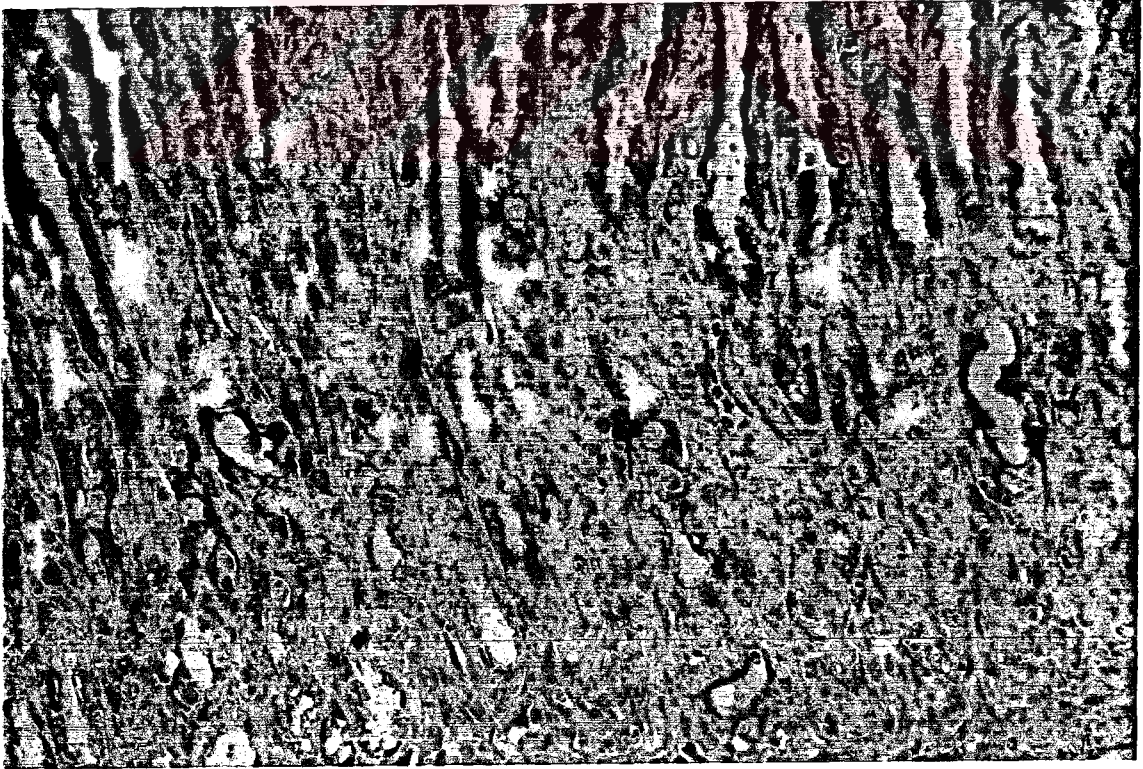
Resim 21: İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında, immunreaktif somatostatin hücrelerinde peptid içeriğin (↑) genellikle bazolateral, bazen supranuklear ve bazal uzantılarda mevcut olduğu görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 1000.



Resim 22: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında immun (+) somatostatin hücreleri (↑) tüm mukozada dağınık olarak görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz. X 200.



Resim 23: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında, immunreaktif somatostatin hücrelerinde peptid içeriğinin (↑) genellikle bazolateral bölgede yerleştiği görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz, zıt boya hematoksilen. X 1000.



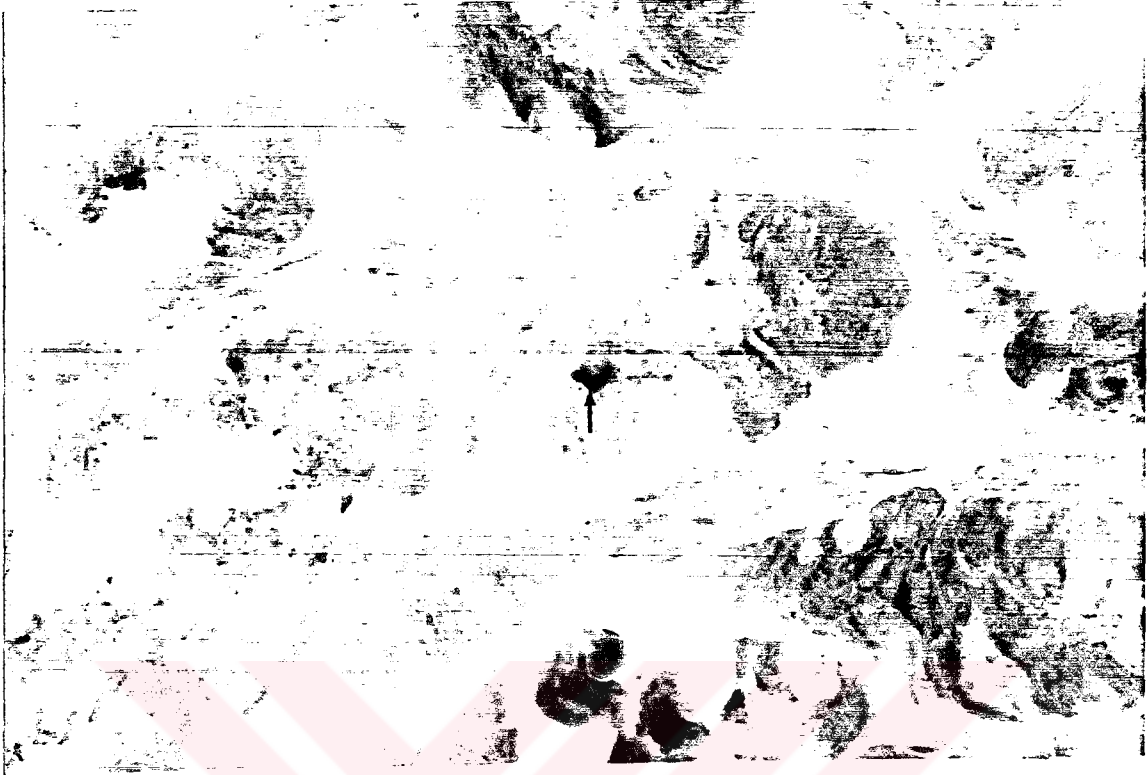
Resim 24: Kontrol grubuna ait sıçan pilor mukozasından bir bölüm. Digoxigenin işaretli gastrin probu kullanılan in situ hibridizasyon yöntemi ile, gastrin mRNA (↑) sinyali içeren hücrelerin pilor bezlerinin üst kısımlarında yerleştiği görülmekte. X 400.



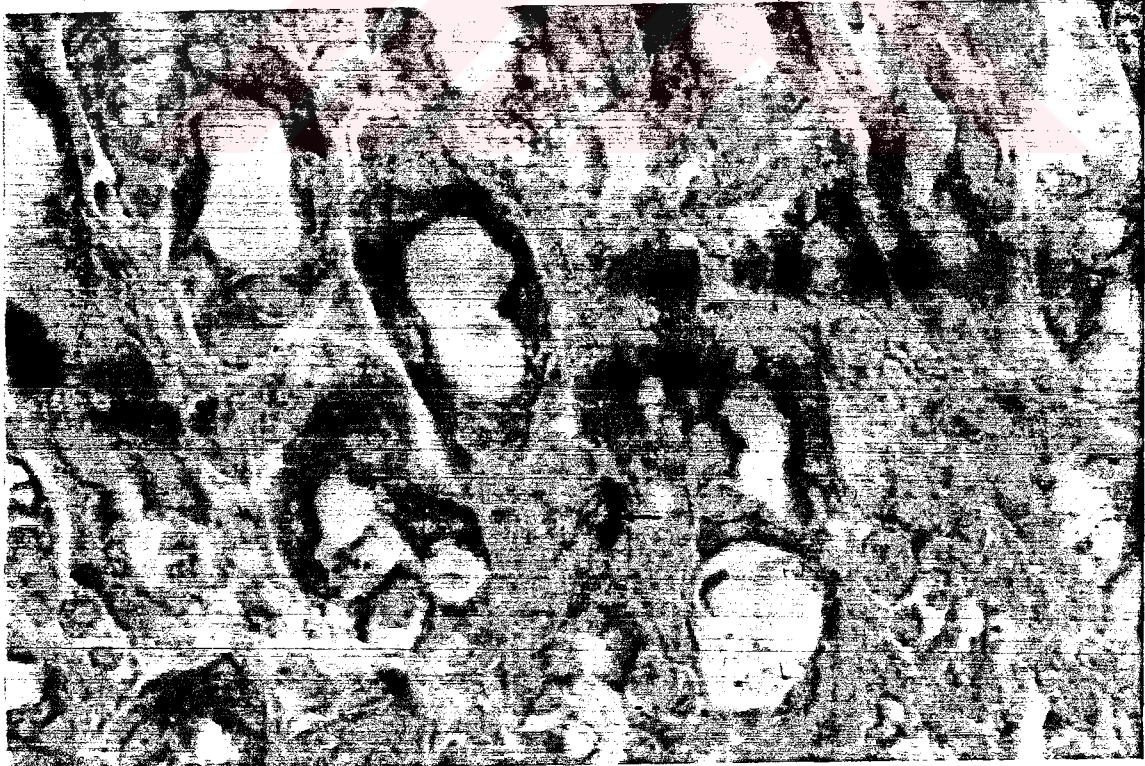
Resim 25: Kontrol grubuna ait pilor mukozası. İn situ hibridizasyon yöntemi ile, gastrin mRNA sinyallerinin (↑) genellikle nukleus çevresinde tüm sitoplazmada yerleştiği görülmekte. X 1000.



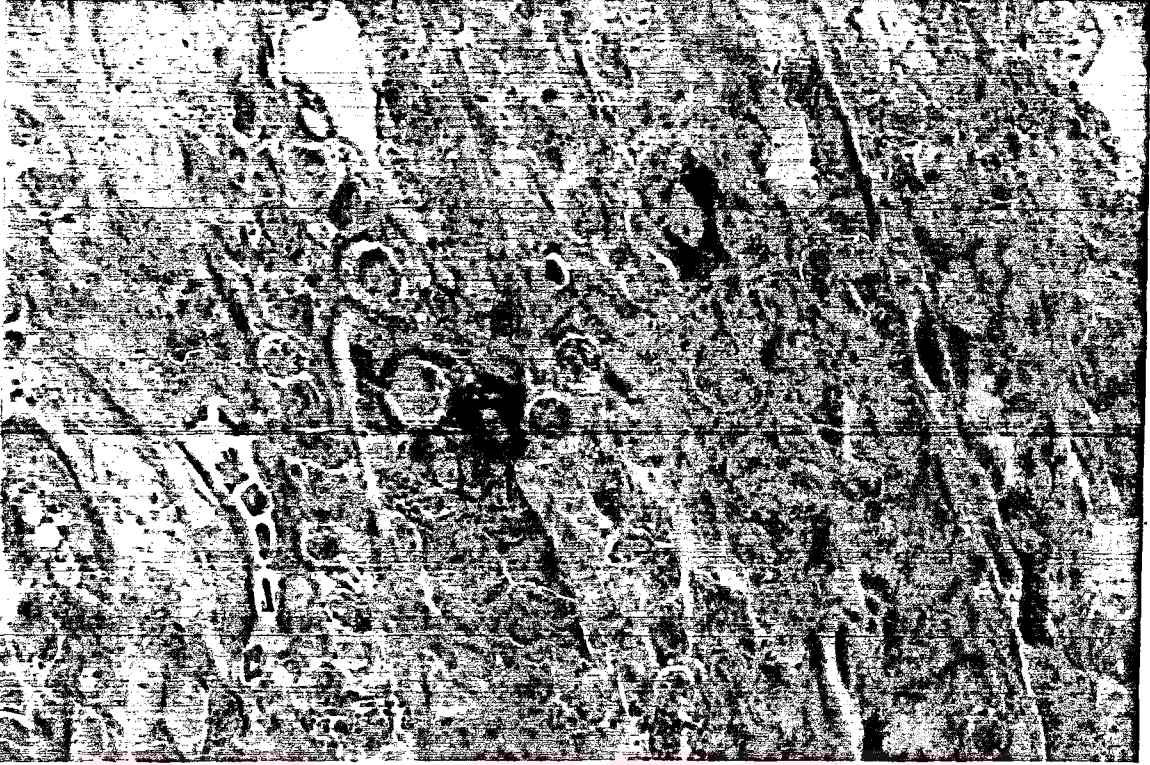
Resim 26: İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında gastrin mRNA sinyali (→) görülmekte. İn situ hibridizasyon. X 1000.



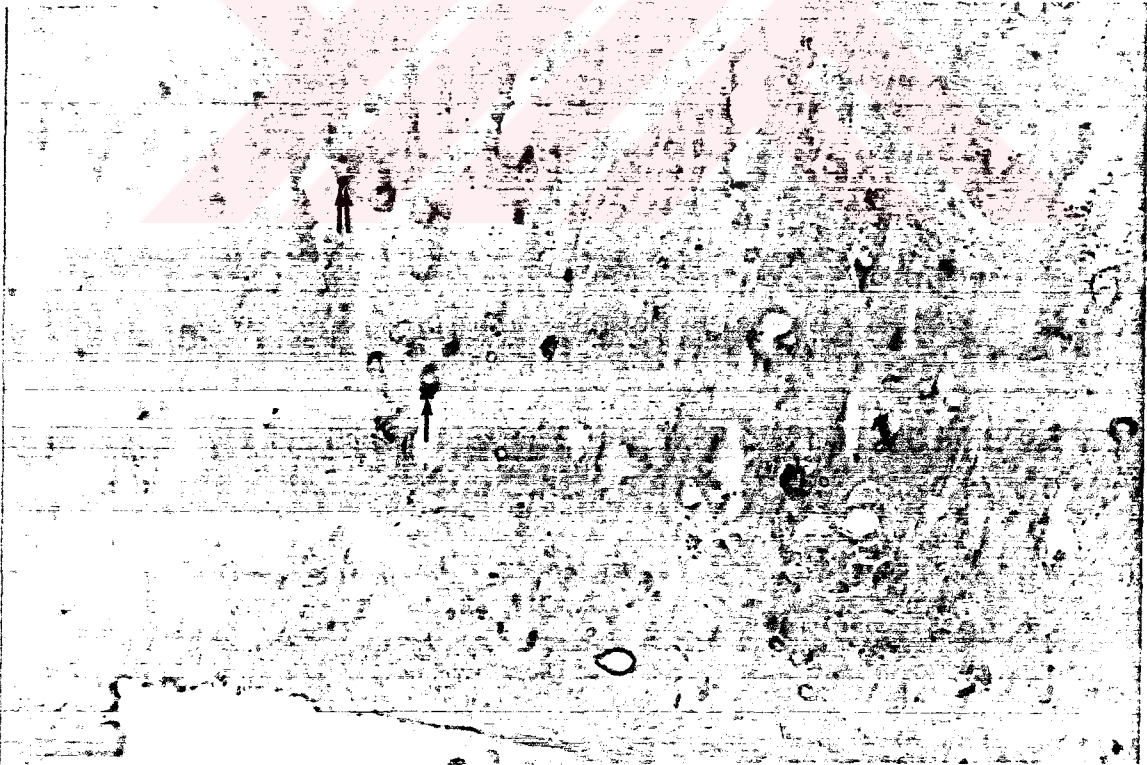
Resim 27: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen gruba ait pilor mukozasında gastrin mRNA sinyali (↑). İn situ hibridizasyon. X 1000.



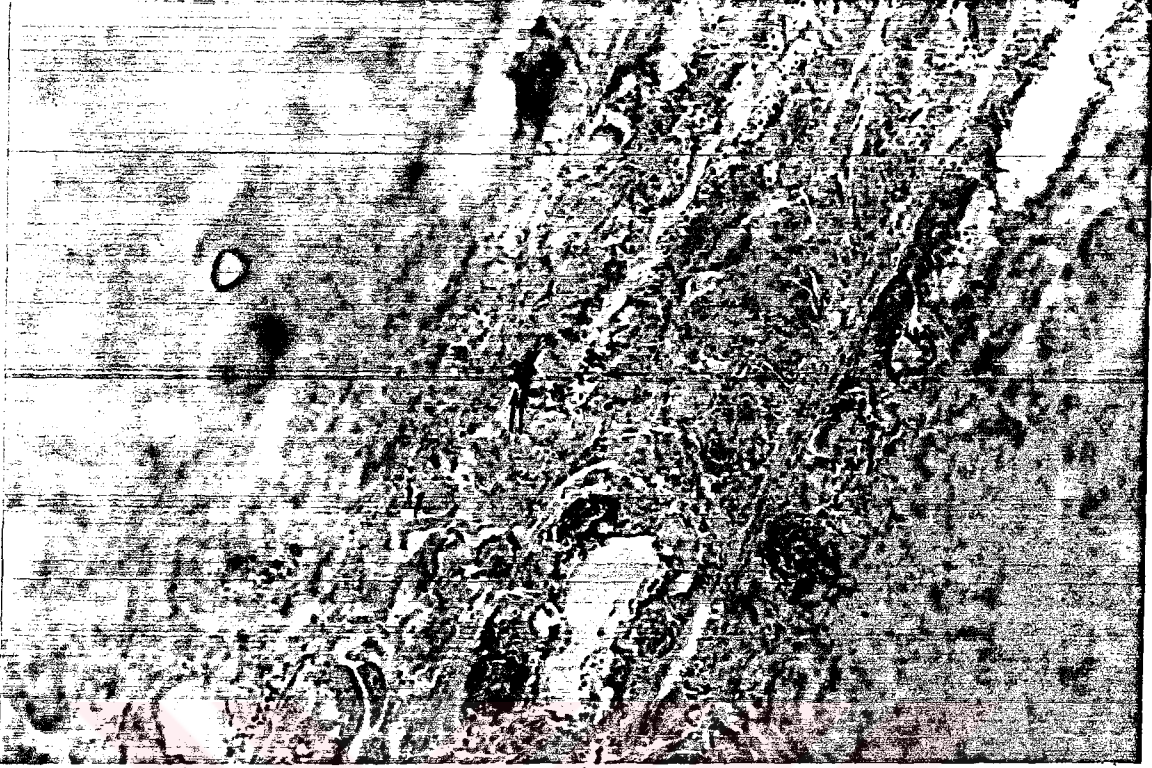
Resim 28: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında gastrin mRNA (←) sinyalinin hücrenin bazolateral kısmında yerleştiği görülmekte. İn situ hibridizasyon. X 1000.



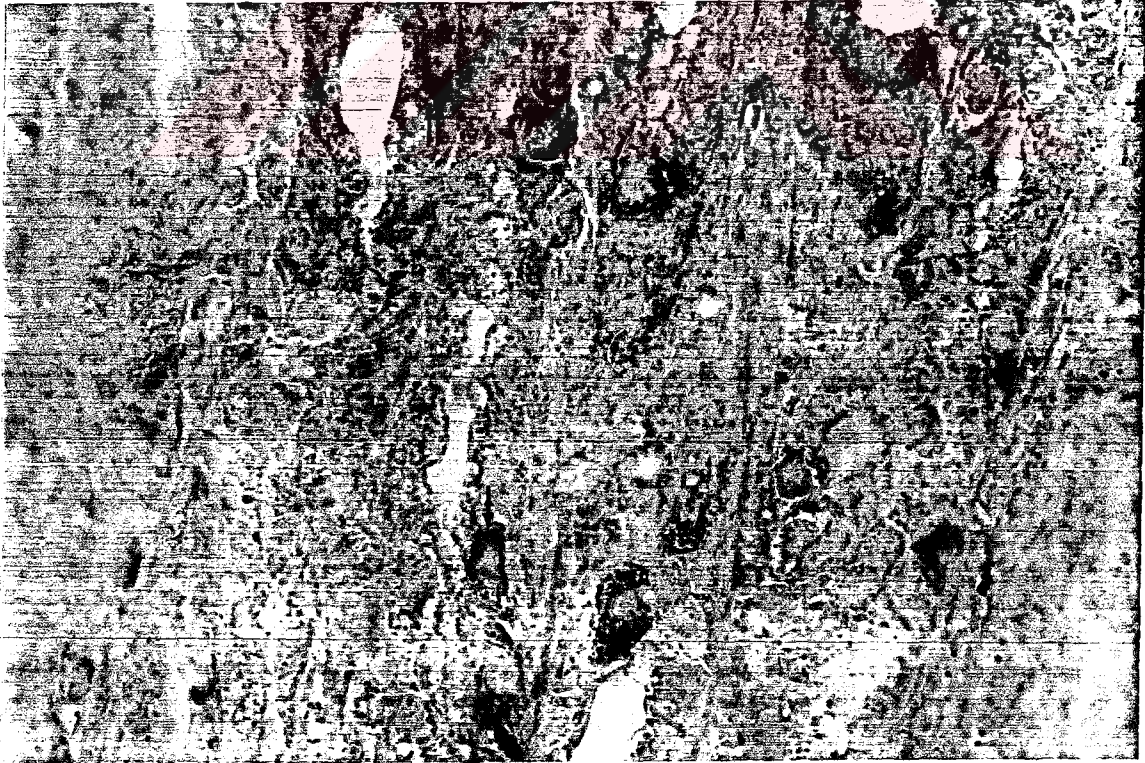
Resim 29: Kontrol grubuna ait pilor mukozası. Gastrin mRNA sinyallerinin nükleus çevresinde (↑), bazen de hücrenin bazolateral kısmında yerleştiği görülmekte. In situ hibridizasyon. X 1000.



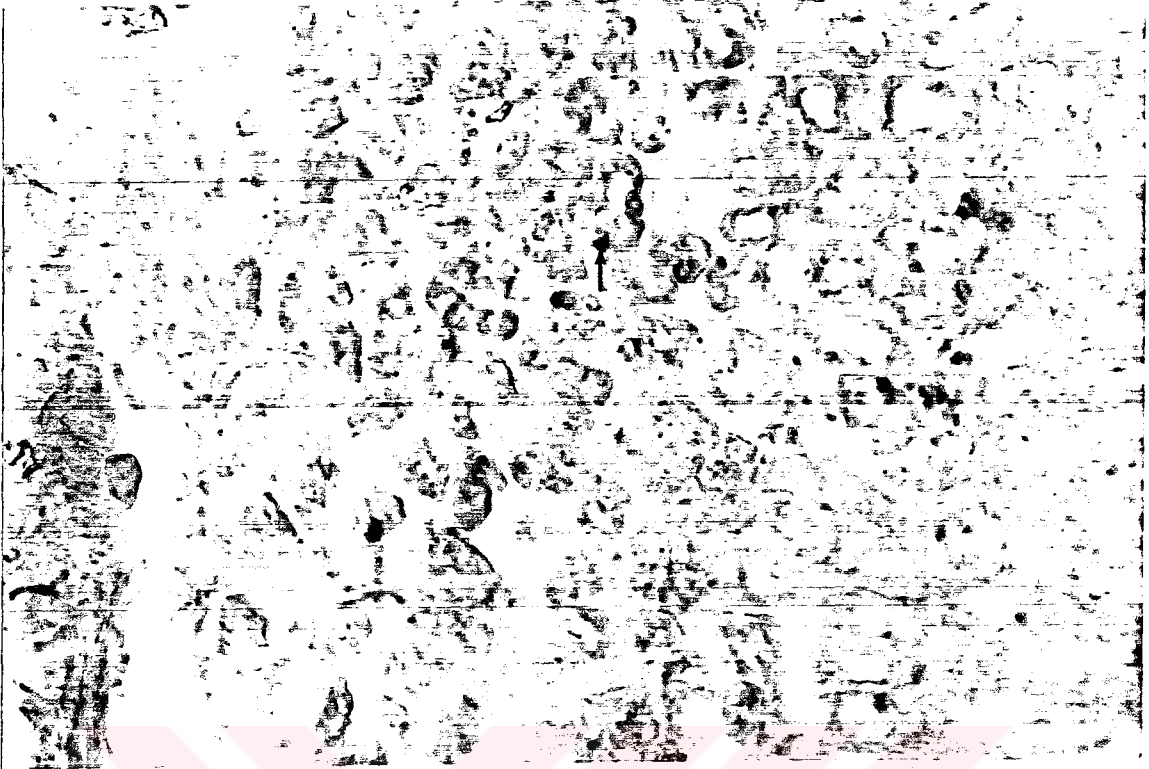
Resim 30: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozası. Önce in situ hibridizasyon, sonra immunohistokimya uygulanan çift boyama ile gastrin peptidi (↑) içeren hücrelerin, pilor bezlerinin genellikle dip kısımlarında yerleştiği, gastrin mRNA (↑↑) sinyali içeren hücrelerin ise genellikle pilor bezlerinin daha üst kısımlarında yerleştiği görülmekte. X 400.



Resim 31: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozası. Çift boyama uygulanan kesitte in situ hibridizasyon ile gastrin mRNA sinyali (↑↑), immunohistokimya ile peptid sinyali (←) birlikte görülmekte. X 1000.



Resim 32: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozası. Çift boyamada bazı hücrelerde sadece gastrin immunreaktivitesi (↓), diğer bazı gastrin hücrelerinde ise sadece gastrin mRNA sinyalleri (↑↑) görülmekte. X 1000.



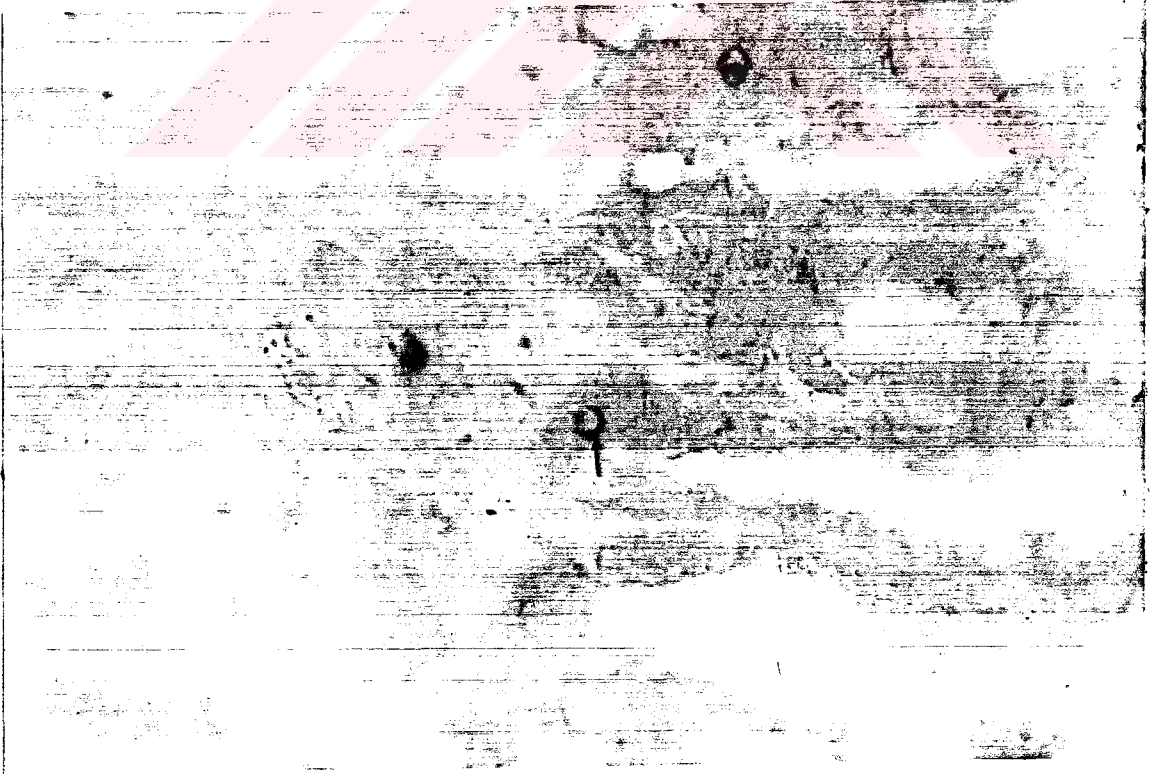
Resim 33: Kontrol grubuna ait sıçan pilor mukozası. Digoxigenin işaretli somatostatin probu kullanılarak uygulanan in situ hibridizasyon ile somatostatin mRNA sinyalleri (↑) görülmekte. X 400.



Resim 34:Dört gün 20mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında, in situ hibridizasyon ile somatostatin mRNA sinyalleri (←) görülmekte. X 400.



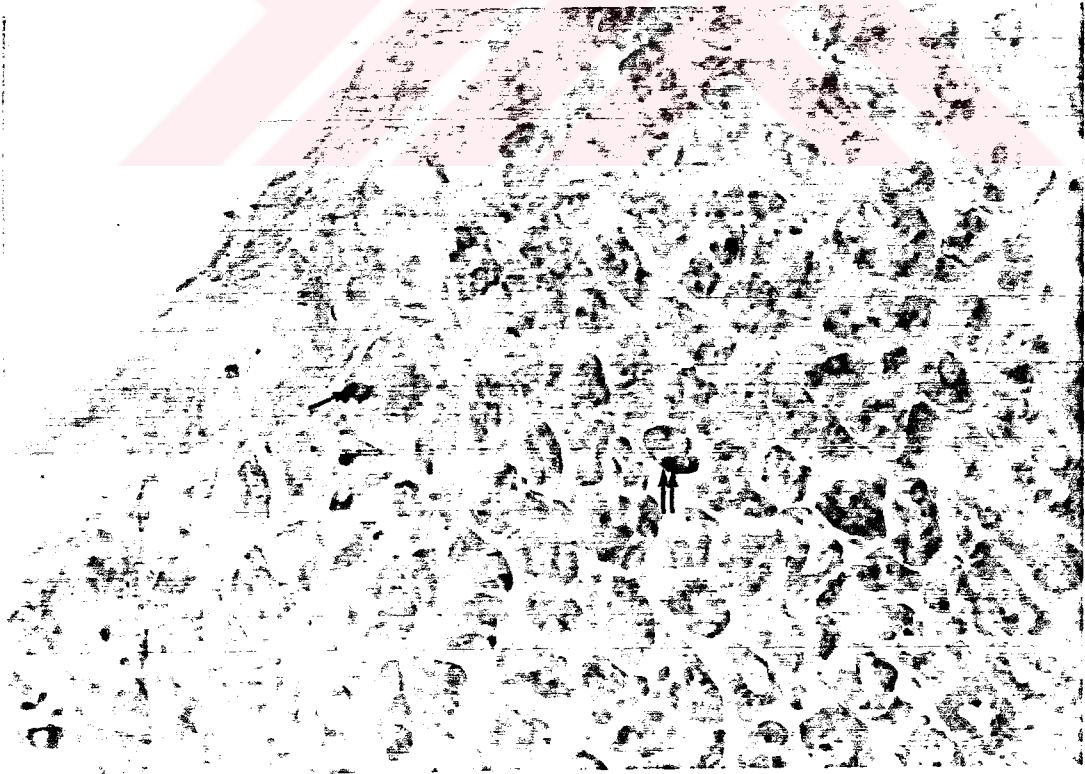
Resim 35: İki ay 20 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında, in situ hibridizasyon yöntemi ile somatostatin mRNA sinyalleri (→) görülmekte. X 1000.



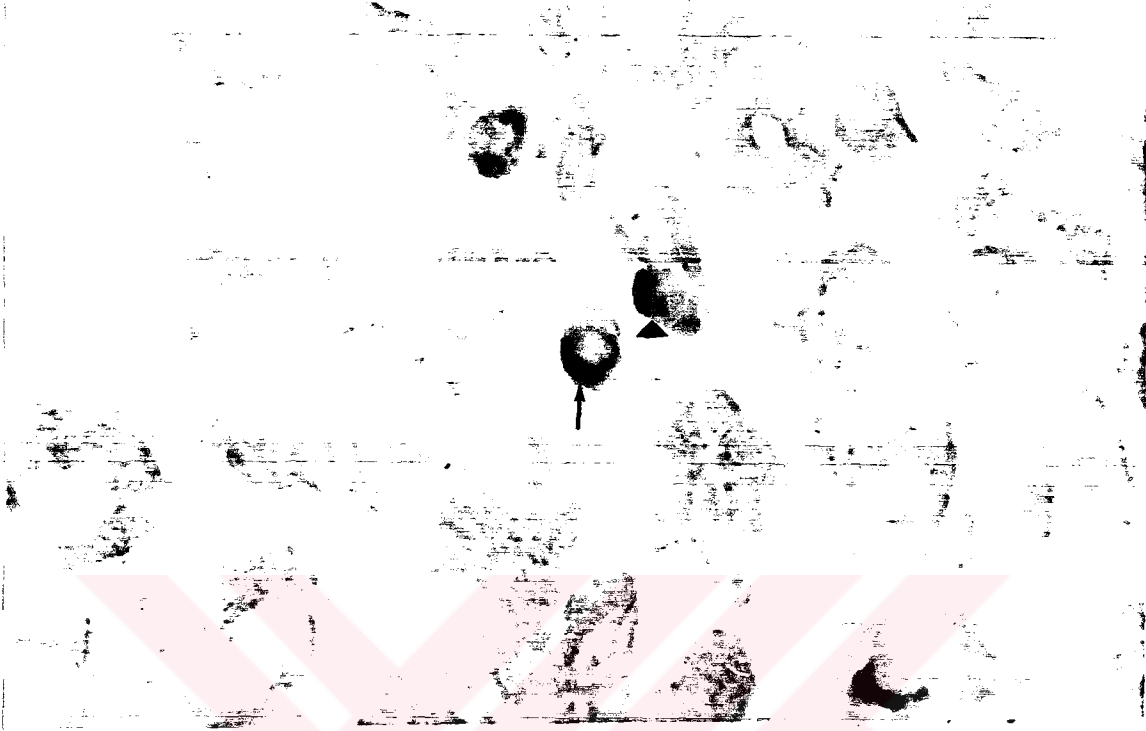
Resim 36: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol uygulanan gruba ait pilor mukozasında, in situ hibridizasyon ile somatostatin mRNA sinyallerinin (↑) genellikle pilor bezlerinin dip kısımlarında yerleştiği görülmekte. X 1000.



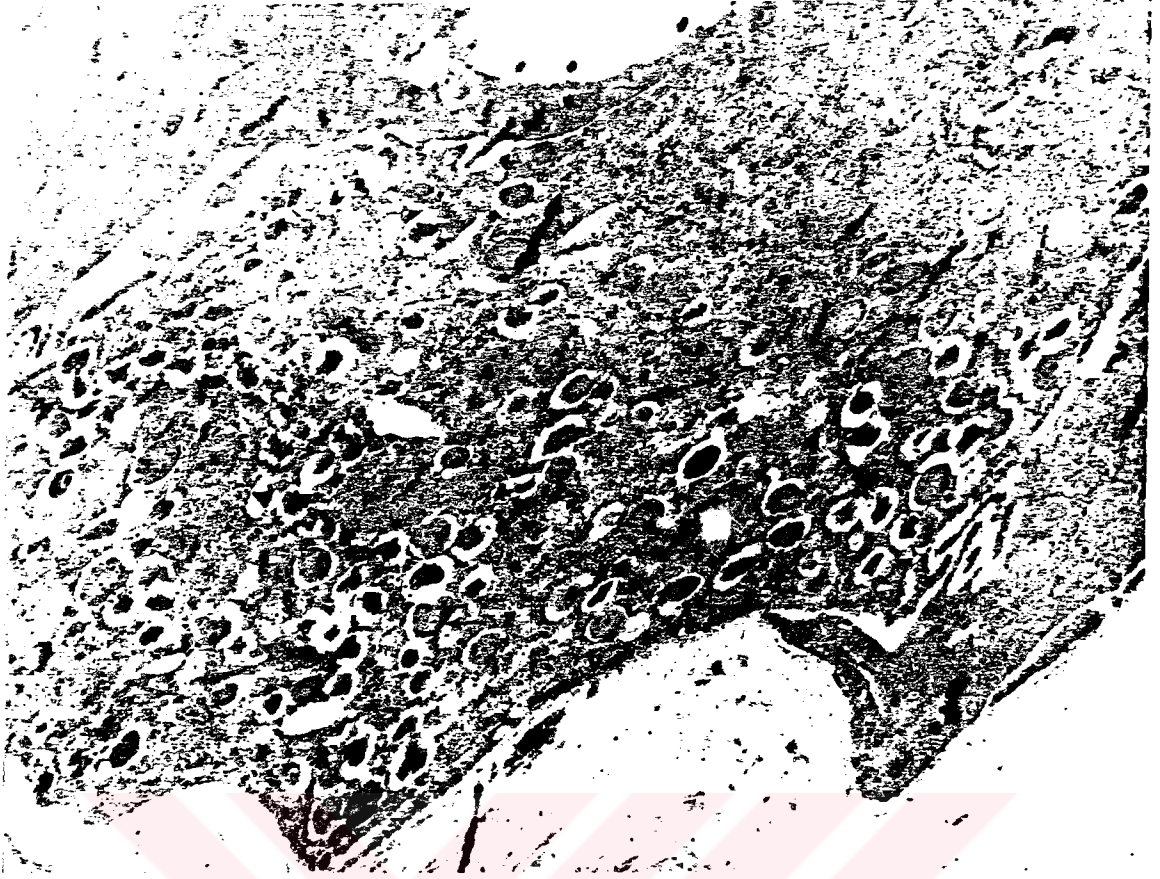
Resim 37: Kontrol grubuna ait pilor mukozasında in situ hibridizasyon yöntemi ile somatostatin mRNA sinyallerinin (↑) hücrenin genellikle bazolateral bölgesinde yerleştiği görülmekte. X 1000.



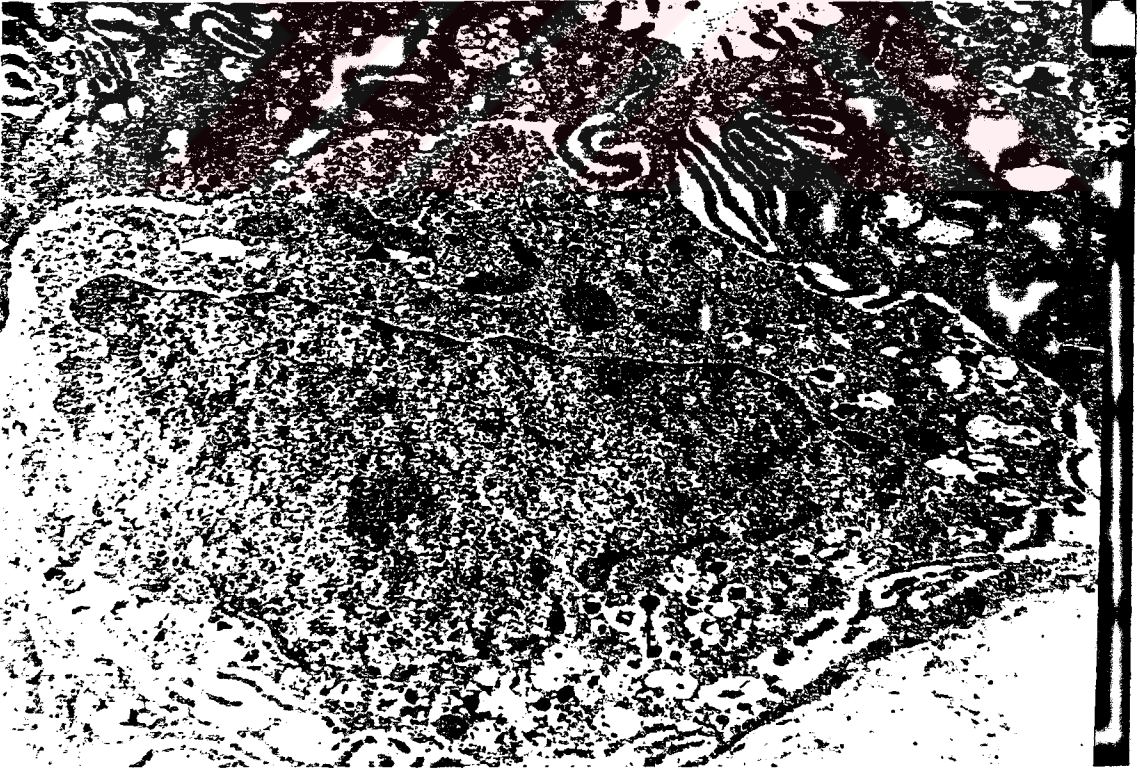
Resim 38: Kontrol grubuna ait pilor mukozasında çift boyama yani önce uygulanan in situ hibridizasyon ile somatostatin mRNA sinyalleri (↑↑), daha sonra uygulanan immunohistokimya ile somatostatin peptid ürünü (→) görülmekte. X 400.



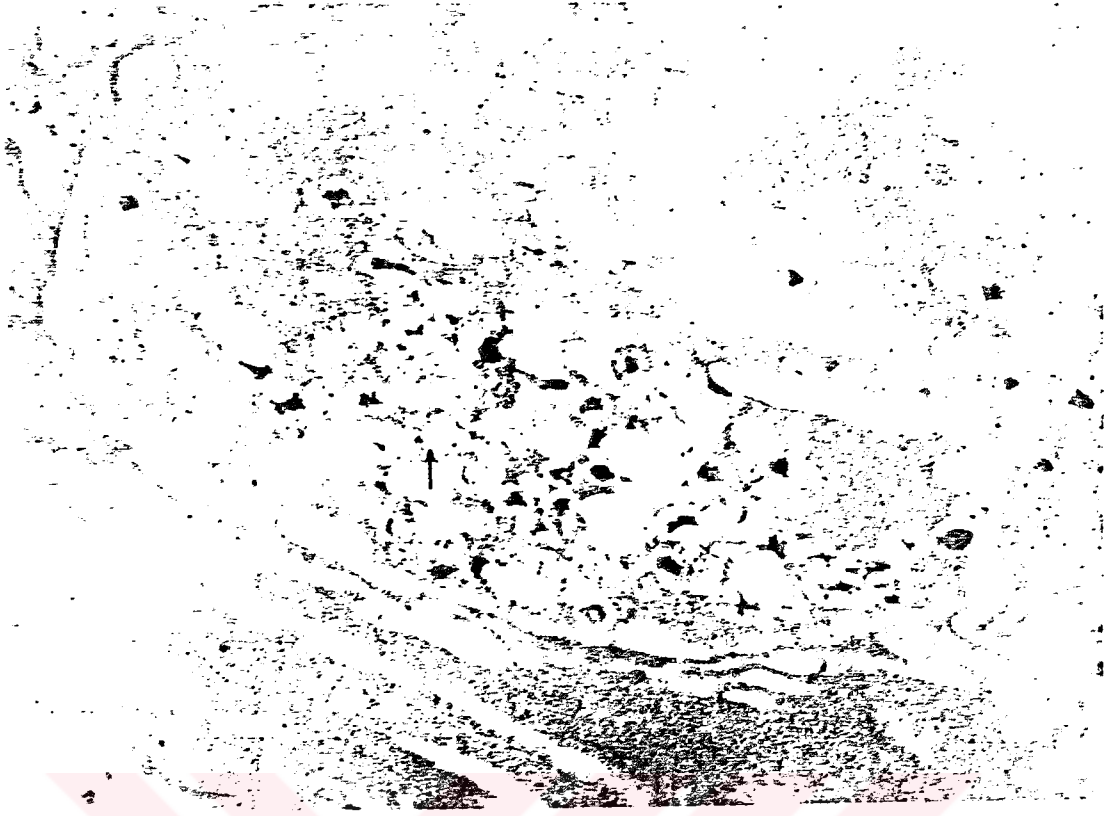
Resim 39: Kontrol grubuna ait pilor mukozasında çift boyama yani önce in situ hibridizasyon, daha sonra immunohistokimya uygulaması ile somatostatin mRNA (↑) ve peptid ürünü (▲) farklı hücrelerde görülmekte. X 1000.



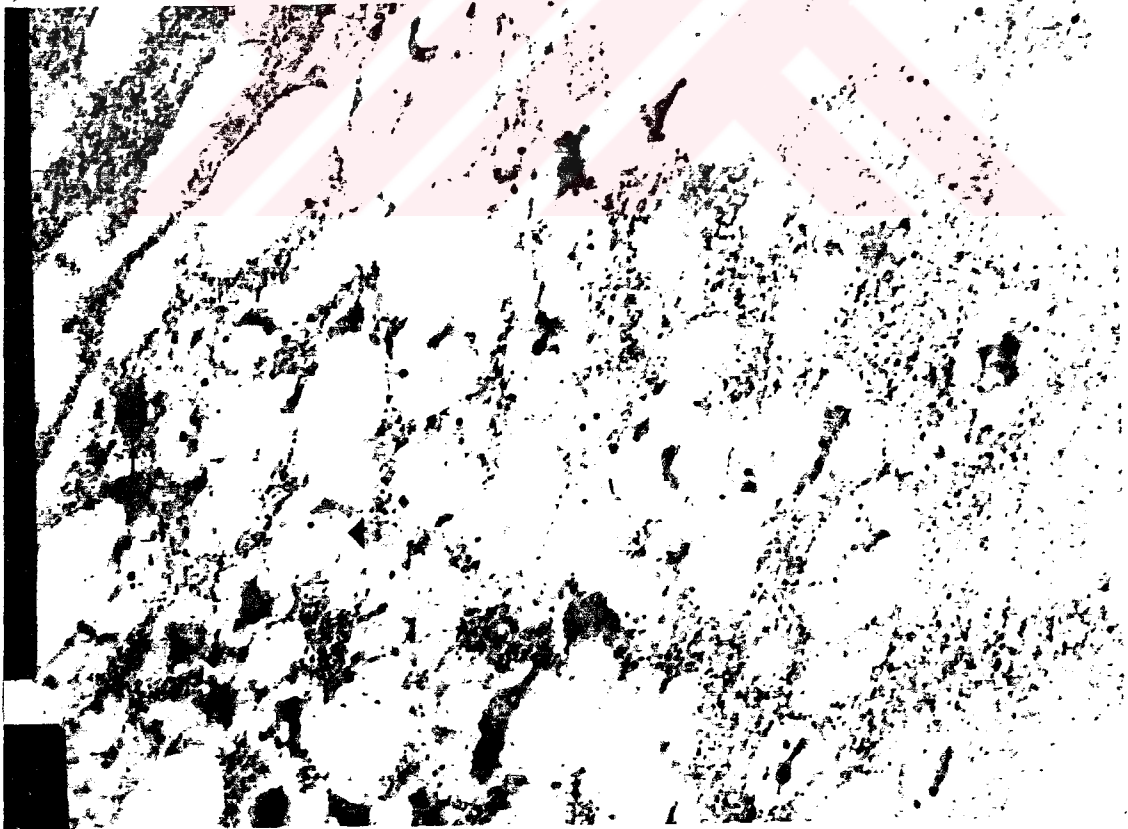
Resim 40: Kontrol grubuna ait pilor mukozası gastrin hücresi. Gastrin için protein A gold tekniği ile işaretlenmiş, immunreaktif gastrin granülleri (←). X 11800.



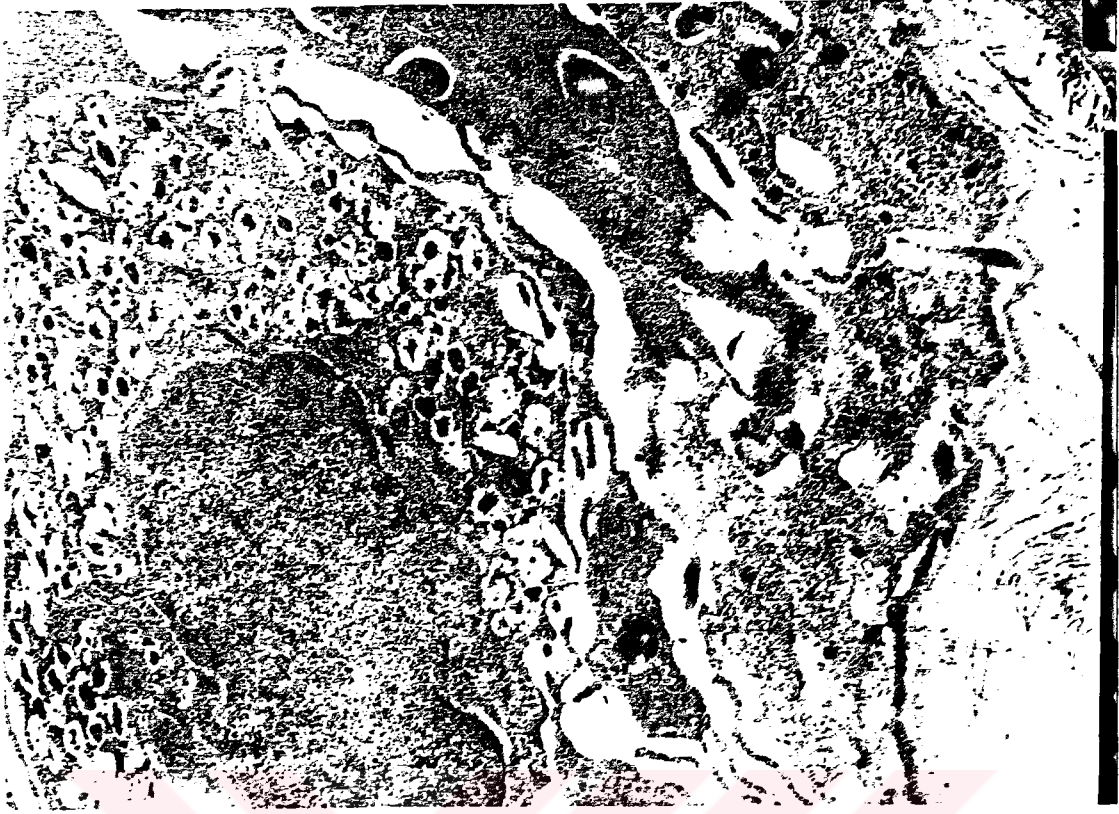
Resim 41: Kontrol grubuna ait gastrin hücresi. Hücrenin bazal ve lateral sitoplazma bölgelerinde farklı elektron yoğunlukta salgı granülleri (↑). Apikal sitoplazmada salgı granülü mevcut olmayıp, mitokondriyonlar (▲) ve granüllü endoplazmik retikulum sistemaları (↑↑) görülmekte. Protein A gold. X 9500.



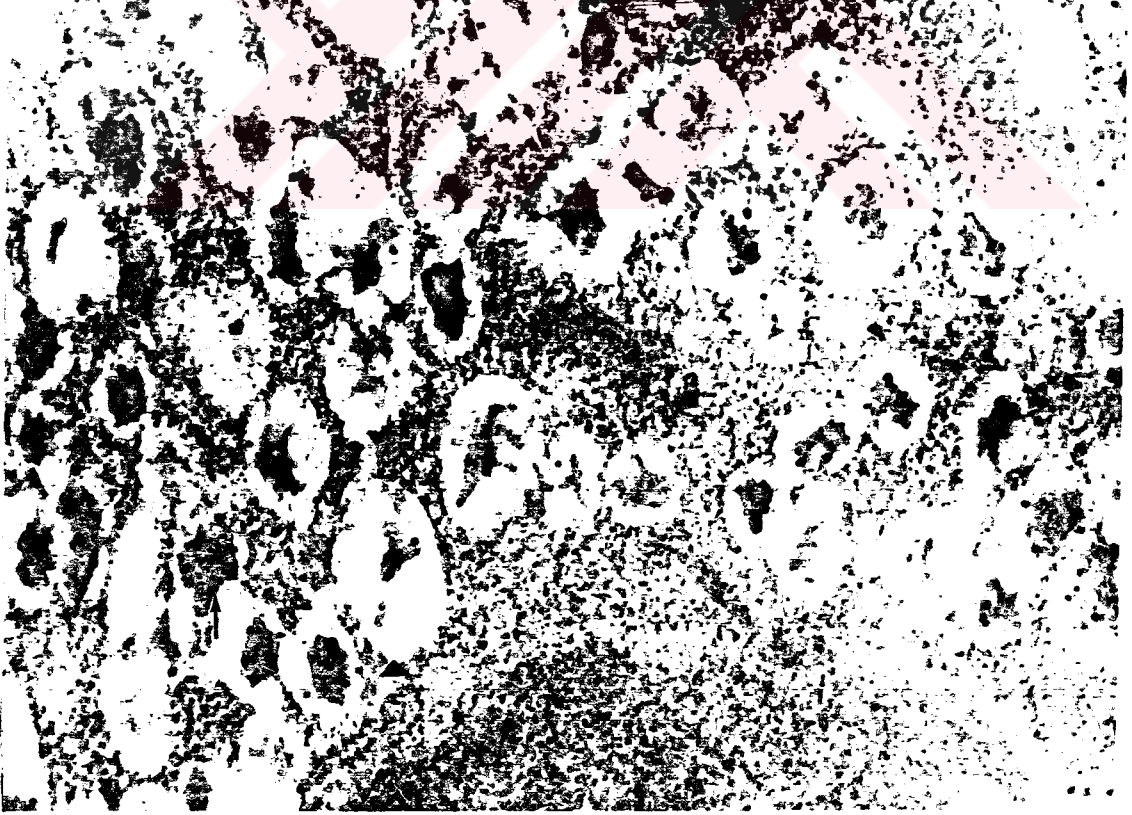
Resim 42: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait immun (+) gastrin hücresinin genellikle boş görünümlü granüllerden (↑) zengin olduğu görülmekte X 14400.



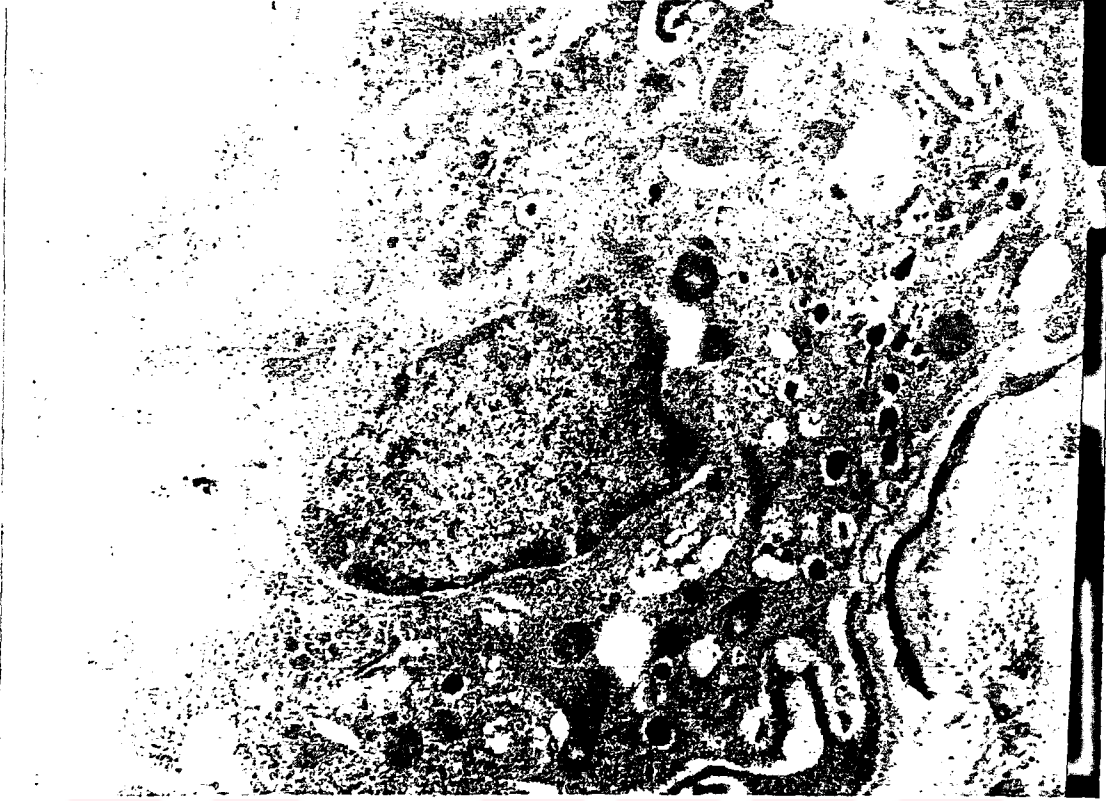
Resim 43: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait gastrin hücresinde boş görünümlü granüllerde tek tek altın bağlandığı (↘), oysa elektron yoğun salgı granüllerin (↑) merkezi kısmında daha çok altın bağlandığı görülmekte. X 28000.



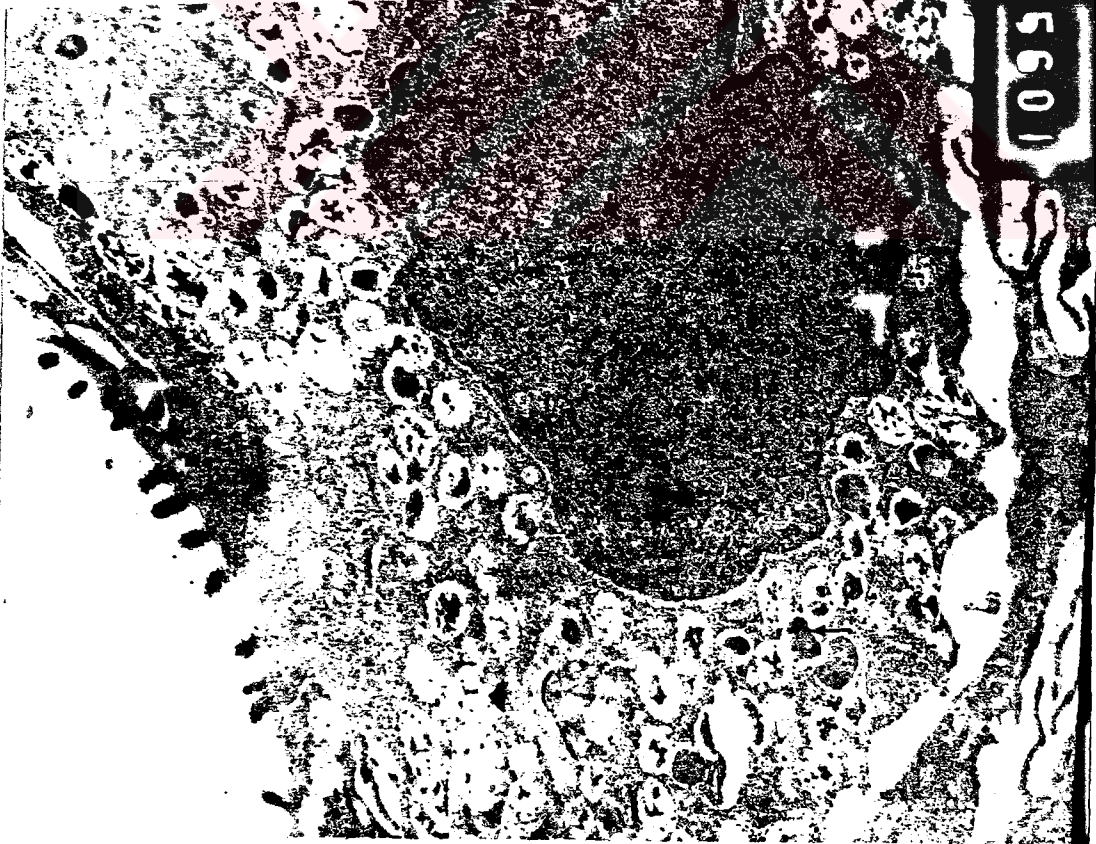
Resim 44: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen gruba ait immunreaktif gastrin hücresinin elektron yoğun salgı granüllerinden (↑) zengin olduğu görülmekte. Protein A gold. X 9500



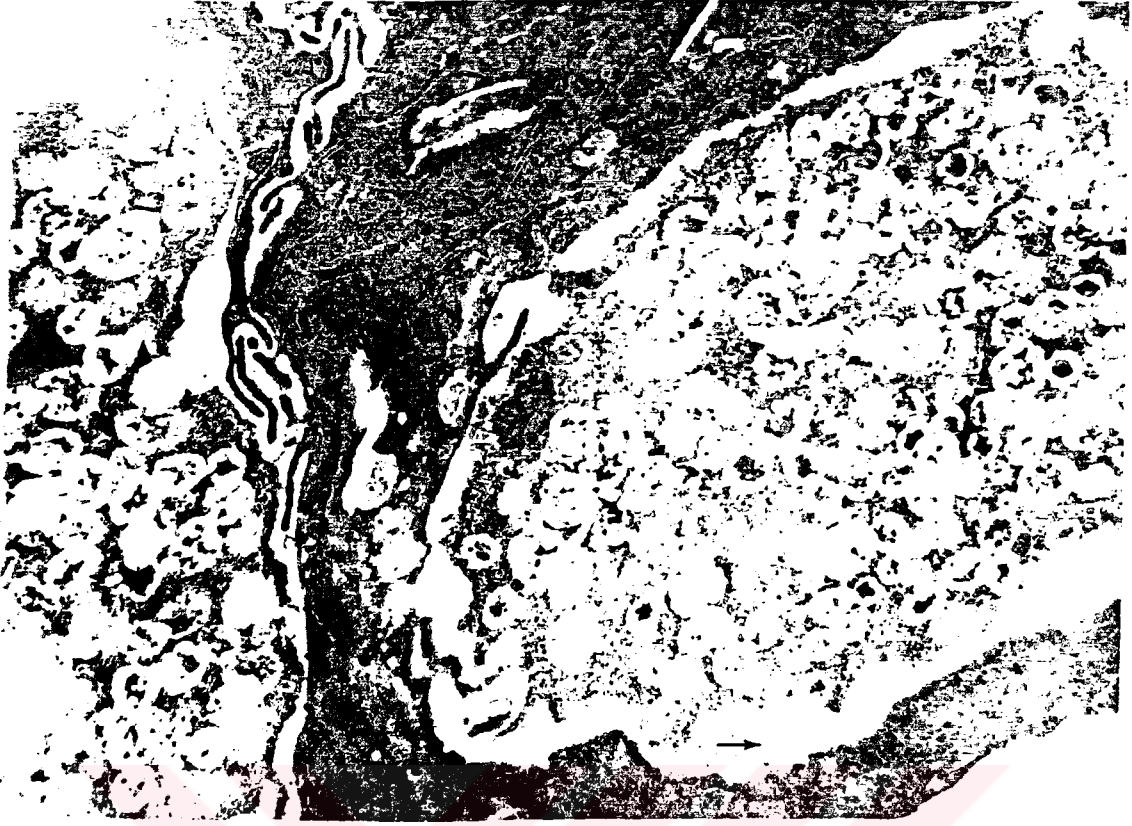
Resim 45: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen gruba ait immunreaktif gastrin hücresinin elektron yoğun salgı granülleri (↑) ve az sayıda köpüğümsü görünümlü salgı granülleri (▲) büyük büyültmede görülmekte. Protein A gold. X 35000.



Resim 46: Dört gün süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen grupta farklı morfolojiye sahip olan hücrede yer yer immunreaktif salgı granülleri (↑) görülmekte. Protein A gold. X 9500.



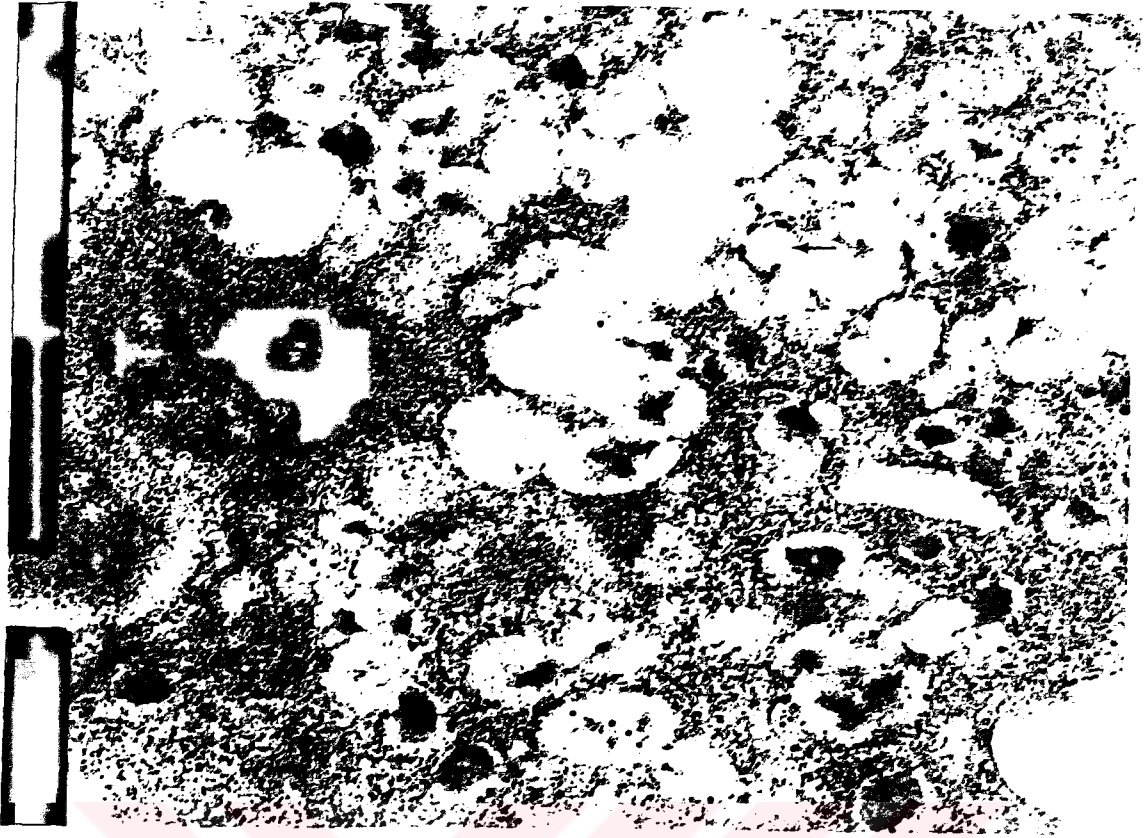
Resim 47: İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait immunreaktif gastrin hücresinde köpüksü görünümlü merkezi kısım içeren salgı granülleri (↔) ile elektron yoğun salgı granülleri (↔) görülmekte. X 9500.



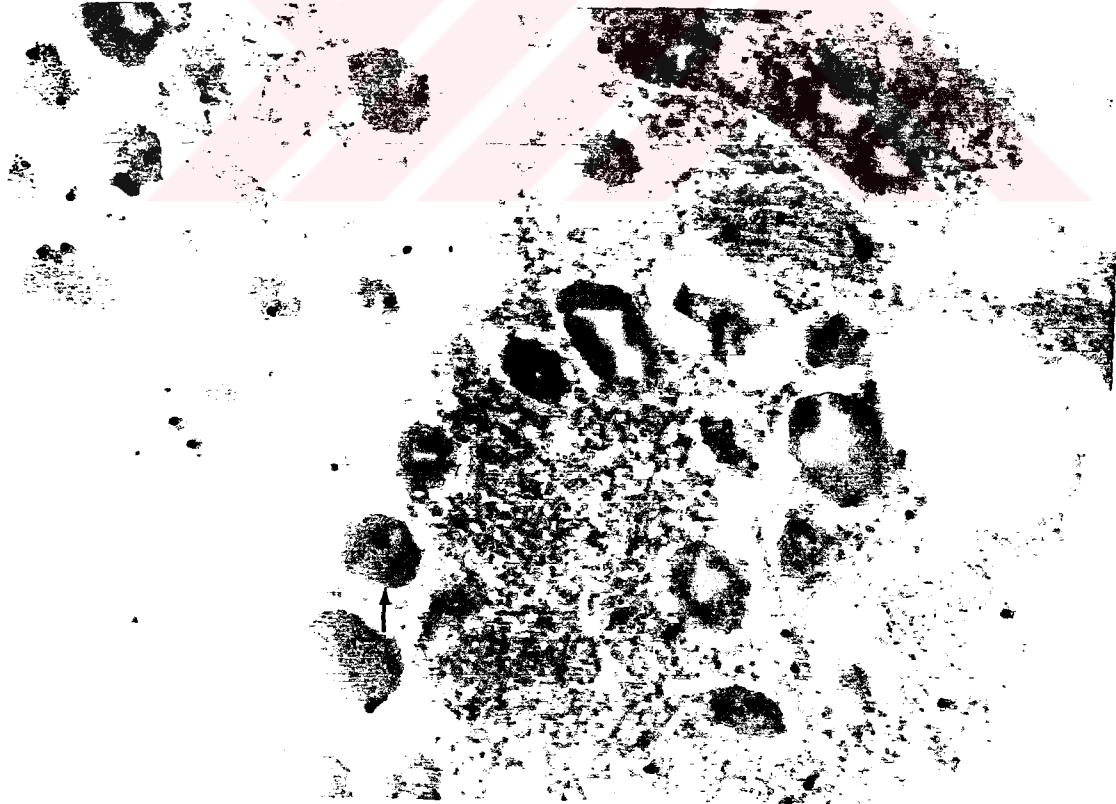
Resim 48: İki ay süre ile 20 mg/kg omeprazol verilen gruba ait gastrin hücresinde köpüğümsü tipde salgı granüllerinin lateral plazma membranında ekzositozu görülmekte (►). İntersellüler sahada genişleme (→). X 13400.



Resim 49: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen grubda zaman zaman birbirine çok yakın yerleşmiş bulunan birden fazla gastrin hücresi görülmekte. X 9500.



Resim 50: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen gruba ait immunreaktif gastrin hücrenin çoğunlukla boş, köpüğümsü salgı granülleri dikkati çekmekte (←). Protein A gold. X 28000.



Resim 51: İki ay süre ile 100 mg/kg omeprazol verilen gruba ait immunreaktif gastrin hücrenin daha çok elektron yoğun salgı granülü (↑) içerdiği görülmekte. Protein A gold. X 40000.



Resim 52: Dört gün süre ile 20 mg/kg omeprazol uygulanan sıçan pilor mukozasında somatostatin hücrelerine benzer görümlü endokrin hücre. Spesifik immün işaretlenme gözlenmedi. Protein A gold. X 15800.

5. TARTIŞMA

Mide asid sekresyonu inhibisyonunun sıçan pilor mukozası gastrin ve somatostatin hücreleri üzerine etkisi radioimmunoassay , nonradyoaktif in situ hibridizasyon ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

Mide lümenindeki asid ortamın gastrin salınmasını inhibe ederken, somatostatin üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (1,120,126,149). H^+,K^+ -ATPaz blokajı ile asid sekresyonun inhibisyonu, domuz ve insan mide mukozasından izole edilmiş H^+,K^+ -ATPaz enziminin in vitro şartlarda omeprazol ile inhibisyonu gözlemlerine dayanmaktadır (39). Çeşitli türlerde asid sekresyonu üzerine omeprazolün inhibitör etkisinin günde bir kere alınan yüksek dozla arttığı ve dört günden sonra artışın durduğu bildirilmiştir. Keza köpeklere iki ay süreyle günde bir kez omeprazol verilmesi ile birkaç gün içinde inhibitör etkinin arttığı açığa çıkarılmıştır (23). Çeşitli canlılarda, günlük 20 mg omeprazol dozu 24 saatin üzerinde asid sekresyonunun baskılanması için gereklidir (87). Sıçanda başlangıç olarak asid sekresyonun maksimum inhibisyonunu oluşturan omeprazolün tek dozunu takiben antisekretuar etkisinin yaklaşık iki gün sürdüğü bildirilmiştir (142).

Allen ve arkadaşları (1), yüksek doz omeprazol ile plazma gastrin konsantrasyonunun altı kattan daha fazla yükseldiğini belirtmektedirler. Çeşitli araştırmacılar, omeprazol tedavisi ile serum gastrin seviyesinde önemli bir artış meydana geldiğini saptamışlardır (36,40,67,72,107). Bu çalışmada da omeprazol verilen tüm deney gruplarında serum gastrin seviyeleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Serum gastrin konsantrasyonlarındaki artış, IHK ile tayin edilen gastrin hücrelerindeki belirgin artışa eşlik etmiştir. Lind ve arkadaşları (87) çalışmalarında, omeprazol tedavisi esnasında plazma gastrin konsantrasyonundaki artışın omeprazolün etkisinden ziyade baskılanmış mide içi asidite ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir.

Sıçan pilor bölgesinde gastrin ve somatostatin arasında resiprokal ilişki olduğu bildirilmiştir (1,73). Uzun süre omeprazol uygulanan hayvanların pilor endokrin hücre popülasyonlarında önemli değişiklikler olduğu yani D hücre sayısının azalması ile birlikte G hücre sayısında artış ve sonuç olarak

G/D oranında belirgin bir artış meydana geldiği belirtilmiştir (1,73,94,135). Bu çalışmada ise, G hücre sayısında artış gözlenmesine rağmen, D hücre sayısında azalma gözlenmemiştir. Aynı şekilde insanda da G/D hücre oranında bu düzeyde bir değişiklik bildirilmemiştir (8,67).

Antrektomi, vagotomi gibi asidi azaltan operasyonlar veya omeprazol, ranitidin gibi asidi inhibe eden ilaçların mide içeriğinin kronik nötralizasyonuna, artmış gastrin içeriği ve G hücre hiperplazisi ile birlikte hipergastrinemiye yol açtığı bildirilmiştir (27,28,94,134). Hipergastrineminin intragastrik pH ve antral gastrin hücre aktivitesi arasındaki negatif feedback'den oluştuğuna inanılmaktadır. 20 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün omeprazol uygulanan gruplarda serum gastrin seviyesinde ve pilor gastrin içeriğinde doza bağlı olarak bulunan artışlar daha önceki araştırmacılarla uyum halindedir.

Kontrol grubuna ait streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile boyanmış pilor kesitleri, 20mg/kg (grup2) ve 100mg/kg (grup 3) omeprazol verilen preparatlar ile karşılaştırıldığında, kontrol grubunda gastrin hücrelerin daha zayıf immünreaktiviteye sahip oldukları ve immunreaktif materyalin genellikle bazolateralde bulunduğu, deneylilerde ise immün boyanma yoğunluğunda artışla birlikte immunreaktif materyalin hücrenin hem bazolateral hem de supranuklear kısmında yani tüm sitoplazmada dağıldığı gözlemlendi. Allen ve arkadaşları (1), on hafta süre ile 400 µmol/kg omeprazol verilen sıçanlarda gastrin hücre sayısında artışın yanısıra, immunreaktif hücrelerin boyanma yoğunluğunda da artıştan söz etmişlerdir. Creutzfeldt ve arkadaşları (28), günlük 40-60 mg/kg omeprazol alan hastaların iki yıllık tedavi süresinden sonra tedavi öncesine göre, pilor gastrin hücrelerinin sayısında ve boyanma yoğunluğunda bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Cadiot ve arkadaşları (21) ise, ³H-timidinle işaretlenmiş gastrin hücre sayısında gördükleri artışın, omeprazol alınmasıyla gastrin hücre üretiminin uyarılmasından dolayı olmadığını, muhtemelen gastrin hücrelerin yaşam sürelerinin uzamış olacağını öne sürmektedirler.

Gastrin mRNA'sı hakkındaki çalışmalar son 6-7 yıldır gelişmiştir. Bu çalışmaların çoğunda moleküler hibridizasyon teknikleri, Northern ve dot blot gibi teknikler kullanılmıştır (17,35,60,61,104,149). Walker ve arkadaşları (143),

³⁵S işaretli cDNA prob ile parafine gömülmüş insan pilor mukozasında sinyal alamadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca bağırsak dokusunda radyoaktif problemlerle, diğer araştırmacılar tarafından da bildirilen, nonspesifik işaretlemeler de söz etmektedirler.

ISH ile direkt mRNA tayini, immunpozitif gen ürünü yokluğunda, aktif gen transkripsiyonunu göstermede oldukça önemlidir. Bu amaçla, çalışmada kullanılan nonradyoaktif ISH tekniği mide dokusu optimizasyonu için modifiye edilerek kullanıldı. Farklı nonradyoaktif ISH yöntemleri ile gastrin mRNA larının dokuda lokalizasyonunu gösteren birkaç çalışma vardır (30,80,81,152). Bu çalışmada ise, ilk defa olarak parafine gömülmüş pilor dokusunda gastrin mRNA'ları digoxigenin işaretli prob kullanılarak gösterildi. Sıçan gastrin mRNA dizisinin açıklanması (44), transkripsiyonel seviyede gastrin sentezinin düzenlenmesi hakkındaki çalışmaları kolaylaştırmıştır. Hücrelerdeki mRNA konsantrasyonları hem sentez hızı hem de yıkılma hızı ile tayin edilmesine rağmen, total spesifik mRNA konsantrasyonları sentez hızını ifade etmektedir. Peptid sentezi uyaranlarının, artan transkripsiyon ile birlikte hücresel mRNA oluşumunu artırdığı ve mRNA yıkımında ise değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (149). Polizom yapısının korunması ile gastrin mRNA'sı stabilize edilir. Bazı vakalarda hücresel mRNA'da hızlı artış mRNA stabilitesi ile sağlanmaktadır. Omeprazol tedavisine cevaben "nuklear run-off" sonuçları artan gen transkripsiyonu ile gastrin mRNA üretiminin arttığını göstermiştir (149).

Brand ve Stone (17), Wu ve arkadaşları (149), gastrin sentezindeki artışın yanı sıra somatostatin sentezindeki azalışın, dokudaki mRNA konsantrasyonlarına da yansıdığını bildirmişlerdir. Omeprazol ile meydana gelen aklorhidrinin duodenal gastrin mRNA seviyelerini etkilemeksizin, pilor gastrin gen ekspresyon artışını uyardığı belirtilmiştir (17). Wu ve arkadaşları (149), dört gün süreyle omeprazol verilen sıçanlarda gastrin mRNA artışını bildirmektedirler. Tüm deney gruplarına ait ISH yöntemi ile hazırlanmış pilor kesitleri incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla gastrin mRNA sinyali içeren hücrelerin sayıca değişiklik göstermedikleri görüldü. ISH yöntemi ile, sıçan gastrin mRNA sinyallerinin genellikle tüm sitoplazmada bazen de bazolateralde yerleşmiş oldukları gözlemlendi. Buna zıt olarak Larsson ve Hougaard (80) ise, insan gastrin mRNA'larının genellikle supranuklear yerleşim gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar elektron mikroskopunda, gastrin hücrelerinin elektron yoğun merkez içeren salgı granüllerinin olgunlaşmamış granüller olduğunu ve her gastrin hücresinde gastrin 34'ün proteolitik olarak gastrin-17'ye ayrıldığı hipotezini ileri sürmüşlerdir (43,45,139). Çift immunogold işaretleme ile elektron yoğun merkez içeren salgı granüllerinin sadece gastrin-34 immunreaktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (139). Bu çalışmada özellikle G-17 için spesifik olan gastrin antikoru kullanıldı ve genellikle elektron yoğun merkez içeren salgı granüllerinin daha çok sayıda altın partikülü ile işaretlenmiş olduğu görüldü. Boş ve köpüksü görünümlü salgı granüllerinin ise daha az altın bağladığı veya hiç altın bağlamadığı gözlemlendi. Tüm kontrol ve deney grubuna ait gastrin hücrelerinde farklı morfolojiye sahip elektron yoğun, az elektron yoğun, boş ve köpüksü görünümlü salgı granülleri mevcuttu. İmmunogold yöntemi uygulanan deney gruplarında gastrin hücreleri kontrollere kıyasla gastrin sentez ve sekresyonunun arttığını destekleyen ultrastrüktürel özelliklere sahipti.

Somatostatinin çeşitli dokularda gastrin dahil çok sayıda regülatör peptidin salınmasını ayarlama rolü olduğu belirtilmiştir (14,38,106). Somatostatinin mide asid sekresyonunun kontrolünde rol oynadığı bildirilmiştir (14,86,122,130). Morfolojik çalışmalar somatostatin hücrelerinin hem pilor gastrin hücreleri hem de fundus parietal hücreleri ile yakın ilişkide olduğunu göstermiştir (3,77,98). Pilor D hücrelerinin G hücrelerine doğru uzanan sitoplazmik uzantılara sahip olduğu ve bu şekilde somatostatinin inhibe edici etkisinin parakrin yoldan gerçekleştiğini ileri süren çalışmalar mevcuttur (3,66,77,79). Somatostatin hücrelerinin, hem direkt olarak parietal hücre ile hem de indirekt olarak gastrin hücrelerinden gastrin salınması ile asid sekresyonunu kontrol ettiği öne sürülmektedir (17,105,119). Bu çalışmada gastrin hücrelerinin diğer endokrin hücrelerle parakrin yakınlaşması izlenmedi.

İn vivo ve in vitro çeşitli modellerde, somatostatinin gastrin salınmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (14,61,119). Brand ve Stone (17), somatostatinin pilor gastrin gen ekspresyonunu düzenlediğinin bulgusu olarak; ekzojen somatostatin verilmesinin omeprazol ile oluşan gastrin mRNA sentez uyarısını önlediğini göstermişlerdir. Kültür ortamına somatostatin antikoru katılması ile pilor somatostatininin immünonötralizasyonuna cevap olarak gastrin mRNA

seviyesinde önemli artış meydana geldiği, ayrıca peptid salınmasının da arttığı bildirilmiştir (60). Kısa süreli omeprazol tedavisi, somatostatin aktivitesini etkilemeden önce gastrin hücre aktivitesinde değişiklik oluşturduğunu göstermiştir. Bulgularımıza paralel olarak Koop ve arkadaşları (64), yedi gün omeprazol tedavisinin, uyarılmış somatostatin salınmasında bir azalma olmaksızın artmış gastrin salınmasını bildirmişlerdir. 20 mg/kg iki ay süre ile omeprazol verilen sıçanlarda, somatostatin hücre sayısı kontrollere göre artmıştı. Oysa diğer gruptaki bulgularımız, aklorhidrinin somatostatin hücrelerinin sentez ve salınmasında önemli değişiklik oluşturmadığını göstermektedir. On hafta süre ile omeprazol verilen perfüze sıçan midesinde somatostatin salınmasının azaldığı bildirilmiştir (37). Pilor gastrin hücre aktivitesindeki artışın azalmış somatostatin konsantrasyonu veya salınması ile ilgili olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (63,72).

Omeprazolün düşük dozlarının, somatostatin ve gastrin konsantrasyonlarında önemli değişiklik oluşturmadığı ileri sürülmektedir. Allen ve arkadaşları (1), düşük doz omeprazol tedavisiyle, sıçanlarda somatostatin içeriğinde değişiklik olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca Creutzfeldt ve arkadaşları (27), günde iki kez 40 µmol/kg iki ay süre ile omeprazol verilen sıçanların korpus mukozasındaki somatostatin hücrelerin sayısında kontrollere göre bir artış olduğunu bildirmişlerdir. İnsanlarda vagatomi ve piloroplasti gastrinde küçük fakat önemli artış meydana getirirken, somatostatin gen ekspresyonunda değişiklik meydana getirmediği bildirilmiştir (149). Duodenal ve gastrik ülserli hastalarda D hücre sayısı, kontrol hastalarla aynı bulunmuştur. Bu çalışmalar somatostatin hücrelerin sayısında önemli değişiklik olmadığını bildiren bulgularımıza paralellik göstermektedir (50,69).

İn vivo çalışmalar, midede somatostatin gen ekspresyonunun pH ve özel besinler içeren lümen içi faktörlerle düzenlendiğini göstermektedir. Lümen içi asidin somatostatinin lokal salınmasını uyardığı kavramı, perfüze edilmiş mide ile ilgili çalışmalarla desteklenmektedir (7). Midede D hücrelerinden salınan somatostatinin düşük intragastrik pH varlığında arttığını gösteren deneyler vardır (7,126,138). Düşük intragastrik pH sadece somatostatin sekresyonunu uyarmaz, aynı zamanda D hücre büyümesini de uyandır. 160-400 µmol /kg yani yüksek doz

omeprazol uygulanan sıçanlarda pilor G hücreleri sayısının önemli derecede arttığı aksine pilor D hücre sayısının azaldığı bildirilmiştir (1,9). Larsson ve arkadaşları (72), on hafta süreyle yüksek doz 400 µmol/kg omeprazol ve 350 µmol/kg ranitidin verilen sıçanlarda, kontrollere göre somatostatin hücre sayısında bir fark olmadığını bildirmektedirler. Bu çalışmada yüksek doz ve uzun süre omeprazol uygulanan gruptaki somatostatin hücre sayısı kontrollere göre farklı bulunmadı. Bu somatostatin hücrelerinin farklı plazma gastrin konsantrasyonlarından etkilenmediğini gösterir.

Bu çalışmada parafine gömülmüş mide dokusuna ait kesitler için, daha önceleri bildirilen nonradyoaktif in situ tekniğini modifiye ederek kullandık. İlk defa olarak parafine gömülmüş pilor dokusunda digoxigenin işaretli prob kullanarak, somatostatin mRNA'larını gösterdik. Omeprazol uygulanan tüm deney gruplarına ait pilor kesitlerinde gerek doku gerekse intrasellüler somatostatin mRNA dağılımında belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Wu ve arkadaşları (150), dört gün süre ile omeprazol verilen sıçanlarda slot blot analiz yöntemi ile somatostatin mRNA seviyesinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çift boyama uygulanan kesitlerde somatostatin mRNA ve peptid ürünü aynı hücrede saptanamadı. Somatostatin mRNA sinyalleri genellikle D hücrelerinin bazolateral bölgelerinde görüldü. Kuvvetli immunreaktif materyalde keza bazolateral bölgede yer aldığından ISH için kullanılan BCIP-NBT (substrat-kromojen) reaksiyonu, IHK için kullanılan AEC kromojenin renk reaksiyonunu maskeleyiş olabileceğinden her iki sinyali aynı hücrede görememiş olabiliriz.

Bu çalışmada digoxigenin ile işaretli problarla nonradyoaktif in situ hibridizasyon yöntemi, radyoaktif in situ hibridizasyona alternatif olarak kullanıldı. Çünkü radyoaktif ISH tekniğinde uzun poz zamanına, yarı ömrü sınırlı radyoizotoplara, izotop laboratuvarına ve güvenlik önlemlerine ihtiyaç vardır. Ayrıca gümüş granüller genellikle dağınık olup tam hedef üzerinde bulunmazlar. Bunun aksine nonradyoaktif ISH'dan kısa bir zaman sonra hibridizasyon sinyali genellikle direkt olarak hedef yerin üzerinde bulunur. Problar birkaç yıl saklanabilir. Ayrıca kullanılan digoxigenin sisteminde, digoxigenin sadece bitkilerin yaprak ve çiçeklerinin doğal kaynağıdır. Bu nedenle biyolojik materyalde

antidigoxigenin antikor bağlanması meydana gelmez. Yani dokuda endojen olarak bulunmayan bir steroid olan digoxigenin yanlış pozitif sinyale yol açmaz.

Nonradyoaktif ISH protokolunda genellikle tüm dokular için kullanılan ve kit içerisinde bulunan proteinaz K prehibridizasyon aşamasında çeşitli konsantrasyonlarda (1-10µg/ml) ve çeşitli sürelerde (10 dakika-1saat) denendi ve yoğun spesifik olmayan zemin boyanması (background) görüldü. Fakat pepsin kullanımı ile proteinaz K ya göre daha düşük background elde edildi. Bu nedenle nonradyoaktif ISH ile mide çalışmalarında proteinaz K yerine pepsin tercih edilmelidir. Ayrıca prehibridizasyon aşamasında HCl muamelesi ve prehibridizasyon tamponuna levamisol eklenmesi endojen alkali fosfatazı inhibe ettiğinden backgroundun düşürülmesine yardımcı oldu. Somatostatin ve gastrin için çeşitli prob konsantrasyonları uygulandı. Genelde önerilen optimum prob konsantrasyonu olan 200ng/ml den başlayarak 600ng/mg ye kadar denendi. Optimum somatostatin prob konsantrasyonu 400ng/ml, gastrin içinse 600ng/ml bulundu.

Sonuç olarak, digoxigenin işaretli prob kullanarak uygulanan nonradyoaktif ISH yöntemi, prehibridizasyon aşamasında background önleyici solüsyonların ilavesi, özellikle proteinaz K yerine pepsin kullanılması, prehibridizasyon tamponuna levamisol eklenmesi, hibridizasyondan sonra uzun yıkama aşamaları ve çok düşük dilüsyonda antidigoxigenin antikorunun kullanılması ile geliştirildi ve somatostatin, gastrin mRNA ları başarılı bir şekilde gösterilebildi.

Bu tekniğin dokuda mRNA içeriğinin lokalizasyonunu basit ve hızlı olarak sağladığı ve çeşitli endokrin hastalıkların araştırılmasında değer taşıyacağı kanısına varıldı.

Ayrıca in situ hibridizasyon ve immunohistokimya yöntemlerinin ardarda uygulanması ile aynı doku kesidinde mRNA ve protein dağılımını karşılaştırma imkanı ortaya çıkmıştır.

Omeprazol ile mide asid inhibisyonunun, sıçan pilor mukozasının G hücre sayısında kontrole göre belirgin bir artışa neden olduğu, D hücre sayısında ise önemli bir değişiklik oluşturmadığı saptandı.

Bu bulgularımız aklorhidri ortamında gastrin ve somatostatinin resiprokal olarak düzenlendiği hipotezini desteklememiştir.

6. ÖZET

Gastrin ve somatostatin gastrointestinal kanalda önemli rolleri olan iki güçlü regülatör peptiddir. Mide somatostatin ve gastrin hücreleri üzerine mide asidinin etkisini gösteren çeşitli çalışmalar arasında tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmada omeprazol ile asid sekresyonu inhibe edilen sıçanların pilor mukozasında, gastrin ve somatostatin hücrelerinde meydana gelen değişiklikler; RIA ile serum gastrin seviyesi, nonradyoaktif in situ hibridizasyon ile mRNA, immunohistokimya ve ultrastrüktürel immünositokimya ile peptid düzeyinde araştırılması amaçlandı.

Sprague-Dawley tipi 200-250 g ağırlığında, 48 adet, dişi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları üç gruba ayrıldı. 1. grup: kontrol grubu olarak iki alt grup halinde düzenlendi (16 hayvan). 2. grup: 20mg/kg/gün omeprazol verilen sıçanlar uygulama sürelerine bağlı olarak iki alt gruba ayrıldı (16 hayvan). Dört gün süre ile omeprazol uygulanan grup (8 hayvan) ve iki ay süre ile omeprazol uygulanan grup (8 hayvan). 3. grup: 100mg/kg/gün omeprazol verilen sıçanlar iki farklı süre için iki alt gruba ayrıldı (16 hayvan). Dört gün süre ile omeprazol uygulanan (8 hayvan) ve iki ay süre ile omeprazol uygulanan grup (8 hayvan). Deney süreleri sonunda tüm sıçanlardan, eter anestezisi altında iken gastrin ölçümü için kan örnekleri alındı ve mide pilor bölgeleri çıkarıldı. Doku örnekleri paraformaldehitde fikse edilip, parafine gömüldü.

Omeprazol verilen tüm deney gruplarında serum gastrin seviyeleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (Kontrol <20mg/kg <100mg/kg). Omeprazol verilen gruplara ait pilor mukozası immunreaktif gastrin hücre sayısında ve immunreaksiyon şiddetinde kontrollere göre artış saptandı. Bu artış 20mg/kg dört gün omeprazol verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı olmayıp diğer tüm gruplarda ise ileri düzeyde ($p < 0.001$) anlamlı idi. Kontrol grubuna ait preparatlarda immunreaktif gastrin hücreleri pilor bezlerinin dip kısımlarında dağınık olarak tek tek yerleşmişlerdi. Deney gruplarında ise immun pozitif gastrin hücreleri pilor bezlerinin dip kısımlarında daha yoğun olmakla birlikte tüm mukozada dağınık olarak gözlemlendi. In situ hibridizasyon yöntemi ile hazırlanmış pilor parafin kesitlerinde digoxigenin

işaretili sıçan gastrin probu kullanılarak gastrin mRNA sinyalleri gösterildi. Kontrol ve tüm deney grupları pilor kesitlerinde gastrin mRNA sinyali içeren hücrelerin genellikle pilor bezlerin üst kısımlarında yer aldıkları gözlemlendi. Gastrin mRNA sinyalleri genellikle hücrenin tüm sitoplazmasında bazen de bazolateral kısmında yerleşmişti. İmmunogold yöntemi uygulanan deney gruplarında gastrin hücreleri, kontrollere kıyasla gastrin sentez ve sekresyonunun arttığını destekleyen ultrastrüktürel özelliklere sahip olarak gözlemlendi.

İmmunreaktif somatostatin hücre sayısında kısa süreli uygulamada kullanılmış olan farklı doz gruplarında ve iki ay süre ile 100mg/kg omeprazol verilen deney grubunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Deney grupları içinde sadece 20mg/kg iki ay omeprazol verilen grupta somatostatin immün pozitif hücre sayısında artış gözlemlendi ($p<0.001$). İmmün pozitif somatostatin hücrelerine pilor bezlerinin 1/3 lük bazal kısmında daha fazla olmak üzere üst kısımlarda tek tek rastlandı. İmmunreaktif materyalin somatostatin hücrelerin genellikle bazolateral bölgesinde ve bazal uzantılarda yer aldığı gözlemlendi. Digoxigenin işaretili somatostatin probu kullanılarak pilor parafin kesitlerinde ilk defa olarak somatostatin mRNA sinyali tesbit edildi. Somatostatin mRNA sinyalleri içeren hücrelerin genellikle pilor bezlerin dip kısımlarında yer aldığı gözlemlendi. Somatostatin mRNA sinyalleri genellikle hücrelerin bazolateral bölgesinde görüldü. Omeprazol verilen sıçanların somatostatin mRNA ve peptid dağılımında kontrollere göre önemli bir fark bulunmadı.

Sonuç olarak digoxigenin işaretili prob kullanarak uygulanan nonradyoaktif in situ hibridizasyon yöntemi, mide mukozasında basit ve hızlı olarak her iki mRNA içeriğinin lokalizasyonunu göstermeyi sağlamıştır. Omeprazol ile mide asid inhibisyonunun, sıçan pilor mukozasının G hücre sayısında kontrole göre belirgin bir artışa neden olduğu, D hücre sayısında ise önemli bir değişiklik oluşturmadığı saptandı. Bu bulgular ile aklorhidri ortamında, gastrin ve somatostatinin resiprokal olarak etkilenmediği sonucuna varıldı.

7. SUMMARY

Gastrin and somatostatin are two potent regulatory peptides having important roles in gastrointestinal tract. There isn't a common thought on the effect of gastric acid on gastrin and somatostatin cells in stomach among various studies. For this reason, in the study it was aimed to investigate the alterations in gastrin and somatostatin cells of rat pyloric mucosa which has an omeprazole-inhibited acid secretion; by determination of serum gastrin level with RIA, by nonradioactive in situ hybridization at mRNA level and by immunohistochemistry and ultrastructural immunocytochemistry at peptide level.

48 female Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g were used. Experimental animals were divided into 3 groups. 1. group : it was designed as control group under two subgroups (16 rats). 2. group : rats treated with 20mg/kg/day omeprazole were divided into two subgroups due to the administration periods (16 rats); omeprazole treated groups for a period of four days (8rats) and for a period of two months (8 rats). 3. group : rats treated with 100mg/kg/day omeprazole were divided into two subgroups for two different treatment periods (16 rats); groups treated with omeprazole for four days (8 rats) and for two months (8 rats). At the end of the experimental period, blood samples were taken from rats under ether anesthesia for gastrin measurement and pylor of the stomach were dissected. Tissue samples were fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin.

Serum gastrin levels in all groups treated with omeprazole showed a statistically significant increase compared to controls (controls <20mg/kg < 100mg/kg). An increase in the number of immunoreactive gastrin cells in pyloric mucosa and an enhancement in intensity of immunoreaction were determined in omeprazole treated groups. While this increase wasn't statistically significant in 20mg/kg for four days treated group, it was highly significant ($p<0.001$) in all the other groups. Immunoreactive gastrin cells of control group were scattered one by one at the base of pyloric glands. On the

other hand immunopositive gastrin cells were scattered all through the mucosa particularly at the base of pyloric glands in experimental group. Gastrin mRNA signals in pyloric paraffin sections were visualized by in situ hybridization using digoxigenin labelled rat gastrin probe. Cells containing gastrin mRNA signal were observed to locate in the upper regions of pyloric glands in pyloric sections of control and all experimental groups. Gastrin mRNA signals were generally localized in the whole cytoplasm but sometimes they were in the basolateral region. Gastrin cells were observed to have ultrastructural properties supporting the increase in gastrin synthesis and secretion compared to controls.

A statistically significant difference in immunoreactive somatostatin cell number couldn't be found in the different dosage groups treated for short periods and treated with 100mg/kg omeprazole for two months when compared to controls ($p>0.05$). There was an increase in somatostatin immunopositive cell number only in for two months 20mg/kg omeprazole treated group($p<0.001$). Immunopositive somatostatin cells were found in the upper regions particularly more in the 1/3 basal region of pyloric glands. Immunoreactive materials were observed to localize generally in basolateral regions and basal process of somatostatin cells. Somatostatin mRNA signals were determined in paraffin sections from pylor for the first time by using digoxigenin labelled somatostatin probe. Cells containing somatostatin mRNA signals were found generally in the base parts of the pyloric glands. Somatostatin mRNA signals were often observed in basolateral regions of the cells. There wasn't a marked difference in somatostatin mRNA and distribution of peptide in omeprazole treated rats compared to controls.

As a conclusion, nonradioactive in situ hybridization method performed by digoxigenin labelled probe, has allowed showing both mRNA contents in gastric mucosa easily and rapidly. Gastric acid inhibition by omeprazole was determined to cause a marked increase in G cell number compared to control and not to result in a significant change in D cell number. These findings suggest that gastrin and somatostatin aren't affected reciprocally in achlorhydric conditions.

8.KAYNAKLAR

- 1- Allen, J.M., Bishop, A.E., Daly, M.J., Larsson, H., Carlsson, E., Polak, J.M. and Bloom, S.R.: Effect of inhibition of acid secretion on the regulatory peptides in the rat stomach. *Gastroenterology* 90 (4) : 900-970, (1986).
- 2- Alumets, J., Sundler, F. and Hakanson, R.: Distribution ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. *Cell Tissue Res.* 185 : 465-479, (1977).
- 3- Alumets, J., Ekelund, M., El Munshid, H.A., Hakanson, R. and Loren, I.: Topography of somatostatin cells in the stomach of the rat : Possible functional significance. *Cell Tissue Res.* 202 : 177-188, (1979).
- 4- Andersson, T., Andren, K., Cederberg, C., Lagerström, P-O.,Lundborg, P. and Canberg, I.: Pharmacokinetics and bioavailability of omeprazole after single and repeated oral administration in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmac.* 29 : 557-563, (1990).
- 5- Andersson, T. and Regardh, C.: Pharmacokinetics of omeprazole and metabolites following single intravenous and oral doses of 40 and 80 mg. *Drug Invest.* 2 (4) : 255-263 , (1990).
- 6- Arimura, A., Sato, H., Dupont, A., Nish, N. and Schally, A.V. : Somatostatin: Abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. *Science* 189 : 1007-1009, (1975).
- 7- Arnold, R., Koop, H., Simson, G., Bedell, R.A. and Creutzfeldt, W.: Luminal secretion of gastrointestinal peptides : Release of gastrin and somatostatin into the gastric lumen in rats. *Front. Hormone Res.* 7 : 72-81, (1980).
- 8- Arnold, R., Hülst, M.V., Neuhof, C.H., Schwarting, H., Becker, H.D. and Creutzfeldt, W. : Antral gastrin producing G cells and somatostatin producing D cells in different states of gastric acid secretion. *Gut* 23: 285-291, (1982).
- 9- Arnold, R., Koop, H., Schwarting, H., Tuch, K. and Willemer, B. : Effect of acid inhibition on gastric endocrine cells. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 125 : 14-19, (1986).
- 10- Arnold, R. and Koop, H. : Omeprazole : Long-term safety. *Digestion* 44 Suppl.1 : 77-86, (1989).

- 11- Axelson, S., Hakanson, R., Rosengren, E. and Sundler, F. : Hypergastrinemia induced by acid blockade evokes enterochromaffin-like (ECL) cell hyperplasia in chicken, hamster and guinea-pig stomach. *Cell Tissue Res.* 254: 511-516, (1988).
- 12- Beesley, J.E.: *Immunochemistry, A practical approach*. Oxford University Press, (1993).
- 13- Betton, G.R., Dormer, C.S., Wells, T., Pert, P., Price, C.A. and Buckley, P. : Gastric ECL-cell hyperplasia and carcinoids in rodents following chronic administration of H₂-Antagonists SK&F 93479 and oxmetidine and omeprazole. *Toxicol. Pathol.* 16 (2) : 288-298, (1988).
- 14- Bloom, S.R., Mortimer, C.H., Thorner, M.O., Besser, G.M., Hall, R., Gomez-Pan, A., Roy, V.M., Russell, R.C.G., Coy, D.H., Kastin, A.J. and Schally, A.V.: Inhibition of gastrin and gastric acid secretion by growth hormone release inhibiting hormone. *Lancet* (Nov 9) : 1106-1109, (1974).
- 15- Bloom, H. : Alterations in gastric mucosal morphology induced by long-term treatment with omeprazole in rats. *Digestion* 35 : Suppl. 1: 98-105, (1986).
- 16- Boehringer Mannheim Biochemica: *Nonradioactive in situ hybridization. Application manual.* 1992.
- 17- Brand, S.J. and Stone, D. : Reciprocal regulation of antral gastrin and somatostatin gene expression by omeprazole-induced achlorhydria. *J. Clin. Invest.* 82 : 1059-1066, (1988).
- 18- Brazeu, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. and Guillemin, R. : Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79, (1977).
- 19- Buchan, A.M.J., Polak, J.M., Solcia, E. and Pearse, A.G.E. : Localization of intestinal gastrin in a distinct endocrine cell type. *Nature* 277 (11 Jan.) : 138-140, (1979).
- 20- Bullock, J., Boyle, J. and Wang, M.B.: *Physiology.* 2nd edition, Williams & Wilkins, 310-315, (1991).
- 21- Cadiot, G., Lehy, T. and Bonfils, S.: Action of somatostatin analogue (SMS 201-995) on the growth-promoting effect resulting from sustained achlorhydria in rat gastric mucosa, with special reference to endocrine cell behaviour. *Eur. J. Clin. Invest.* 18 : 360-368, (1988).
- 22- Canese, M.G. and Bussolati, G.: Immuno-electron-cytochemical localization of the somatostatin cells in the human antral mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* 25 (10) : 1111 - 1118, (1977).

- 23- Carlsson, E., Larsson, H., Mattsson, H., Ryberg, B. and Sundell, G.: Pharmacology and toxicology of omeprazole with special reference to the effects on the gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 21 Suppl. 118 : 31-38, (1986).
- 24- Chen, D., Hakanson, R. and Sundler, F. : Effect of omeprazole-evoked hypergastrinemia on ultrastructure of enterochromaffin-like cells in the stomach of portacaval -shunted rats. *Cell Tissue Res.* 272 : 71-77, (1993).
- 25- Chew, C.S.: Inhibitory action of somatostatin on isolated gastric glands and parietal cells. *Am. J. Physiol.* 245 : G221-G229, (1983).
- 26- Creutzfeldt, W. and Arnold, R. : Somatostatin and the stomach : Exocrine and endocrine aspects. *Metabolism* 27 (9) Suppl.1 ,1309-1315,(1978).
- 27- Creutzfeldt, W., Stöckmann, F., Conlon, J.M., Fölsch, U. R., Bonatz, G. and Wülfrath, M. : Effect of short and long term feeding of omeprazole on rat gastric endocrine cells. *Digestion* 35 Suppl. 1 : 84-97, (1986).
- 28- Creutzfeldt, W., Lamberts, R., Stöckmann, F. and Brünner, G . : Quantitative studies of gastric endocrine cells in patients receiving long-term treatment with omeprazole. *Scand. J. Gastroenterol.* 24 Suppl.166: 122-128, (1989).
- 29- D'adda, T., Pilato, F.P., Lazzaroni, M., Robutti, F., Bianchi-Porro, G. and Bordi, C. : Ultrastructural morphometry of gastric endocrine cells before and after omeprazole. *Gastroenterology* 100 (6): 1563-1570, (1991).
- 30-Davanger, S., Hjelle, O.P., Babaie, E., Larsson, L-I., Haugaard, D., Storm-Mathisen, J. and Ottersen, O.P. : Colocalization of γ -aminobutyrate and gastrin in the rat antrum: An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Gastroenterology* 107: 137-148, (1994).
- 31- Debas, H.T. : Regulation of gastric acid secretion. *Federation Proc.* 36 : 1933-1937, (1977).
- 32-Delvalle, J., Park, J., Chiba, T. and Yamada, T. : Cellular mechanism of somatostatin action in the gut. *Metabolism* 39 (9) Suppl.2: 134-137, (1990).
- 33- De Graef, J. and Woussen-Colle, M.C. : Influence of the stimulation state of the parietal cells on the inhibitory effect of omeprazole on gastric acid secretion in dogs. *Gastroenterology* 91 (2) : 333-337, (1986).
- 34-Dinç, İ., Şavlı, H., Sander, H., Dobrucalı, A., Bal, K., Uzunismail, H., Tuncer, M., Karabulut, L., Yurdakul, İ., Oktay, E. ve Altın, M.: Duodenum ülseri tedavisinde omeprazol. *Endoskopi Dergisi Sayı* 4: 5-8, (1992).

- 35-Dimaline, R., Evans, D., Varro, A. and Dockray, G.J.: Reversal by omeprazole of the depression of gastrin cell function by fasting in the rat. *Journal of Physiology* 433 : 483-493, (1991).
- 36- Eissele, R., Roákoph, B., Koop, H., Adler, G. and Arnold, R. : Proliferation of endocrine cells in the rat stomach caused by drug-induced achlorhydria. *Gastroenterology* 101 (1) : 70-76, (1991).
- 37- Elander, B., Fellenius, E., Leth, R., Olbe, L. and Wallmark, B. : Inhibitory action of omeprazole on acid formation in gastric glands and on H^+,K^+ -ATPase isolated from human gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 21: 268-272, (1986).
- 38- Ertan, A. and Arimura, A.: Somatostatin and the stomach. *Dig.Dis.* 5 : 13-20, (1987).
- 39- Fellenius, E., Beglindh, T., Sachs, G., Obe, L., Elander, B., Sjöstrand, S-E. and Wallmark, B.L. : Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H^+K^+ +) ATPase. *Nature* 29 (12 March), 159-161, (1981).
- 40- Festen, H.P.M., Thijs, J.C., Lamers, C.B.H.W., Jansen, J.M.B.J., Pals, G., Frants, R.R., Defize, J. and Meuwissen, S.G.M. : Effect of oral omeprazole on serum gastrin and serum pepsinogen I levels. *Gastroenterology* 87 (5) : 1030 -1034, (1984).
- 41- Francis, B.H., Baskin, D.G., Saunders, D.R. and Ensink, J. : Distribution of somatostatin-14 and somatostatin-28 gastrointestinal pancreatic cells of rats and humans. *Gastroenterology* 99 (5) : 1283-1291, (1990).
- 42- Fryklund, J., Helander, H.F., Elander, B. and Wallmark, B.: Function and structure of parietal cells after H^+,K^+ -ATPase blockade. *Am. J. Physiol.* 245 : G399-G407, (1988).
- 43- Forssmann, W.G., Feurle, G.E., Yanaihara, N., Helmstaedter, V., Glotzer, J., Büchler, M., Greenberg, J., Tischbirek, K., Lehy, T., Ito, S. and Lichtenberger, L.M. : Ultrastructure and immunocytochemistry of gastrin cells (G cells). *Biomed. Res. Suppl.* 1 : 54-66, (1980).
- 44- Fuller, P.J., Stone, D.L. and Brand, S.J. : Molecular cloning and sequencing of a rat preprogastrin complementary deoxyribonucleic acid. *Mol. Endocrinol.* 1 (4) : 306 - 311, (1987).
- 45- Funata, N., Fukayama, M., Sugano, K. and Koike, M. : Intra-cellular topography of glycine-extended pro-gastrin processing intermediates in human antral mucosa : An electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* 37 : 287-292, (1989).

- 46-Goodman and Gilman's : The pharmacological basis of therapeutics. Eighth Edition. Pergamon Press. 897-912, (1990).
- 47- Greider, M.H., Steinberg, V. and McGuigan, E. : Electron microscopic identifications of the gastrin cell of the human antral mucosa by means of immunocytochemistry. *Gastroenterology* 63 (4) : 572-583, (1972).
- 48-Grossman, M.I.: Physiological effects of gastrointestinal hormones. *Federation Proc.* 36 (7) : 1930-1932, (1977).
- 49- Gu, Z.F., Pradhan, T., Coy, D.H., Mantey, S., Bunnett, N. W., Jensen, R.T. and Maton, P.N. : Actions of somatostatins on gastric smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 262: G432-G438, (1992)
- 50- Hacker, G.W., Bernatzky, G., Graf, A.-H., Hölbling, N., Stilianu, L., Payreder, M.H., Miller, K., Thurner, J. and Adam, H. : Gastrin and somatostatin immunoreactive cells of the antral mucosa in patients with duodenal or gastric ulcers. An immunocytochemical study. *Path. Res. Pract.* 86 : 723-731, (1990).
- 51- Hakanson, R. and Sundler, F. : Proposed mechanism of induction of gastric carcinoids : the gastrin hypothesis. *Eur. J. Clin. Invest.* 20 Suppl.1 : S65-S71, (1990).
- 52- Hakanson, R. and Sundler, F. : Regulation of gastric endocrine cell proliferation. Gastrin, edited by J.H. Walsh. Raven Press, Ltd., New York 307-318, (1993).
- 53- Harty, R.F., Maico, D.G. and McGuigan, J.E.: Postreceptor inhibition of antral gastrin release by somatostatin. *Gastroenterology* 88 (3) : 675-680, (1985).
- 54- Havu, N.: Enterochromaffin-like cell carcinoids of gastric mucosa in rats after life-long inhibition of gastric secretion. *Digestion* 35 Suppl.1 : 42-55, (1986).
- 55- Helander, H.F., Ramsay, C.-H. and Regardh, C.-G. : Localization of omeprazole and metabolites in the mouse. *Scand. J. Gastroenterol.* 20 Suppl.108: 95-104, (1985).
- 56- Helmstaedter, V., Feurle, G.E. and Forssmann, W.G. : Relationship of glucagon-somatostatin and gastrin somatostatin cells in the stomach of the monkey. *Cell Tissue Res.* 177 : 29-46, (1977).
- 57- Im, B.W., Sih, J.C., Blakeman, D.PP. and McGrath, J.P. : Omeprazole, a specific inhibitor of gastric H^+K^+ -ATPase is a H^+ -activated oxidizing agent of sulfhydryl groups. *J. Biol. Chem.* 260 (8) : 4591-4597, (1985).

- 58- Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R.O. : Basic histology. Sixth edition, 290-304, Appleton&Lange, (1989).
- 59-Kanayama, S. and Liddle, R.A. : Somatostatin regulates duodenal cholecystinin and somatostatin messenger RNA. *Am. J. Physiol.* 258: G358-G364, (1990).
- 60- Karnik, P.S., Monahan, S.J. and Wolfe, M.M. : Inhibition of gastrin gene expression by somatostatin. *J. Clin. Invest.* 83 : 367-372, (1989).
- 61- Karnik, P.S. and Wolfe, M.M. : Somatostatin stimulates gastrin mRNA turnover in dog antral mucosa. *J.Biol.Chem.* 265 (5) : 2550-2555, (1990).
- 62-Kayalı, H. : Özel Histoloji 106-109, İstanbul, (1994).
- 63- Koop, H., Schwab, E., Arnold, R. and Creutzfeldt, W.: Effect of food deprivation on rat gastric somatostatin and gastrin release. *Gastroenterology* 82 (5) : 871-876, (1982).
- 64- Koop, H., Willemer, S., Steinbach, F., Eissele, R., Tuch, K. and Arnold, R. : Influence of chronic drug-induced achlorhydria by substituted benzimidazoles on the endocrine stomach in rats. *Gastroenterology* 92 (2) : 406 - 413, (1987).
- 65- Keast, J.R., Furness, J.B. and Costa, M.: Somatostatin in human enteric nerves. *Cell Tissue Res.* 237 : 299-308, (1984).
- 66- Kusumoto, Y. and Grube, D. : Somatostatin (D) cells in the rat pyloric antrum, with special reference to the destination of their cytoplasmic processes. *Biomed. Res.* (3) : 145-151, (1987).
- 67- Lamberts, R., Creutzfeldt, W., Stöckmann, F., Jacobaschke, U., Maas, S. and Brunner, G. : Long term omeprazole treatment in man : Effects on gastric endocrine populations. *Digestion* 39: 126-135, (1988).
- 68- Lamberts, R., Stumps, D., Plümpe, L. and Creutzfeldt, W.: Somatostatin cells in rat antral mucosa : qualitative and quantitative ultrastructural analyses in different states of gastric acid secretion. *Histochemistry* 95 : 373-382, (1991).
- 69- Lamberts, R., Creutzfeldt, W., Strüber, H.G., Brünner, G. and Solcia, E. : Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer disease : Gastrin, endocrine cell growth and gastritis. *Gastroenterology* 104 (5) : 1356-1370, (1993).
- 70-Lamers, C.B.H.W.: Clinical and pathophysiological aspects of somatostatin and the gastrointestinal tract. *Acta Endocrinologia (Copenh) Suppl.* 286 : 19-25, (1987).

- 71- Larsson, H., Carlsson, E., Junggren, U., Olbe, L., Sjostrand, S.E., Scanberg, I. and Sundell, G.: Inhibition of gastric acid secretion by omeprazole in the dog and rat. *Gastroenterology* 85 : 900-907, (1983).
- 72- Larsson, H., Carlsson, E., Mattsson, H., Lundell, L., Sundler, F., Sundell, G., Wallmark, B., Watanabe, T. and Hakanson, R.: Plasma gastrin and gastric enterochromaffin like cell activation and proliferation. *Gastroenterology* 90 (2) : 391-399, (1986).
- 73- Larsson, H., Carlsson, E., Hakanson, R., Mattsson, H., Nilsson, G., Seensalu, R., Wallmark, B. and Sundler, F. : Time-course of development and reversal of gastric endocrine cell hyperplasia after inhibition of acid secretion. *Gastroenterology* 95 (6) :1477-1486, (1988).
- 74- Larsson, H., Carlsson, E., Ryberg, B., Fryklund, J. and Wallmark, B.: Rat parietal cell function after prolonged inhibition of gastric acid secretion. *Am. J. Physiol.* 254: G33-G39, (1988).
- 75- Larsson, H., Hakanson, R., Mattsson, H., Ryberg, B., Sundler, F. and Carlsson, E. : Omeprazole : Its influence on gastric acid secretion, gastrin and ECL cells. *Toxicol. Pathol.* 16 (2) : 267-272, (1988).
- 76- Larsson, L.-I. and Rehfeld, J.F. : Characterization of antral gastrin cells with region specific antisera. *J. Histochem. Cytochem.* 25 (12) : 1317-1321, (1977).
- 77- Larsson, L-I : Somatostatin cells. *Gut Hormones*, Edited by Bloom, S.R. and Polak, J.M., Churchill Livingstone, 350-353, (1981).
- 78- Larsson, L.-I. : Evidence for anterograde transport of secretory granules in processes of gastric paracrine (somatostatin) cells. *Histochemistry* 80 :323-326, (1984).
- 79- Larsson, L-I: Distribution and morphology of somatostatin cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 188 : 383-403, (1985).
- 80- Larsson, L.-I. and Hougaard, D.M. : Combined non-radioactive detection of peptide hormones and their mRNA's in endocrine cells. *Histochemistry* 96 : 375-380 (1991).
- 81- Larsson, L.-I. and Hougaard, D.M. : Sensitive detection of rat gastrin mRNA by in situ hybridization with chemically biotinylated oligodeoxynucleotides :Validation, Quantitation and Double-staining studies. *J. Histochem. Cytochem.* 41 (2) : 157-163, (1993).
- 82- Leclerc, R., Pelletier, E., Puviani, R., Arimura, A. and Schally, A.V. : Immunohistochemical localization of somatostatin in endocrine cells of the rat stomach. *Mol. Cell Endocrinol.* 4 : 257-261, (1976).

- 83- Lee, H., Hakanson, R., Karlsson, A., Mattsson, H. and Sundler, F. : Lansoprazole and omeprazole have similar effects on plasma gastrin levels, enterochromaffin-like cells, gastrin cells and somatostatin cells in the rat stomach. *Digestion* 51: 125-132, (1992).
- 84- Lehy, T., Gres, L. and Castro, E.F. : Quantitation of gastrin and somatostatin cell populations in the antral mucosa of the rat. *Cell Tissue Res.* 198 : 325-333,(1979).
- 85- Leeson, T.S., , Leeson, C-R. and Paporo, A.A. : Text /Atlas of histology W.B. Saunders company. Philadelphia, 421-434, (1988).
- 86- Ligumsky, M., Goto, Y., Debas, H., Yamada, T. : Prostaglandins mediate inhibition of gastric acid secretion by somatostatin in the rat. *Science* 219 (21 Jan) : 301-303, (1983).
- 87- Lind, T., Cederberg, C., Forssell, H., Olausson, M. and Olbe, L. : Relationship between reduction of gastric acid secretion and plasma gastrin concentration during omeprazole treatment. *Scand. J. Gastroenterol.* 23: 1259 -1266, (1988).
- 88- Londong, W., Londong, V., Cederberg, C. and Steffen, H.: Dose-response study of omeprazole on meal-stimulated gastric acid secretion and gastrin release. *Gastroenterology* 85 (6) : 1373-1378, (1983).
- 89- Lucey, M.R. and Yamada, T. : Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. *Diges. Dis. Sci.* 34 (3): March Suppl.5S-13S, (1989).
- 90- Lundell, L., Bishop, A.E., Bloom, S.R., Carlsson, K., Mattsson, H., Polak, J.M. and Ryberg, B. : Gastrin and somatostatin in the rat antrum. The effect of removal of acid-secreting mucosa. *Regul. Pept.* 23 : 77-87, (1988).
- 91- Makhlof, G.M. and Schubert, M.L. : Gastric somatostatin: A paracrine regulator of acid secretion. *Metabolism* 39 (9), Suppl.2 : 138-142, (1990).
- 92- Mario, W.J. : Ion transport studies with H^+,K^+ -ATPase rich vesicles : implications for HCl secretion and parietal cell physiology. *Am. J. Physiol.* 248 : G595-G607, (1985).
- 93- Maton, P.N. : Omeprazole. *N. Eng. J. Med.* 324 (14) :965-975, (1991).
- 94- Mattsson, H., Sundler, F., Carlsson, K. and Hakanson, R. : Antral gastrin and somatostatin cells during long term hypergastrinemia. *Gastroenterology* 100 : A 655, (1991).
- 95- McDonnell, W.M., Scheiman, J.S. and Traber, P.G. : Induction of cytochrome P450IA genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. *Gastroenterology* 103 (5) : 1509-1516, (1992).

- 96- McGuigan, J.E. and Greider, M.H. : Correlative immunochemical and light microscopic studies of the gastrin cell of the antral mucosa. *Gastroenterology* 60 (2): 223-236, (1971).
- 97- McGuigan, J.E. : *Endocrinology*. Edited by Leslie J. De Groot, Chapter 12, W.B. Saunders company, 2742-2747, (1989).
- 98- McIntosh, C., Arnold, R., Bothe, E., Becker, H., Kobberling, J. and Creutzfeldt, W. : Gastrointestinal somatostatin in man and dog. *Metabolism* 27 (9) Suppl.1: (1978).
- 99-McIntosh, C.H.S. : Gastrointestinal somatostatin : Distribution, secretion and physiological significance. *Life Sciences* 37 : 2043-2058, (1985).
- 100-Mortensen, N.J., Morris, J.F. and Owens, C. : Gastrin and the ultrastructure of G cells in the fasting rat. *Gut* 20: 41-50, (1979).
- 101-Montminy, M.R. and Bilezikjian, L.M. : Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328 (9 July) : 175-178, (1987).
- 102-Müller, P., Dammann, H.G., Seitz, H. and Simon, B.: Effect of repeated, once daily, oral omeprazole on gastric secretion. *Lancet*, Jan. 1/8 : 66, (1983).
- 103-Noyan, A. : Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji. Sekizinci basım. 863-877, (1993).
- 104-Noyes, B.E., Mevarech, M., Stein, R. and Agarwal, K.L.: Detection and partial sequence analysis of gastrin mRNA by using an oligodeoxynucleotide probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (4) : 1770-1774, (1979).
- 105-Park, J., Chiba, T. and Yamada, T.: Mechanisms for direct inhibition of canine gastric parietal cells by somatostatin. *J. Biol. Chem.* 262 (29) : 14190-14196, (1987).
- 106-Patel, Y.C., Zingg, H.H., Fitz-Patric, D. and Srikant, C.B. : Somatostatin : Some aspects of its physiology and pathophysiology. *Gut Hormones*, Edited by Bloom, S.R. and Polak, J.M. Churchill Livingstone, 339-347,(1981).
- 107-Pawlikowski, M., Karbownik, M., Lewinski, A., Pisarek, H., Wajs, E. and Szkudlinski, M. : Effect of omeprazole on the number of immunoreactive gastrin and somatostatin cells in the rat gastric mucosa. *Histol. Histopath.* 7: 153-156, (1992).
- 108-Pearse, A.G.E. and Bussolati, G. : Immunofluorescence studies of the distribution of gastrin cells in different clinical states. *Gut* 11:646-648, (1970).

- 109-Penston, J. and Worensley, K.G. : Achlorhydria: Hypergastrinaemia carcinoids -a flawed hypothesis. *Gut* 28 : 488-505, (1987).
- 110-Polak, J.M., Pearse, A.G.E., Grimellius, L., Bloom, S.R. and Arimura, A.: Growth-hormone release-inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells. *Lancet* (May 31) : 1220-1222, (1975).
- 111-Polak, J.M., Bloom, S.R., Bishop, A.E. and McCrossan, M. V.: D cell pathology in duodenal ulcers and achlorhydria. *Metabolism* 27 (9): Suppl.1, 1239-1242, (1978).
- 112-Prichard, P.J., Yeomans, N.D., Mihaly, G.W., Jones, B., Buckle, P.J., Swallow, R.A. and Louis, W.J.: Omeprazole : A study of its inhibition of gastric pH and oral pharmacokinetics after morning or evening dosage. *Gastroenterology* 88 (1) : 64-69, (1985).
- 113-Reichlin, S. : Somatostatin. *N. Eng. J. Med.* 309 (24): 1495-1501, (1983).
- 114-Ross, M.H. and Reith, E.J. : *Histology a text and atlas* 419-423, (1985).
- 115-Rufener, C., Dubois, M.P., Malaisse-Lagae, F. and Orci, L. : Immunofluorescent reactivity to anti-somatostatin in the gastrointestinal mucosa of the dog. *Diabetologia* 11 : 321-324, (1975).
- 116-Ryberg, B., Bishop, A.E., Bloom, S.R., Carlsson, E., Hakanson, R., Larsson, H., Mattsson, H., Polak, J.M. and Sundler, F. : Omeprazole and ranitidine, antisecretagogues with different modes of action, are equally effective in causing hyperplasia of enterochromaffin-like in rat stomach. *Regul. Pept.* 25 : 235-246, (1989).
- 117-Saccomani, G., Helander, H.F., Crago, S., Chang, H.H., Dailey, D.W. and Sachs, G. : Characterization of gastric mucosal membranes. X. Immunological studies of gastric H⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 83 : 271-283, (1979).
- 118-Sachs, G. and Wallmark, B. : The gastric H⁺,K⁺-ATPase : the site of action of omeprazole. *Scand. J. Gastroenterol.* 24 Suppl.166: 3-11, (1989).
- 119-Saffouri, B., Weir, G., Bitar, K. and Makhlof, G. : Stimulation of gastrin secretion from the perfused rat stomach by somatostatin antiserum. *Life Sciences* 25 (20) : 1749-1754, (1979).
- 120-Saffouri, B., Weir, G.C., Bitar, K.N. and Makhlof, G.M.: Gastrin and somatostatin secretion by perfused rat stomach : functional linkage of antral peptides. *Am. J. Physiol.* 238 (6) : G495-G501, (1980).

- 121-Schubert, M.L., Edwards, N.F., Arimura, A. and Makhlouf, G.M. : Paracrine regulation of gastric acid secretion by fundic somatostatin. *Am. J. Physiol.* 252 : G485- G489, (1987).
- 122-Schubert, M.L., Hightower, J. and Makhlouf, G.M.: Linkage between somatostatin and acid secretion : evidence from use of pertussis toxin. *Am. J. Physiol.* 256 : G418-G422, (1989).
- 123-Schubert, M.L. and Makhlouf, G.M. : Neuronal, hormonal and paracrine regulation of gastrin and acid secretion. *Yale J. Biol. Med.* 65 : 553-560, (1992).
- 124-Schubert, M.L. : Neuronal and paracrine regulation of gastrin secretion. *Gastrin*. Edited by Walsh, J.H. Raven Press Ltd., New York, 129-137, (1993).
- 125-Schultzberg, M., Hökfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J.F., Brown, M., Elde, R., Goldstein, M. and Said, S. : Distribution of peptide and catecholamine containing neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea-pig : Immunohistochemical studies with anti-sera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin, cholecystikinin, neurotensin and dopamine β hydroxylase. *IBRO* 689-744, (1980).
- 126-Schusdziarra, V., Harris, V., Conlon, J.M., Arimura, A., Unger, R.: Pancreatic and gastric somatostatin release in response to intragastric and intraduodenal nutrients and HCl in the dog. *J. Clin. Invest.* 62 : 509-518, (1978).
- 127-Schusdziarra, V. : Somatostatin physiological and pathophysiological aspects. *Scand. J. Gastroenterol.* 82 Suppl. 1: 69-84, (1983).
- 128-Sernka, T. and Jacobson, E.: *Gastrointestinal physiology the essentials. Gastrin.* Second Edition, Williams & Wilkins, Baltimore/ London, 48-98, (1983).
- 129-Shamburek, R.D. and Schubert, M.L. : Control of gastric acid secretion : Histamine H₂-receptor antagonist and H⁺,K⁺-ATPase inhibitors. *Gastrol. Pharmacol.* 21(3) : 527-549, (1992).
- 130-Short, G.M., Doyle, J.W. and Wolfe, M.M. : Effect of antibodies to somatostatin on acid secretion and gastrin release by the isolated perfused rat stomach. *Gastroenterology* 88 (4) : 984-988, (1985).
- 131-Skak-Nielsen, T., Holst, J.J., Baldissera, F.G.A. and Poulsen, S.S. : Localization in the gastrointestinal tract of immunoreactive prosomatostatin. *Regul. Pept.* 19 : 183-195, (1987).

- 132-Solcia, E., Rindi, G., Havu, N. and Elm, G.: Qualitative studies of gastric endocrine cells in patients treated long term with omeprazole. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 166 : 129-137, (1989).
- 133-Sölvel, L. : The clinical safety of omeprazole. *Scand. J. Gastroenterol.* 166: 106-110, (1989).
- 134-Sundler, F., Hakanson, R., Carlsson, E., Larsson, H. and Mattsson, H. : Hypergastrinemia after blockade of acid secretion in the rat : Trophic effects. *Digestion* 35 Suppl.1 : 56-69, (1986).
- 135-Sundler, F., Anderson, K. and Mattsson, H. : Administration of omeprazole to rats one year produces reciprocal effects on antral gastrin and somatostatin cells and no effects on endocrine cells in the colon. *Digestion* 56 : 194-198, (1995).
- 136-Tari, A., Wu, S.V., Sumii, M., Sachs, G. and Walsh, J.H.: Regulation of rat gastric H^+/K^+ -ATPase mRNA by omeprazole . *Gastroenterology* 98 (5) Suppl.2: A135, (1990).
- 137-Tielemans, Y., Hakanson, R., Sundler, F. and Willems, G.: Proliferation of enterochromaffinlike cells in omeprazole-treated hypergastrinemic rats. *Gastroenterology* 96 (3) : 723-729, (1989).
- 138-Uvnas-Wallensten, K., Efendic, S. and Luft, R. : Vagal release of somatostatin into the antral lumen of cats. *Acta Physiol. Scand.* 99 :126-128, (1977).
- 139-Varndell, I.M., Harris, A., Tapia, F.J., Yanaihara, N., De Mey, J., Bloom, S.R. and Polak, J.M. : Intracellular topography of immunoreactive gastrin demonstrated using electron immunocytochemistry. *Experientia* 39 : 713-717, (1983).
- 140-Wallmark, B., Jaresten, B.-M., Larsson, H., Ryberg, B., Brandström, A. and Fellenius, E. : Differentiation among inhibitory actions of omeprazole, cimetidine and SCN^- on gastric acid secretion. *Am. J. Physiol.* 245: G64-G71, (1983).
- 141-Wallmark, B., Larsson, H. and Humble, L.: The relationship between gastric acid secretion and gastric H^+,K^+ -ATPase activity. *J. Biol.Chem.* 260 (25) : 13681-13684, (1985).
- 142-Wallmark, B. : Omeprazole : Mode of action and effect on acid secretion in animals. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 166 : 12-18, (1989).
- 143-Walker, F.M., Lehy, T., Bernuau, D.G., Sobhani, I., Bayle, D., Feldmann, G. and Lewin, M.J.M. : Detection of gastrin mRNA in human antral mucosa and digestive endocrine tumors by in situ hybridization : A correlative

- study with immunocytochemistry and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 40 (9) : 1363-1372, (1992).
- 144-Walsh, J.H., Richardson, C.T. and Fordtran, J.S. : pH dependence of acid secretion and gastrin release in normal and ulcer subjects. *J. Clin. Invest.* 55: 462-467, (1975).
- 145-Walsh, J.H. : Gastrin. *Gut Hormones*. Edited by Bloom, S.R. and Polak, J.M. Churchill Livingstone, 163-169, (1981).
- 146-Wass, J.A.H. : *Endocrinology Vol. 1*, Edited by, Leslie J. De Groot. W.B. Saunders Company, 152-162, (1989).
- 147-Wilcox, J. N. : Fundamental Principles of in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 41 (12): 1725-1733, (1993).
- 148-Wolfe, M.M. and Reel, G.M. : Inhibition of gastrin release by gastric inhibitory peptide mediated by somatostatin. *Am. J. Physiol.* 250 : G331-G335, (1986).
- 149-Wu, S.V., Giraud, A., Mogard, M., Sumii, K. and Walsh, J. H.: Effects of inhibition of gastric secretion on antral gastrin and somatostatin gene expression in rats. *Am. J. Physiol.* 258 : G788-G793, (1990).
- 150-Wu, S.V., Sumii, K., Tari, A., Mogard, M. and Walsh, J. H.: Regulation of gastric somatostatin gene expression. *Metabolism* 39 (9) Suppl.2 :125-130, (1990).
- 151-Wu, V., Sumii, K., Tari, A., Sumii, M. and Walsh, J.H.: Regulation of rat antral gastrin and somatostatin gene expression during starvation and after refeeding. *Gastroenterology* 101 :1552-1558, (1991).
- 152-Xerri, L., Monges, G., Guigou, V., Parc, P. and Hassoun, J. : Detection of gastrin mRNA by in situ hybridization using radioactive and digoxigenin-labelled probes : a comparative study. *APMIS* 100 : 949-953, (1992).
- 153-Yılmaz, S. : Elektron Mikroskopi'de "İmmunogold Yöntemi ve Uygulama Alanları ". II. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Bursa 31-32, (1994).

ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında İstanbul'da doğdum. İlk,orta ve lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 1982 yılında başladığım İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans eğitimimi 1986 yılında bitirdim. 1987 şubat ayında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına Yüksek Lisans öğrencisi olarak girdim. 1989 yılında "Farelerin tuba uterina'sında farklı hormonal etkilerle gözlenen morfolojik değişiklikler " konulu tezle yüksek lisans programını tamamlayıp doktora programına başladım. 1992 ve 1995 yıllarında üçer aylık sürelerle MRC Molecular Neuroscience Group, Department of Neurobiology ,Babraham Institute, Cambridge, İngiltere'de moleküler biyoloji teknikleri ile çalıştım. Halen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında çalışmaktayım.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince yardım ve desteğini esirgemeyen, ayrıca bütün olanaklardan yararlanmamı sağlayan hocam Sayın **Prof. Dr. Selma YILMAZER'e,**

İstatiksel değerlendirmelerde yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın **Prof. Dr. Mustafa ŐENOCAK'a** ve Sayın **Doç. Dr. Ahmet Dirican'a,**

Elektron mikroskopunu kullanmam için gereken tüm kolaylığı gösteren Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Güngör ŐATIROĐLU'na,**

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Laboratuvarından yararlanmamı sağlayan Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Hüsrev HATEMİ'ye,**

Değişik süreçlerde yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerinden Sayın **Doç. Dr. Melek ÖZTÜRK'e,**

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm **tüm arkadaşlarıma,** teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca bugüne gelmemde maddi manevi her zaman destek ve ilgilerini gördüğüm **sevgili aileme şükranlarımı** sunuyorum.