

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA ETANOL İLE UYARILAN GASTRİTİN  
ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL  
ESTERİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. DEMİRCAN ÖZBALCI**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. MEHMET İŞLER**

**2007- ISPARTA**

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA ETANOL İLE UYARILAN GASTRİTİN  
ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL  
ESTERİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. DEMİRCAN ÖZBALCI**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. MEHMET İŞLER**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından  
988-TU05 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2007- ISPARTA**

## ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanma safhasına kadar geçen sürede, klinik ve bilimsel uygulamalar ve eğitim sürecimde emeği geçen İç Hastalıkları kliniğinden Prof. Dr. M. NUMAN TAMER, Prof. Dr. M. TUĞRUL SEZER, Prof. Dr. YILDIRAN SONGÜR, Prof. Dr. ÜLKÜ SARITAŞ, Doç. Dr. M. CEM KOÇKAR, Doç. Dr. Ş. ERCAN TUNÇ, Yrd. Doç. Dr. MEHMET ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. E. GÜÇHAN ALANOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Z. DİLEK AYDIN'a ve asistan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç olarak görüyorum. Deneysel çalışmada ve tezin hazırlanması sürecinde bana yardımlarını esirgemeyen başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı Asistanı Dr. MUHARREM KESKİN ve Genel Cerrahi asistanı Dr. HASAN DİNELEK olmak üzere, Patoloji Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. İ. METİN ÇİRİŞ, Yrd. Doç. Dr. NERMİN KARAHAN, Doç. Dr. NİLGÜN KAPUCUOĞLU, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. EFKAN UZ ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Asistanı SEMA SEZGİN GÖKSU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Tez çalışmam esnasında teknik konularda yardımcı olan Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ediyorum. Tezimle uğraşlarım esnasında bana moral ve destek veren sevgili anneme, babama ve kardeşime, çok teşekkür ediyorum. Bahsetmeyi özellikle sona bıraktığım insan ise bu tezin fikir babası, danışmanı ve her aşamada en büyük desteğimdi. Yazım esnasında, yoğun iş temposuna rağmen, sabırla ve eşsiz bir enerjiyle hep yanımda bulunan, düzenli, disiplinli, sistematik çalışmayı ve en önemlisi bilimsel yaklaşımı öğreten çok değerli hocam Prof. Dr. MEHMET İŞLER'i saygıyla selamlıyorum.

# İÇİNDEKİLER

|   |           |
|---|-----------|
| Önsöz   | ii        |
| İçindekiler   | iii       |
| Simgeler ve Kısaltmalar   | v         |
| Şekiller  | vi        |
| Çizelgeler  | vii       |
| <b>1. GİRİŞ</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİ</b>   | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Gastrit Modelleri</b>   | <b>2</b>  |
| <b>2.1.1. Etanol ve Etanolün Uyardığı Gastrit</b>                               | <b>3</b>  |
| <b>2.2. Apoptozis</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.2.1. Apoptozis ve Bcl-2 / bax</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.2.2. Apoptozis ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b> | <b>6</b>  |
| <b>2.3. CAPE</b>  | <b>7</b>  |
| <b>3. MATERYAL ve METOD</b>   | <b>11</b> |
| <b>3.1. Kullanılan Malzemeler</b>   | <b>11</b> |
| <b>3.2. Yöntem</b>  | <b>12</b> |
| <b>3.2.1. Deney Protokolleri</b>  | <b>13</b> |
| <b>3.2.1.1. Birinci Deney Protokolü</b>   | <b>13</b> |
| <b>3.2.1.2. İkinci Deney Protokolü</b>  | <b>13</b> |
| <b>3.2.2. İlaç Uygulamaları ve Hayvanların Yaşamına</b>                         |           |
| <b>Son Verilmesi</b>  | <b>14</b> |
| <b>3.2.3. Lezyonların Makroskopik Değerlendirilmesi</b>                         |           |
| <b>ve Diğer İşlemler</b>  | <b>14</b> |
| <b>3.2.3.1. Makroskopik Değerlendirme</b>                                       | <b>15</b> |
| <b>3.2.3.2. Histolojik Değerlendirme</b>  | <b>15</b> |
| <b>3.2.3.3. İmmunhistokimyasal İncelemeler</b>                                  | <b>16</b> |
| <b>3.2.3.3.1. TNF-<math>\alpha</math>, Bcl-2, Bax, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3</b>     |           |
| <b>Ekspresyonu</b>  | <b>16</b> |
| <b>3.2.3.3.2. Apoptozisin Değerlendirmesi</b>                                   | <b>17</b> |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3.4. Biyokimyasal Ölçümler  | 18 |
| 3.3. İstatistik Analiz  | 18 |
| 4. BULGULAR   | 19 |
| 4.1. Makroskopik Değerlendirme  | 19 |
| 4.2. Histolojik Değerlendirme   | 20 |
| 4.3. MDA  | 20 |
| 4.4. TUNEL  | 21 |
| 4.5. İmmunhistokimya  | 22 |
| 4.5.1. Bax Ekspresyonu  | 22 |
| 4.5.2. Kaspaz-3 Ekspresyonu   | 23 |
| 4.5.3. Kaspaz-8 Ekspresyonu   | 24 |
| 4.5.4. Bcl-2 Ekspresyonu  | 25 |
| 4.5.5. TNF- $\alpha$ Ekspresyonu  | 25 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ  | 26 |
| 5.1. Etanolle Uyarılan Mide Lezyonlarında Oksidatif Stres ve CAPE                             | 26 |
| 5.2. Etanolün Uyardığı Mide Mukoza Lezyonları ve NF- $\kappa$ B                               | 29 |
| 5.3. Etanolün Uyardığı Gastritte Apoptozis ve CAPE  | 29 |
| 5.4. Etanolün Uyardığı Gastritte Proapoptotik ve Antiapoptotik Protein Ekspresyonları ve CAPE | 30 |
| 5.5. Etanolün Uyardığı Gastrit Patogenezinde TNF- $\alpha$                                    | 32 |
| 6. ÖZET   | 34 |
| 7. SUMMARY  | 35 |
| 8. KAYNAKLAR  | 36 |

## Simgeler ve Kısaltmalar

DD: Ölüm Parçaları

DED: Ölüm Effektör Parçaları

CARD: Caspaz Yeniden Oluşum Parçası

DISC: Ölüm İndükleme Kompleksi

TRAIL: Tümör Nekroz Faktör İlişkili Apoptozis Sağlayan Ligand

APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktifleyici Faktör-1

TNF- $\alpha$ : Tümör Nekroz Faktör Alfa

MDA: Malondialdehid

CAPE: Kafeik Asit Fenetil Ester

NF- $\kappa$ B: Nukleer faktör kappa B

NO: Nitrik Oksit

iNOS: Inducible Nitrik Oksit Sentetaz

SF: Serum fizyolojik- % 0.9 NaCl

IP: Intraperitoneal

IG: Intragastrik

$\mu$ mol: Mikromol

Kg: Kilogram

Ml: Mililitre

TUNEL: Terminal deoxytransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling

HE: Hematoksilen & Eosin

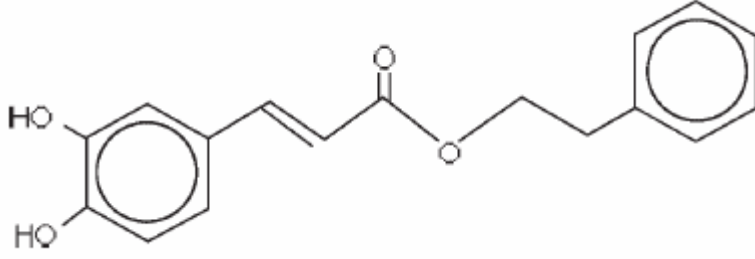
PCOS: Polikistik Over Sendromu

IL-1 $\beta$ : Interlökin-1-beta

COX: Siklooksijenaz

## Şekiller

Şekil 1. CAPE'nin yapısal şekli



## Çizelgeler

**Tablo 1.** Polimorf nüveli lökosit, mukozal ödem, ülser varlığı ve yaygınlığı, nekroz ve intramukozal kanama değerlendirmesi

| PNL          | Ödem    | Ülser   |           |                | Kanama  | Nekroz  |
|--------------|---------|---------|-----------|----------------|---------|---------|
| 0 (Yok)      | 0 (Yok) | 0 (Yok) |           |                | 0 (Yok) | 0 (Yok) |
| 1 (Hafif)    | 1 (Var) | Var     | Şiddet    | 1 (Hafif)      | 1 (Var) | 1 (Var) |
|              |         |         |           | 2 (Orta)       |         |         |
|              |         |         |           | 3 (Şiddetli)   |         |         |
| 2 (Şiddetli) |         |         | Yaygınlık | 1 (% 1- % 10)  |         |         |
|              |         |         |           | 2 (% 11- % 20) |         |         |
|              |         |         |           | 3 (>% 20)      |         |         |

**Tablo 2.** Immunhistokimyasal değerlendirme (Bax, bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-8, TNF- $\alpha$ )

|   |               |
|---|---------------|
| 0 | Boyanma yok   |
| 1 | Hafif         |
| 2 | Orta şiddette |
| 3 | Belirgin      |



**Tablo 3.** Deney gruplarında makroskopik lezyon dağılımı.

| Gruplar                     | Lezyonsuz sıçan Sayısı | Saptanan lezyonun türü |   |   |   |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|---|---|---|
|                             |                        | a*                     | b | c | d |
| <b><u>Birinci Deney</u></b> |                        |                        |   |   |   |
| Normal kontrol              | 10/10                  | -                      | - | - | - |
| Etanol                      | 0/10                   | -                      | 9 | - | 1 |
| CAPE                        | 10/10                  | -                      | - | - | - |
| CAPE+Etanol                 | 0/10                   | -                      | 9 | - | 1 |
| <b><u>İkinci Deney</u></b>  |                        |                        |   |   |   |
| Normal kontrol              | 10/10                  | -                      | - | - | - |
| Etanol                      | 0/9                    | -                      | 8 | - | 1 |
| CAPE                        | 9/9                    | -                      | - | - | - |
| CAPE+Etanol                 | 1/10                   | -                      | 8 | 1 | - |

\*En ağır lezyon türe kaydedilmiştir; a: nokta erezyon, b: lineer erezyon, c: yaygın erezyon d: yaygın hemoraji

**Tablo 4.** Deney gruplarında histolojik lezyon skorları.

| Gruplar        | Lezyon Skoru  |              |
|----------------|---------------|--------------|
|                | Birinci Deney | İkinci Deney |
| Normal Kontrol | 0.40±0.52     | 0.20±0.42    |
| Etanol         | 7.40±1.65*    | 6.89±1.62*   |
| CAPE Kontrol   | 0.80±0.79     | 0.22±0.67    |
| CAPE+Etanol    | 7.10±0.99*    | 6.70±2.67*   |

\*Normal Kontrol ve CAPE Kontrol grubuna göre p<0.001.

**Tablo 5.** Deney gruplarında MDA konsantrasyonları

| Gruplar        | MDA Konsantrasyonu<br>(nmol/mg-protein) |                             |
|----------------|---|-----------------------------|
|                | Birinci Deney                           | İkinci Deney                |
| Normal Kontrol | 24.07±12.57 <sup>a</sup>                | 29.62±14.65 <sup>b, c</sup> |
| Etanol         | 109.63±57.89                            | 101.55±55.78 <sup>d</sup>   |
| CAPE Kontrol   | 26.73±7.97 <sup>a</sup>                 | 25.21±12.13 <sup>c</sup>    |
| CAPE+Etanol    | 88.80±42.63                             | 71.03±41.55                 |

Birinci deneyde, <sup>a</sup> Etanol ve CAPE+Etanol gruplarına göre p<0.001

İkinci deneyde, <sup>b</sup> Etanol grubuna göre p=0.001, <sup>c</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.011,

<sup>d</sup> CAPE Kontrol grubuna göre p=0.001, <sup>e</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.007,

**Tablo 6.** Deney gruplarında mide mukozasında apoptotik hücre sayıları  
(400'lük büyütmede)

|                | Birinci Deney            | İkinci Deney           |
|----------------|--------------------------|------------------------|
|                | Apoptotik hücre sayıları |                        |
| Normal Kontrol | 1.90±0.99 <sup>a</sup>   | 2.10±0.74 <sup>a</sup> |
| Etanol         | 9.50±4.06                | 8.78±3.70              |
| CAPE Kontrol   | 2.40±0.84 <sup>a</sup>   | 2.00±0.87 <sup>a</sup> |
| CAPE+Etanol    | 13.50±4.67               | 10.90±3.31             |

<sup>a</sup> Etanol ve CAPE+Etanol grubuna göre p<0.001; Birinci deneyde, Etanol ve CAPE+Etanol grupları arasında p=0.063.

**Tablo 7.** Deney gruplarında immünohistokimyasal bax ekspresyonu.

|                | Birinci Deney             | İkinci Deney              |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
|                | Bax ekspresyonu           |                           |
| Normal Kontrol | 1.00±0.00 <sup>a, b</sup> | 0.70±0.48 <sup>d, e</sup> |
| Etanol         | 2.60±0.52                 | 2.56±0.53 <sup>f</sup>    |
| CAPE Kontrol   | 1.30±0.67 <sup>c</sup>    | 0.89±0.93 <sup>g</sup>    |
| CAPE+Etanol    | 2.10±0.99                 | 1.60±0.84                 |

Birinci Deney: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p<0.001, <sup>b</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.005; <sup>c</sup> Etanol grubuna göre p=0.001, (CAPE Kontrol ve CAPE+Etanol grubu arasında p=0.076 (ns).)

İkinci Deney: <sup>d</sup> Etanol grubuna göre p<0.001, <sup>e</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.01; <sup>f</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.015; <sup>g</sup> Etanol grubuna göre p=0.002, (CAPE Kontrol ve CAPE+Etanol grubu arasında p=0.055 (ns).)

**Tablo 8.** Deney gruplarında immünohistokimyasal kaspaz-3 ekspresyonu.

|                | Birinci Deney          | İkinci Deney           |
|----------------|------------------------|------------------------|
|                | Kaspaz-3 ekspresyonu   |                        |
| Normal Kontrol | 1.00±0.00 <sup>a</sup> | 1.00±0.00 <sup>d</sup> |
| Etanol         | 1.50±0.53 <sup>b</sup> | 1.44±0.53 <sup>e</sup> |
| CAPE Kontrol   | 1.00±0.00              | 1.00±0.00              |
| CAPE+Etanol    | 1.30±0.67              | 1.20±0.42              |

Birinci Deneyde: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p=0.012, <sup>b</sup> CAPE Kontrol grubuna göre 0.012.

İkinci Deneyde: <sup>d</sup> Etanol grubuna göre p=0.021, <sup>e</sup> CAPE Kontrol grubuna göre 0.028.

**Tablo 9.** Deney gruplarında kaspaz-8 ekspresyonu.

|                | Birinci Deney          | İkinci Deney           |
|----------------|------------------------|------------------------|
|                | Kaspaz-8 ekspresyonu   |                        |
| Normal Kontrol | 1,00±0,00 <sup>a</sup> | 1,00±0,00 <sup>c</sup> |
| Etanol         | 1,40±0,52 <sup>b</sup> | 1,33±0,50              |
| CAPE Kontrol   | 1,00±0,00              | 1,00±0,00 <sup>d</sup> |
| CAPE+Etanol    | 1,20±0,42              | 1,40±0,52              |

Birinci Deneyde: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p=0.029, <sup>b</sup> CAPE Kontrol grubuna göre, p=0.029

İkinci Deneyde: <sup>c</sup> CAPE+Etanol grubuna göre, p=0.029, <sup>d</sup> CAPE+Etanol grubuna göre, p=0.038.

**Tablo 10.** Deney gruplarında TNF- $\alpha$  ekspresyonu.

|                | Birinci Deney             | İkinci Deney              |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
|                | TNF- $\alpha$ ekspresyonu |                           |
| Normal Kontrol | 1.00±0.00 <sup>a, b</sup> | 0.70±0.15 <sup>e, f</sup> |
| Etanol         | 1.60±0.52 <sup>c</sup>    | 1.44±0.53 <sup>g</sup>    |
| CAPE Kontrol   | 1.10±0.32 <sup>d</sup>    | 1.00±0.00 <sup>h</sup>    |
| CAPE+Etanol    | 1.80±0.92                 | 1.50±0.71                 |

Birinci Deneyde: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p=0.023, <sup>b</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.013, <sup>c</sup> CAPE Kontrol grubuna göre p=0.022, <sup>d</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.044

İkinci Deneyde: <sup>e</sup> Etanol grubuna göre, p=0.009, <sup>f</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.010, <sup>g</sup> CAPE Kontrol grubuna göre p=0.028, <sup>h</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.039.

## 1. GİRİŞ

Etanolle uyarılan gastrit, etanolün yol açtığı, mide mukozasında makroskopik olarak erezyon ve hemoraji, mikroskopik olarak ise mukoza hücrelerinde dökülme, mukozal inflamasyon, vazodilatasyon, ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile seyreden klinikopatolojik durumdur. Etanol gastritinde, serbest radikal oluşumu ve sitokinler aracılığı ile oluşan apoptozis yoluyla hücre kaybı meydana geldiği bildirilmiştir (1-4). Etanol % 10'dan düşük konsantrasyonda bu etkilerini nötrofiller aracılığı ile yaparken, % 10'dan yüksek konsantrasyonda direkt hücre hasarı meydana getirmektedir (5, 6). Etanolün uyardığı gastritin önlenmesinde antioksidan özelliği bulunan birçok ajan kullanılmış ve etkili bulunmuştur (7-10). Kafeik Asit (3,4 dihidroksisinnamik asit) Fenetil Ester (CAPE) bal arısı propolisinde bulunan flavonoid benzeri yapıda ve antiinflamatuvar, antioksidan, immun düzenleyici ve apoptozis düzenleyici etkileri çalışmalarla gösterilen bir bileşiktir (11-14). Sıçanlarda etanolle uyarılan akut gastrit modelinde CAPE'nin etkinliği araştırılmamıştır, bu sebeple çalışmamızda etanolle uyarılan deneysel gastrit modelinde CAPE'nin antioksidan ve apoptozisi kontrol edici özelliklerini araştırmayı planladık.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Gastrit Modelleri

Gastrit, mide mukozasının inflamasyonuna verilen isimdir. Akut olarak meydana gelebilir veya kronik bir süreç olarak devam edebilir:

a) Kronik gastrit: Mide mukozasında atrofi ve intestinal metaplazi gelişmesine zemin hazırlayan kronik inflamatuvar değişikliklerle karakterize klinikopatolojik durumdur. İki tipi vardır: Tip A gastrit, mide korpus mukozasını tutan, yaşlılarda daha sık saptanan ve genellikle asemptomatik seyreden bir gastrit formudur. Anti paryetal hücre antikorları pozitifdir, hipo- veya aklorhidri bulunur ve pernisiyoz anemi gibi otoimmün bozukluklarla ilişkilidir. Tip B gastrit ise, başlangıçta genellikle antruma sınırlandırılmış olan, fakat zamanla midenin diğer bölgelerine de yayılma eğilimine sahip, *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrittir.

b) Akut Gastrit: Ani başlayan inflamatuvar değişikliklerle seyreden ve çoğu kez kendini sınırlayarak iyileşmeyle sonuçlanan bir gastrit formudur. Fokal olabileceği gibi, tüm mide mukozasını da tutabilir. Ödem, erezyon ve şiddetli olursa kanamalara yol açabilir. Mikroskopik olarak, lamina propriada kanama, yüzeysel epitel kaybı, nötrofil infiltrasyonu gözlenmektedir (15). Midede pitlerde, epitel rejenerasyonunu da görmek mümkündür. Etiyolojide, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar, aspirin, kortikosteroidler, alkol kullanımı, kemoterapötik ajanlar, üremi, sistemik enfeksiyonlar, iskemi ve şok, stres (cerrahi, yanık, travma...), koroziv madde içimi ve özellikle distal gastrektomi yapılan hastalarda alkalen reflü gastrit rol oynamaktadır (16). Mide mukoza hasarını ise epitele direkt hasar, asit sekresyonunun uyarılması, hidrojen iyonunun “geri diffüzyonu”, mukus katmanlarında bozulma, bikarbonat yapımının azalması, mukozal kan akımının azalması ile sağlarlar (16).

### 2.1.1. Etanol ve Etanolün Uyardığı Gastrit

Etanol, vücuttaki tüm bariyerlerden geçebilen, psikoaktif bir ilaçtır. Dünya’da insanların % 80’inin herhangi bir zaman zarfında tükettiği düşünülmektedir (17). Duodenumdan emilen etanolün % 90’ı alkol dehidrogenaz enzimi ile asetaldehide dönüştürülmekte ve aldehit dehidrogenaz yolu ile asetik asite çevrilerek sitrik asit siklusuna katılmakta veya asetil ko-enzimA’ya çevrilerek metabolize edilmektedir (17). Emilen etanolün kalan % 10’u karaciğerdeki mikrozomal etanol okside edici sistem tarafından elimine edilmektedir.

Ağızdan alınan etanolün mide mukozası üzerindeki zararlı etkisinin 30. dakikada başladığı ve 60. dakikada zirveye ulaştığı saptanmıştır (1). Sıçanlarda yapılan deneylerde, % 10’dan düşük konsantrasyondaki etanolün nötrofil aracılı hücre yıkımı yaptığı, etanol konsantrasyonu % 10’un üzerinde ise direkt toksik etkiyle mukozada damar hasarına yol açarak kanlanmayı bozduğu gözlenmiştir (5, 6). Sıçanlara akut uygulanan etanol, mide mukozası yüzeyel epitel hücrelerinde dökülme, fundik bezlerin üst kısımlarında kayıp, ödem, vazodilatasyon, yaygın hiperemi, hemoraji ve nekroza neden olmakta; mukoza ile submukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonuna yol açmaktadır (3, 4).

Etanolün metaboliti olan asetaldehidin, mide mukozasına direkt toksik etkisi olduğu gösterilmiştir (18). Etanolün mide mukozası toksisitesinde, mide asit salgılanmasını düzenlemesinin de rolü olabilir; düşük konsantrasyonda mide asit salınımını arttırdığı, yüksek konsantrasyonlarda azalttığı bildirilmiştir (19). Düşük konsantrasyondaki etanolün, kolinerjik sistem yoluyla paryetal hücreleri uyardığı, siklik adenosin monofosfat ve histamin salınımına neden olduğu bulunmuştur (5).

Öte yandan, etanolün uyardığı mukozal inflamasyon ve iskeminin neden olduğu oksidatif stresin, hücre hasarlanmasına katkı yaptığı gösterilmiştir (1). Ayrıca, etanolün mide mukozasında apoptozisi uyardığına ilişkin gözlemler bulunmaktadır ve bir sıçan çalışmasında, akut etanol uygulamasının, apoptozisi hızlandırmak suretiyle hücre yıkımını arttırdığı saptanmıştır (2). Başka bir çalışmada, domuz mide mukozası hücre kültürlerine etanol uygulaması sonrası apoptozisin uyarıldığı ve sukralfat tedavisi ile kısmen apoptozisde azalma olduğu gözlenmiştir (20). Bununla birlikte, akut etanol uygulanan sıçanlara, wogonin verildiğinde

apoptozisin arttığını ve böylece gastropati şiddetinin azaldığını bildiren bir çalışma da vardır (21).

Etanolün akut alımı yanı sıra, kronik kullanımı da kronik gastrite sebep olmaktadır; bir çalışmada, kronik alkoliklerin % 24,2'sinde, kronik alkol kullanımı olmayanların ise % 3'ünde kronik atrofik gastrit saptanmıştır (22). Akut etanol alımının etkisine benzer şekilde, bir sıçan çalışmasında kronik etanol kullanımının da apoptozisi arttırdığı bulunmuştur (23).

## 2.2. Apoptozis:

Yunanca'dan gelen bir kelime olan 'apoptozis', "çiçek veya ağaç yaprağının yere düşmesi" anlamına gelmektedir. İlk olarak 19. yüzyılda söz edilmiş olmakla birlikte, kapsamlı tanımını Kerr ve arkadaşları yapmışlar, apoptozisi "mitozun tersi ama tamamlayıcısı" olarak açıklamışlardır (24). Birçok hastalığın patogenezinde uygunsuz apoptozis sonrası hücre sayısında anormal azalma veya daha sık olarak apoptozisdeki kusur sonrası hücrelerin aşırı birikimi yattığı için, bu hastalıkların tedavisinde apoptozisi hedefleyen ajanların kullanılabilceği düşünülmektedir (25).

Apoptozise giden hücrenin sitoplazma ve çekirdeğinde başlangıçta yoğunlaşma ve çözünme olmakta, bunu sitoplazmik membranda "balonlaşma" ve apoptotik "bleb" oluşumu takip etmektedir. Sonunda hücre tamamen parçalanarak, "apoptozom" adı verilen küçük parçacıklara bölünmektedir. Apoptozomların içinde organel parçaları ve parçalanmış çekirdek taneleri bulunmaktadır. Apoptozise uğrayan hücre, makrofajları uyarmak suretiyle apoptozomların fagosite edilmesini sağlamakta ve süreç tamamlanmaktadır (26).

Apoptozis, nekrozdan farklı bir hücre ölümü yoludur; nekroze olan hücrede membran bütünlüğünün kaybolmasını izleyerek, hücre içeriğinin bozulması ve eksudatif inflamasyon gelişmesi söz konusudur. Apoptozis ve nekroz, aynı uyararla aktive olabilmektedir; hücre içi ATP miktarı yeterliyse apoptozis, yetersizse nekroz geliştiği gösterilmiştir (27, 28).

Kaspaz, "*cysteinyll aspartate specific protease*"ın kısaltılmış adıdır; apoptozis sürecinde yer alır ve apoptozisin kimyasal belirteçlerinden biridir. Proenzim halinde



bulunurlar, apoptozis uyarısı geldiğinde çözünerek aktif enzime dönüşürler (27). Günümüzde 14 kaspaz ailesi bulunmuştur. Kaspazlar; *prodomain*, büyük alt parça ve küçük alt parça olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. *Prodomain*; “ölüm parçaları” (DD), “ölüm efektör parçaları” (DED) ve “kaspaz yeniden oluşum parçası”ndan (CARD) meydana gelmektedir. Temel olarak üç gruba ayrılırlar (29):

1- Grup 1: İnflamatuvar kaspazlar (uzun *prodomain* taşırlar): Kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13, 14 bu gruptadır.

2- Grup 2: Başlangıç kaspazlar (uzun *prodomain* taşırlar): Kaspaz-2, 8, 9, 10 bu gruptadır.

3- Grup 3: Effektör kaspazlar (kısa *prodomain* taşırlar): Kaspaz-3, 6, 7 bu gruptadır.

Kaspazların bağlanabileceği 250 kadar substrat vardır; bu substratlar, kaspazların aspartik asit çözünme noktalarına bağlanarak, etkilerini göstermelerini sağlarlar (27). Hücre apoptozisinde, kaspaza bağımlı olmayan yollar da bulunmakla beraber, karakteristik olarak apoptozis, kaspaz aktivasyonu ve bunun sonucunda oluşan hücre içi özgün proteinler yoluyla meydana gelmektedir (30).

Apoptozis, başlangıç, ölüm ve yıkım safhalarına ayrılır. Başlangıç kaspazları, başlangıç kompleksleri adı verilen ve içinde çok sayıda başlangıç kaspaz zimojeni bulunan yapılarda etkinleşmektedir; bunlar da efektör kaspazları uyararak apoptozisi yürütmektedir (31). Apoptozis başlıca iki yoldan yürümektedir:

1- **Ekstresek yolak:** Ölüm reseptörleri aracılı apoptozis adı da verilmektedir. Özellikle immün sistemin iç dengesini korumada önemli roller üstlenmektedir (32). Ölüm reseptörleri, DD ve DED’in bağlanması ile etkinleşirler. Ölüm reseptörlerinden ayrılan Fas (CD95), “ölüm indüklemeye sinyal kompleksi”ni (DISC) oluşturarak, prokaspaz-8’i etkinleştirir. DD ve DED parçaları olan proteinler prokaspaz-8’e bağlanarak, otokatalitik bir reaksiyon oluştururlar ve prokaspaz-8 konsantrasyonu artar (33, 34). Bu artış sonucu, bir efektör kaspaz olan kaspaz-3 etkinleşir. Başka formdaki ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör ilişkili apoptozis sağlayan ligand (TRAIL) ile uyarılarak benzer reaksiyonları geçirirler.

2- **İntrensek yolak:** “Mitokondri aracılı yolak” adı da verilir. Hücre dışı sinyallerle veya DNA hasarı ile etkinleşen yolaktır. Mitokondriden salınan apoptotik proteaz aktive eden faktör-1 (Apaf-1) ve sitokrom c tarafından uyarılır.

Sitokrom c, Apaf-1 ile birleşerek, kaspaz-9'u, o da kaspaz-3'ü etkinleştirerek apoptozisi sağlar. Başlangıç kaspazları, proapoptotik sinyaller (örneğin inflamatuvar sitokinler, DNA hasarı) tarafından aktive edildikten sonra, efektör kaspazları (kaspaz-3-6-7) uyarırlar. Effektör kaspazlar ise nükleer proteinleri uyararak apoptozisi sağlarlar (35, 36).

### **2.2.1. Apoptozis ve Bcl-2/bax:**

İlk kez folliküler B lenfoma'da t (14:18) noktasında bulunan bcl-2'nin, proapoptotik ve antiapoptotik protoonkojenleri bir arada bulunduran bcl-2 ailesinin üyesi olduğu saptanmıştır (26, 37). Bcl-2, temel olarak mitokondriye bağlanarak apoptozisi engeller. Bax ise aynı ailenin proapoptotik bir üyesidir. Bcl-2 ailesinin pro ve antiapoptotik üyeleri bir sinerji içinde çalışarak hücrenin apoptotik sinyale olan duyarlılığını belirlerler (38). Mitokondri, özellikle intrinsek apoptotik yolağın merkezidir; bax, mitokondriye bağlanarak intrinsek yolağı başlatırken, bcl-2, bax'ın aktive olmasını engellemektedir (26).

### **2.2.2. Apoptozis ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- $\alpha$ ):**

TNF- $\alpha$ , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. TNF- $\alpha$ , endotel aktivasyonuna yol açarak, nitrik oksit (NO) salınımını ve inflamasyonu körükler, prokoagülan ortam hazırlar, fibroblastları uyararak kollajen sentezini artırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (39). Bir çalışmada, TNF- $\alpha$  sentezi ve/veya salınımının pentoksifilin, talidomid, deksametazon, veya anti-TNF- $\alpha$  antikoru ile engellenmesinin, sirotik sıçanlarda etanolle uyarılan mide lezyonlarının şiddetini azalttığı gösterilmiş ve TNF- $\alpha$ 'nın sirotik sıçanlarda etanolle

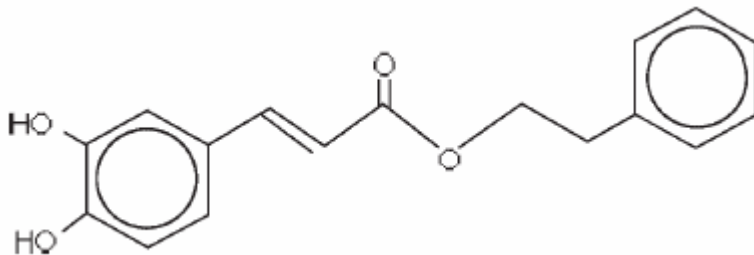
uyarılan mide lezyonlarının patogenezinde katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (39). TNF- $\alpha$  ayrıca, apoptozisin ekstrinsek yolağında, özellikle kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi (26), intrinsek apoptozis yolağında da başlangıç kaspazlarını aktive etmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- $\alpha$ 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler.

### 2.3. CAPE:

CAPE, bal arısı propolisinde bulunan flavonoid benzeri yapıda bir bileşiktir. İnsan vücudundaki normal hücrelere karşı bilinen hiçbir zararlı etkisi bulunmamaktadır (11). CAPE, intraperitoneal uygulandığı zaman yeterli kan konsantrasyonuna ulaşmaktadır (40). CAPE, kafeik asit ve fenetil alkol üzerinden asit ile esterifikasyon ile kimyasal olarak da üretilmektedir (41). CAPE'nin, antiinflamatuvar, antioksidan, immunomodülatuvar ve apoptozisi düzenleyici etkileri gösterilmiştir (11, 12, 42-45).

CAPE, 10 mikromol/kilogram ( $\mu\text{mol/kg}$ ) konsantrasyonda ksantin-ksantin oksidaz sistemini ve reaktif serbest oksijen radikali oluşumunu inhibe etmektedir (11). CAPE, antioksidan özelliğini zincirinde bulunan iki hidroksil grubu ile sağlamaktadır (Şekil 1). CAPE'nin, tirozin kinaz, siklooksijenaz (COX) (özgül olmadan) ve lipooksijenaz aktivitesini baskıladığı ve böylece lipid peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir (12, 46). CAPE'nin antiinflamatuvar etkinliği sıçanlarda diklofenak ve hidrokortizon ile eşdeğer bulunmuştur (40).

#### Şekil 1. CAPE'nin yapısal şekli



Nukleer faktör kappa B (NF-κB), rel mutajen ailesine bağlı bir transkripsiyon faktörüdür; immün sistem, inflamatuvar yolak ve apoptoziste önemli rol oynamaktadır (13, 14). NF-κB'nin regülasyonunda bozulma *graft versus host* hastalığı, toksik şok, kanser ve akut inflamatuvar hastalıklar gibi birçok patolojide rol oynar. Sitoplazmada inaktif olarak bulunan NF-κB proteinleri, bakteriyel yapı taşları, oksidatif stres ve protein sentez inhibitörleri ile aktive olmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri, NF-κB için ikincil habercilerdir (47). CAPE, özgül olarak NF-κB'yi ve oksijen radikallerini inhibe ederek inflamatuvar yolağın işlemlerini önlemektedir.

Reaktif oksijen radikalleri, başlıca araşidonik asit yolağından, ksantin oksidaz sisteminden ve aktive olmuş nötrofillerden türer. Reaktif serbest oksijen radikalleri (özellikle peroksil, hidroksil radikal ve superoksit anyon), kararsız yapıda olup, hızlı şekilde indirgenerek membran lipidlerinin oksidasyonuna, protein denaturasyonuna, DNA bozulmasına ve sülfhidril enzim inaktivasyonuna yol açar; bu durum membran geçirgenliğini arttırarak protein ve nükleik asit yıkımına ve hücre ölümüne neden olur. Serbest radikaller ayrıca hücre içi ve nükleer sinyal yollarını etkileyerek apoptozise yol açabilirler. Bunu önlemek amacıyla vücutta çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır: Enzimatik savunma mekanizmalarını, glutatyon peroksidaz, katalaz ve superoksit dismutaz enzimleri oluşturmaktadır. Enzimatik olmayan savunma mekanizmalarının başlıcaları tokoferoller, karotenler, ubikuinol, glutatyon ve askorbik asittir.

Lipid peroksidasyonunun ilk ürünleri hidroperoksitlerdir; bunlar aldehidlere veya başlangıçtaki madde araşidonik asit ise izoprostanlara çevrilir. Malondialdehid (MDA), serbest oksijen radikallerinin poliansature yağ asitlerini denature etmesinin son ürünüdür (11). Glutatyon peroksidaz serbest radikalleri yakalar, sülfhidril gruplarını sabitleştirir ve hidrojen peroksiti indirger. Superoksit dismutaz, superoksit serbest radikalini, iki hidrojen iyonu ile reaksiyona sokarak hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. Katalaz, hücre içinde, peroksidomlar içinde yer alır, hidrojen peroksidi, su ve oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler.

Ksantin oksidaz, en önemli serbest radikal kaynağıdır ve pürin derivelerinin yıkımı yolağındaki son enzimdir (48). Vücutta, özellikle iskemi esnasında, adenosin trifosfattan hipoksantin oluşur, ardından hipoksantin, ksantine indirgenir. İskemi esnasında bol miktarda sentezlenen ksantin ise, reperfüzyon ile ortama oksijen

sağlanması sonrası, ksantin oksidazın katalizlediği bir reaksiyonla ürik asite çevrilir. Bu reaksiyon esnasında ortaya superoksit anyonu çıkar ve hücre hasarı oluşturur. Ksantin oksidaz inhibitörleri ile ve özellikle CAPE ile yapılan çalışmalar, bu ajanların özellikle iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan özelliğini ortaya koymuştur (36, 49-51). Bir çalışmada, iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçan böbreklerinde CAPE'nin antiinflamatuvar etkinliği araştırılmış ve nötrofil akümülyasyonunu engelleyerek iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (51). Bir başka çalışmada yüksek doz CAPE'nin, sıçan böbreklerinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası antioksidan enzim düzeyini koruduğu ve MDA konsantrasyonundaki yükselmeyi azalttığı saptanmıştır (36). Ayrıca, uzun süreli kullanımda da, diabetik sıçanların kalp hücrelerinde CAPE'nin antioksidan özellikleri bildirilmiştir (50).

NO ile superoksit radikalının ilk biyokimyasal ürünü, DNA'yı okside eden, kısa ömürlü bir serbest radikal olan peroksinitrit (49). CAPE, nitrik oksit sentetaz enzim aktivitelerini engelleyerek ve superoksit dismutaz enziminin harcanmasını önleyerek etkin olmaktadır (52). CAPE'nin, uyarılabilir NO sentetaz (iNOS) aktivitesini, enzim üzerindeki NF-κB bağlantı noktalarını kapatarak inhibe ettiği gösterilmiştir (53).

Watabe ve arkadaşları, *in vitro* kanser hücre kültürlerinde, immunfloresan mikroskop ile apoptozisi incelemişler ve CAPE'nin 48 saat uygulanması sonrasında Fas ölüm reseptörlerini aktive etmek suretiyle, kaspaz aktivasyonu, bax ekspresyonu ve DNA fragmantasyonu yoluyla apoptozisi uyardığını, böylece insan meme kanseri hücrelerinin yaşam süresinde anlamlı derece azalma yaptığını saptamışlardır (13). İnsan kolon kanser ve prostat kanser hücre kültürlerindeki çalışmalarda CAPE'nin apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (54, 55). Sıçan epidermal hücre kültürlerinde malign dönüşüm uyarılarak CAPE'nin apoptozis üzerindeki etkisi araştırılmış ve CAPE'nin apoptozisi uyarması ile malign dönüşüme uğrayan hücreleri saf dışı ettiği saptanmıştır (44).

Öte yandan, CAPE'nin antiapoptotik olabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, sıçan nöron kültüründe deneysel olarak uyarılan apoptozis modelinde, CAPE'nin antioksidan ve kaspaz inhibisyonu ile antiapoptotik özellikleri saptanmıştır (45). Ayrıca CAPE'nin, glukokortikoid reseptör yolağından bağımsız

olarak inflamatuvar hücrelerde apoptozisi önlediği de bildirilmiştir (12). Bu çelişki, kanser hücrelerinde NF-κB oluşumunun daha fazla olması ile açıklanmıştır (35).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmamızda, aşağıdaki malzemeler kullanılmıştır:

- 1- Erişkin erkek Wistar albino sıçan (80 adet)
- 2- Kafeik Asit Fenetil Ester 1 gram (Sigma-Aldrich, St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri)
- 3- Beslenme tüpü 4 F
- 4- Standart rat yemi
- 5- Absolü etanol (32221, Fluka, Almanya)
- 6- Eter
- 7- Bistüri
- 8- Pens
- 9- İnsülin enjektörü
- 10- Toluidin Blue (89640, Sigma-Aldrich, Steinheim Almanya)
- 11- PT Modulle Buffer konsantre 1/100 (TA050-PM1X Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
- 12- Tris Buffer Saline Konsantre Twin 1/20. (TA-999-TT Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
- 13- Hazır Hidrojen Peroksit
- 14- HRP kit 125 mlt. Polivalan (TP 125-HL Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
- 15- DAB kromojen (TA-125-HD Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
- 16- TNF- $\alpha$  antikor (02605, Hystopathology, Pecs, Macaristan)
- 17- Bcl-2 mouse monoklonal antikor ( SC-492, Santa Cruz Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
- 18- Caspase-8 rabbit poliklonal (R-B 1200-P, Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)

- 19- Caspase-3 rabbit poliklonal (R-B 1197, Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
- 20- Bax mouse monoklonal (AB 16837, Abcam, Cambridge, İngiltere)
- 21- Thiobarbitürik asit (88481, Fluka, Seelze, Almanya)
- 22- Bütirik asit (27626, Fluka, Seelze, Almanya)
- 23- Tetra etoksipropan (86570, Fluka, Seelze, Almanya)
- 24- N-butanol (24124, Fluka, Seelze, Almanya)
- 25- Polilizinli lam
- 26- Milimetrik asetat kâğıdı
- 27- Apoptozis kiti (11684817910 In Situ Cell Detection Kit, Roche, Penzberg, Almanya)
- 28- Ultra antikor diluent (TA-125-UD, Labvision, Fremont, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)
- 29- Eppendorf tüpü
- 30- Hassas terazi d= 0,1 mg. hassaslığında (SPB 33, Scaltec, İsviçre)
- 31- Formaldehit
- 32- Steril idrar kabı

### **3.2. Yöntem**

Çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nca onaylandı ve tüm çalışma boyunca etik kurallara uyuldu.

İki deney protokolü uygulandı. Her protokolda 250 - 300 gram ağırlığında, 12-16 haftalık 40'ar adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Deneyler süresince sıçanlar, bir kafeste 5 hayvan olacak şekilde tutuldular. Deneyler, sıçanlar laboratuvara geldikten sonraki bir haftalık uyum sürecinin ardından başlatıldı. Deney süresince hayvanlar standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23 °C) tutuldu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.



### 3.2.1. Deney Protokolleri

#### 3.2.1.1. Birinci Deney Protokolü

Her gruba 10 sıçan alındı. Uygulamalar sabah saat 07.30-08.30 arasında yapıldı.

**Grup 1 (Normal Kontrol):** İlk 7 gün, günde bir kez, 1 mililitre (mL) serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (ip) yoldan verildi. Sekizinci gün, intragastrik (ig) olarak 1 mL SF uygulandı.

**Grup 2 (Etanol):** İlk 7 gün, günde bir kez, 1 mL SF ip yoldan verildi. 8. gün, ig olarak 1 mL etanol uygulandı

**Grup 3 (CAPE Kontrol):** İlk 7 gün, günde bir kez, 10 µmol/kg dozunda CAPE ip yoldan verildi. Sekizinci gün, ig olarak 1 mL SF uygulandı.

**Grup 4 (CAPE+Etanol):** İlk 7 gün, günde bir kez, 10 µmol/kg dozunda CAPE ip yoldan verildi. Sekizinci gün, ig olarak 1 mL etanol uygulandı.

Sekizinci gün uygulamaları sabah saat 07.30- 09.30 arasında gerçekleştirildi. Sekizinci gün, ig SF veya alkol uygulamasından **1 saat sonra** sıçanların yaşamına son verildi ve mideleri çıkarıldı.

#### 3.2.1.2. İkinci Deney Protokolü

Her gruba 10 sıçan alındı. Uygulamalar saat 07.30-08.30 ve 19.30-20.30 arasında yapıldı.

**Grup 1 (Normal Kontrol):** İlk 3 gün, 12 saat arayla günde iki kez, 1 mL SF ip yoldan verildi. 4. gün, ig olarak 1 mL SF uygulandı.

**Grup 2 (Etanol):** İlk 3 gün, günde iki kez, 1 mL SF ip yoldan verildi. 4. gün, ig olarak 1 mL etanol uygulandı.

**Grup 3 (CAPE Kontrol):** İlk 3 gün, günde iki kez, 10 µmol/kg dozunda CAPE ip yoldan verildi. 4. gün, ig olarak 1 mL SF uygulandı.

**Grup 4 (CAPE+Etanol):** İlk 3 gün, günde iki kez, 10 µmol/kg dozunda CAPE ip yoldan verildi. 4. gün, ig olarak 1 mL etanol uygulandı.

Dördüncü gün uygulamaları sabah saat 07.30- 09.30 arasında gerçekleştirildi, ig SF veya alkol uygulamasından 1 saat sonra sıçanların yaşamına son verildi ve mideleri çıkarıldı.

### **3.2.2. İlaç Uygulamaları ve Hayvanların Yaşamına Son Verilmesi:**

Her iki protokolün son gününde, hayvanlara son uygulamalar başlamadan 18 saat önce katı besin, 2 saat önce de su alımları kesildi. İntragastrik uygulamalar 4 F beslenme tüpü ile gerçekleştirildi, tüpün solunum yolunda olup olmadığı, dışta kalan ucu suya batırılarak kontrol edildi. Hayvanların sakrifiye edilmesi genel anestezi altında gerçekleştirildi. Genel anestezi için 1 miligram/kilogram xylazine + 0.5 mL/kg ketamin ip olarak yapıldı. Bu işlem sonrası, ikinci protokolde CAPE Kontrol ve etanol gruplarından birer sıçan eksitus oldu ve bunlar değerlendirmeye alınmadılar.

Genel anestezi sonrası dekapite edilen sıçanların median hattın yapılan insizyonla batinları açılarak, proksimalde özofagus, distalde pilorları klemplenerek mideleri çıkarıldı.

### **3.2.3. Lezyonların Makroskopik Değerlendirmesi ve Diğer İşlemler**

Büyük kurvatur boyunca açılan mideler SF ile yıkanarak makroskopik olarak değerlendirildi. Daha sonra, histolojik ve biyokimyasal incelemeler için doku örnekleri, korpus orta kesimden, dokuya zarar vermeden, tam kat alındı. Biyokimyasal inceleme için alınan örnekler hassas terazi ile tartılarak ağırlıkları kaydedildi ve içi boş Eppendorf tüplerinin içine yerleştirilerek, MDA düzeyinin çalışılacağı güne kadar – 80 °C’de derin dondurucuda saklandı. Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için midenin tüm katlarını içeren örnekler % 10 formaldehit içinde saklandı.

### 3.2.3.1. Makroskopik Değerlendirme

Lezyonların boyutları şeffaf milimetrik asetat kağıdı yardımıyla ölçüldü. Nokta şeklindeki erozyonlar “nokta erozyon,” çizgi şeklindeki erozyonlar “lineer erozyon” olarak tanımlandı. Toplam mide alanının en az yarısını tutan multipl erozif alan bulunması, “yaygın erozyon,” midenin yaklaşık tamamını tutan hemorajik lezyonların varlığı, “yaygın hemoraji” şeklinde tarif edildi.

### 3.2.3.2. Histolojik Değerlendirme

Doku örnekleri, Hematoksilen & Eosin (HE) ve Toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Mide mukoza (yüzey epitel hücreleri) lezyonları intramukozal polimorf nüveli lökositler, nekroz, intramukozal kanama, mukozal ödem, ülser varlığı ve yaygınlığı açısından skorlandı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Polimorf nüveli lökosit, mukozal ödem, ülser varlığı ve yaygınlığı, nekroz ve intramukozal kanama değerlendirmesi

| PNL               | Ödem    | Ülser   |                  |              | Kanama  | Nekroz  |
|-------------------|---------|---------|------------------|--------------|---------|---------|
| 0 (Yok)           | 0 (Yok) | 0 (Yok) |                  |              | 0 (Yok) | 0 (Yok) |
| 1 (Hafif)         | 1 (Var) | Var     | Şiddet           | 1 (Hafif)    | 1 (Var) | 1 (Var) |
| 2 (Şiddetli)      |         |         |                  | 2 (Orta)     |         |         |
|                   |         |         |                  | 3 (Şiddetli) |         |         |
|                   |         |         | 1<br>(% 1- % 10) |              |         |         |
| 2<br>(% 11- % 20) |         |         |                  |              |         |         |
| 3<br>(>% 20)      |         |         |                  |              |         |         |

### 3.2.3.3. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Mide mukoza yüzey epitel hücrelerinde meydana gelen apoptozis ve apoptozis regülasyonunda çeşitli aşamalarda rol alan protein ekspresyonları değerlendirildi. TNF- $\alpha$ , bcl-2, bax, kaspaz-8 ve kaspaz-3 ekspresyonu formol fikse, parafin bloklarından hazırlanan kesitlerde immünohistokimyasal yöntemle araştırıldı. Değerlendirme, mukozada, boyanma şiddeti dikkate alınarak yapıldı. Boyanmanın şiddeti; yok (0), hafif (1), orta (2), belirgin (3) olarak derecelendirildi. Hücrelerde bax, TNF- $\alpha$  ve kaspaz-8 için sitoplazmik boyanma, kaspaz-3 için sitoplazmik ve nükleer boyanma, bcl-2 için sitoplazmik ve membranöz boyanma pozitif boyanma olarak alındı. (Tablo 2).

**Tablo 2.** İmmünohistokimyasal değerlendirme (Bax, bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-8, TNF- $\alpha$ )

|   |               |
|---|---------------|
| 0 | Boyanma yok   |
| 1 | Hafif         |
| 2 | Orta şiddette |
| 3 | Belirgin      |

#### 3.2.3.3.1. TNF- $\alpha$ , Bcl-2, Bax, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu

Formol fiske parafin bloklardan kesitler lizinli lama alınarak, 0,4 mikron kalınlığında kesildi ve 37 °C'lik etüvde bir gece bekletildi, ardından 10 dakika ksilende bekletilerek deparafinizasyon yapıldı. Daha sonra, 5 dakika absolu alkolde, hemen ardından, 5 dakika % 96'lık alkolde bekletilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. İşlem sonrası 3 dakika kadar distile su ile yıkandı. Kesitler, *antijen retrieval* uygulaması için *citrate buffer tamponu* pH: 6.00 içinde 98 °C de 20 dakika boyunca ısıtıldı ve yine aynı tampon içinde 20 dakika oda ısısında soğutuldu. Distile sudan geçirilen kesitlere % 3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) *blocking* damlatılarak 20 dakika inkübasyon yapıldı. PBS ile yıkanarak, Ultra V blok (Labvision-TA-125-UB) ile *blocking* yapılan kesitlere 5 dakika inkübasyon yapıldı. Bu işlem sonrası, kesitler

yıkanmadan, üstündeki blocking solüsyonu silkelenerek *primary antibody* damlatıldı. Bcl-2 (N-19) *Rabbit polyclonal* 1/100 dilüsyon, (Sc-492-Santa Cruz-Amerika Birleşik Devletleri), TNF *alpha clone P/T2 mouse monoclonal*, 1/100 dilüsyon, (Hisyopathology-Macaristan), Bax *rabbit polyclonal* (Ab 16837) 1/100 dilüsyon, (Santa Cruz - Amerika Birleşik Devletleri ), Caspase 3 Ab-4 *rabbit polyclonal*, 1/50 dilüsyon, (Labvisison\_Fremont-Kaliforniya- Amerika Birleşik Devletleri), Caspase 8 Ab-4 *rabbit polyclonal*, 1/50 dilüsyon, (Labvisison-Fremont-Kaliforniya- Amerika Birleşik Devletleri) primer antikorlarıyla sırasıyla 60, 60, 60, 30 ve 30 dakika inkübe edildi. Yapılan işlemler sonrası PBS'te 3 dakika süreyle yıkanan kesitlere *Biotinylated Goat Ant-Polyvalent* (Labvisison TP-125-BN) damlatılarak 20 dakika süreyle inkübasyon uygulandı ve PBS'te tekrar yıkandı. *Large Volume Streptavidin Peroxidase* (Labvisison TS-HR-125) damlatıldıktan sonra 20 dakika süreyle inkübasyon yapıldı ve bir daha PBS'te yıkandı. *DAB Chromogen* damlatılan kesitlere 15 dakika kadar inkübasyon yapıldı ve ardından distile suda 3 dakika süreyle yıkandı. Zıt boyama için Mayers hematoksilen ile kesitler 1 dakika boyandı ve ardından distile suda 3 dakika süreyle yıkandı. Yıkama işlemleri tamamlanan preparatlar % 96'lık alkolden geçirilerek havada kurutuldu. Son olarak ksilene konulan preparatlar Entelan ile kapatıldı.

### 3.2.3.3.2. Apoptozisin Değerlendirmesi

Apoptotik cisimcikler *terminal deoxytransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL) yöntemi ile boyanan kesitlerde ışık mikroskopunda değerlendirildi. Kesitlerde boyanmanın en çok olduğu alandan başlanıp X 400 büyütmede (Olympos CX 41) 10 ardışık alanda apoptotik cisim sayıldı ve ortalamalar alınarak apoptotik indeks belirlendi. TUNEL yöntemi ile boyama aşağıda açıklanan prensipler doğrultusunda yapılmıştır.

Formol fiske parafin bloklardan lizinli lamda 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Dokular 37 °C'de bir gece boyunca etüv içinde bekletildi. Deparafinizasyon amacıyla 20 dakika boyunca ksilen içinde, ardından dehidratasyon işlemi için 20 dakika absolu alkolde tutulan preparatlar *Tris Buffer Saline* (TBS) ile yıkandı.

Proteinaz K (Sigma-Amerika Birleşik Devletleri) ile oda ısısında 20 dakika süre ile inkübe edilerek TBS ile tekrar yıkandı. Preparatlar bunun ardından, Hidrojen peroksit ile oda ısısında 5 dakika süreyle inkübe edilerek TBS ile yıkandı. Yıkanan preparatlar 50 mikrolitre TUNEL miksture solusyonu ile 37 °C'de, karanlık ortamda, *Humidity Chamber* içinde 60 dakika bekletilerek inkübe edildi (Roche), ardından 3 kez TBS ile yıkandı. 50 mikrolitre Converter POD ile 37 °C'de, karanlık ortamda, *Humidity Chamber* içinde 30 dakika bekletilerek inkübe edildi (Roche), yine TBS ile 3 kez yıkandı. DAB solusyonu ile 20 dakika kadar inkübasyon uygulanan preparatlar zıt boyama için distile su ile yıkanarak Metil Green ile oda ısısında 10 dakika boyandı. Absolu alkolde 4 defa yıkanan preparatlar havada kurutuldu ve ksilene konarak Entelan ile kapatıldı.

#### **3.2.3.4. Biyokimyasal Ölçümler**

MDA, tiyobarbiturik asit reaktif metoduyla göre ölçüldü. Tiyobarbiturik asit ile reaksiyona giren MDA, maksimum absorbanı 532 nm olan bir renk kompleksi oluşturmaktadır.

#### **3.3. İstatistik Analiz:**

Veriler ortalama + standard sapma olarak sunuldu. Elde edilen verilerin önemliliğini belirlemede Kruskal Wallis ve gruplar arasındaki verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Makroskopik Değerlendirme:

Her iki deneyde Normal Kontrol ve CAPE Kontrol gruplarında makroskopik olarak lezyon gözlenmedi. Birinci Deney’de, plasebo sonrası etanol uygulanan ve CAPE öntedavisi sonrası etanol uygulanan gruplardaki tüm mide mukozalarında lezyon vardı. Lezyonların çoğu lineer erozyon şeklindeydi; her iki gruptaki birer mide mukozasında yaygın hemoraji gözlemlendi.

İkinci Deney’de, Etanol grubundaki sıçanların tümünün mide mukozasında lezyon vardı; bir sıçanda yaygın hemoraji saptandı. CAPE+Etanol grubunda bir mide mukozasında hiç lezyon yoktu; bu grupta en ağır lezyon olarak bir mide mukozasında yaygın erozyon tespit edildi. CAPE+Etanol grubunda, Etanol grubuna göre, lineer erozyonların sayısı daha azdı ve 4 sıçanda lineer erozyonlara nokta erozyon eşlik ediyordu.

Tablo 3’de, deney gruplarındaki lezyon dağılımı sunulmuştur.

**Tablo 3.** Deney gruplarında makroskopik lezyon dağılımı.

| Gruplar                     | Lezyonsuz sıçan Sayısı | Saptanan lezyonun türü |   |   |   |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|---|---|---|
|                             |                        | a*                     | b | c | d |
| <b><u>Birinci Deney</u></b> |                        |                        |   |   |   |
| Normal kontrol              | 10/10                  | -                      | - | - | - |
| Etanol                      | 0/10                   | -                      | 9 | - | 1 |
| CAPE                        | 10/10                  | -                      | - | - | - |
| CAPE+Etanol                 | 0/10                   | -                      | 9 | - | 1 |
| <b><u>İkinci Deney</u></b>  |                        |                        |   |   |   |
| Normal kontrol              | 10/10                  | -                      | - | - | - |
| Etanol                      | 0/9                    | -                      | 8 | - | 1 |
| CAPE                        | 9/9                    | -                      | - | - | - |
| CAPE+Etanol                 | 1/10                   | -                      | 8 | 1 | - |

\*En ağır lezyon türe kaydedilmiştir; a: nokta erezyon, b: lineer erezyon, c: yaygın erezyon d: yaygın hemoraji

#### 4.2. Histolojik Değerlendirme:

Histolojik olarak her iki deneyde de CAPE öntedavisinin etanolün uyardığı mikroskopik lezyonları engellemediği görüldü. Histolojik lezyon skorları Tablo 4’de sunulmuştur.

**Tablo 4.** Deney gruplarında histolojik lezyon skorları.

| Gruplar        | Lezyon Skoru  |              |
|----------------|---------------|--------------|
|                | Birinci Deney | İkinci Deney |
| Normal Kontrol | 0.40±0.52     | 0.20±0.42    |
| Etanol         | 7.40±1.65*    | 6.89±1.62*   |
| CAPE Kontrol   | 0.80±0.79     | 0.22±0.67    |
| CAPE+Etanol    | 7.10±0.99*    | 6.70±2.67*   |

\*Normal Kontrol ve CAPE Kontrol grubuna göre p<0.001.

#### 4.3. MDA

Her iki deney deseninde etanol, mide dokusu MDA konsantrasyonunun artmasına neden oldu. CAPE Kontrol grubunda, CAPE öntedavisini, MDA konsantrasyonunu Normal Kontrol grubuna göre değiştirmede. İkinci Deney deseninde daha belirgin olmak üzere CAPE öntedavisini, etanolün uyardığı MDA konsantrasyonu artışını azalttı, ancak bu azalma istatistik açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 5).



**Tablo 5.** Deney gruplarında MDA konsantrasyonları

| Gruplar        | MDA Konsantrasyonu<br>(nmol/mg-protein) |                             |
|----------------|---|-----------------------------|
|                | Birinci Deney                           | İkinci Deney                |
| Normal Kontrol | 24.07±12.57 <sup>a</sup>                | 29.62±14.65 <sup>b, c</sup> |
| Etanol         | 109.63±57.89                            | 101.55±55.78 <sup>d</sup>   |
| CAPE Kontrol   | 26.73±7.97 <sup>a</sup>                 | 25.21±12.13 <sup>e</sup>    |
| CAPE+Etanol    | 88.80±42.63                             | 71.03±41.55                 |

Birinci deneyde, <sup>a</sup> Etanol ve CAPE+Etanol gruplarına göre p<0.001

İkinci deneyde, <sup>b</sup> Etanol grubuna göre p=0.001, <sup>c</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.011,

<sup>d</sup>CAPE Kontrol grubuna göre p=0.001, <sup>e</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.007,

#### 4.4. TUNEL

TUNEL pozitifliği, normal kontrol grubu mide mukozası yüzey epitel hücrelerinde de görülüyordu. CAPE Kontrol grubunda, TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks anlamlı olarak değişmemişti. Etanol uygulamasının, TUNEL apoptotik indeksini anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi; her iki deneyde de, CAPE öntedavisinin etanolün uyardığı apoptozisi daha da arttırdığı saptandı, ancak CAPE öntedavisinin ek katkısı istatistik olarak önemli bulunmadı (Tablo 6) . Her iki deney deseninde apoptotik indeks anlamlı fark göstermedi.

**Tablo 6.** Deney gruplarında mide mukozasında apoptotik hücre sayıları (400'lük büyütmede)

|                | Birinci Deney            | İkinci Deney           |
|----------------|--------------------------|------------------------|
|                | Apoptotik hücre sayıları |                        |
| Normal Kontrol | 1.90±0.99 <sup>a</sup>   | 2.10±0.74 <sup>a</sup> |
| Etanol         | 9.50±4.06                | 8.78±3.70              |
| CAPE Kontrol   | 2.40±0.84 <sup>a</sup>   | 2.00±0.87 <sup>a</sup> |
| CAPE+Etanol    | 13.50±4.67               | 10.90±3.31             |

<sup>a</sup> Etanol ve CAPE+Etanol grubuna göre  $p < 0.001$ ; Birinci deneyde, Etanol ve CAPE+Etanol grupları arasında  $p = 0.063$ .

## 4.5. İmmünohistokimya

### 4.5.1. Bax Ekspresyonu

Birinci Deney'de bax, kontrol mide mukozalarında zayıf olarak eksprese edildi. Bir hafta, 10 mcml/kg günlük tek doz CAPE uygulanan Birinci Deneydeki CAPE Kontrol grubunda, bir mide mukozasında (% 10) bax ekspresyonu gözlenmedi, fakat 5 (% 50) mide mukoza örneğinde zayıf, 4 (% 40) mide mukoza örneğinde orta derecede bax ekspresyonu vardı. Normal ve CAPE kontrol grupları arasında bax ekspresyonu açısından istatistik önemde farklılaşma gözlenmedi. Etanol, bax ekspresyonunu Normal Kontrol ve CAPE Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttırdı. Bu deneyde, CAPE öntedavisi etanolün uyardığı bax ekspresyonunu düşürmesine rağmen, bu istatistik önemde bulunmadı.

İkinci Deney’de, CAPE Kontrol grubunda, üç mide mukozasında (% 33) bax ekspresyonu gözlenmedi. CAPE öntedavisinin, etanolün uyardığı bax ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı saptandı (2.56±0.53 & 1.60±0.84, p=0.015) (Tablo 7).

**Tablo 7.** Deney gruplarında immünhistokimyasal bax ekspresyonu.

|                | Birinci Deney             | İkinci Deney              |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
|                | Bax ekspresyonu           |                           |
| Normal Kontrol | 1.00±0.00 <sup>a, b</sup> | 0.70±0.48 <sup>d, e</sup> |
| Etanol         | 2.60±0.52                 | 2.56±0.53 <sup>f</sup>    |
| CAPE Kontrol   | 1.30±0.67 <sup>c</sup>    | 0.89±0.93 <sup>g</sup>    |
| CAPE+Etanol    | 2.10±0.99                 | 1.60±0.84                 |

Birinci Deney: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p<0.001, <sup>b</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.005; <sup>c</sup> Etanol grubuna göre p=0.001, (CAPE Kontrol ve CAPE+Etanol grubu arasında p=0.076 (ns).)

İkinci Deney: <sup>d</sup> Etanol grubuna göre p<0.001, <sup>e</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.01; <sup>f</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.015; <sup>g</sup> Etanol grubuna göre p=0.002, (CAPE Kontrol ve CAPE+Etanol grubu arasında p=0.055 (ns).)

#### 4.5.2. Kaspaz-3 Ekspresyonu

Normal ve CAPE kontrol gruplarının mide mukozasında zayıf kaspaz-3 ekspresyonu vardı. Etanol grubunda Birinci Deney’de 5 (% 50), İkinci Deney’de 3 (% 30) mide mukoza örneğinde orta derecede kaspaz-3 ekspresyonu tespit edildi. Etanolün uyardığı kaspaz-3 ekspresyonu artışı, istatistik olarak Normal ve CAPE Kontrol gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu. CAPE öntedavisi etanolün uyardığı kaspaz-3 artışını azalttı, fakat bu istatistik açıdan önemli bulunmadı (Tablo 8).

**Tablo 8.** Deney gruplarında immünohistokimyasal kaspaz-3 ekspresyonu.

|                | Birinci Deney          | İkinci Deney           |
|----------------|------------------------|------------------------|
|                | Kaspaz-3 ekspresyonu   |                        |
| Normal Kontrol | 1.00±0.00 <sup>a</sup> | 1.00±0.00 <sup>d</sup> |
| Etanol         | 1.50±0.53 <sup>b</sup> | 1.44±0.53 <sup>e</sup> |
| CAPE Kontrol   | 1.00±0.00              | 1.00±0.00              |
| CAPE+Etanol    | 1.30±0.67              | 1.20±0.42              |

Birinci Deneyde: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p=0.012, <sup>b</sup> CAPE Kontrol grubuna göre 0.012.

İkinci Deneyde: <sup>d</sup> Etanol grubuna göre p=0.021, <sup>e</sup> CAPE Kontrol grubuna göre 0.028.

#### 4.5.3. Kaspaz-8 Ekspresyonu

Kontrol gruplarında zayıf bir kaspaz-8 ekspresyonu vardı. Etanol, kaspaz-8 ekspresyonunu kısmen uyardı. Bu, Birinci Deney’de istatistik olarak önemli bulundu, İkinci Deney’de önemsizdi. (Tablo 9).

**Tablo 9.** Deney gruplarında kaspaz-8 ekspresyonu.

|                | Birinci Deney          | İkinci Deney           |
|----------------|------------------------|------------------------|
|                | Kaspaz-8 ekspresyonu   |                        |
| Normal Kontrol | 1,00±0,00 <sup>a</sup> | 1,00±0,00 <sup>c</sup> |
| Etanol         | 1,40±0,52 <sup>b</sup> | 1,33±0,50              |
| CAPE Kontrol   | 1,00±0,00              | 1,00±0,00 <sup>d</sup> |
| CAPE+Etanol    | 1,20±0,42              | 1,40±0,52              |

Birinci Deneyde: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p=0.029, <sup>b</sup> CAPE Kontrol grubuna göre, p=0.029

İkinci Deneyde: <sup>c</sup> CAPE+Etanol grubuna göre, p=0.029, <sup>d</sup> CAPE+Etanol grubuna göre, p=0.038.

#### 4.5.4. Bcl-2 ekspresyonu

Birinci Deney’de, CAPE Kontrol ve CAPE+Etanol gruplarıyla, İkinci Deney’de Etanol ve CAPE Kontrol gruplarından birer mide mukozasında zayıf bcl-2 ekspresyonu gözlemlendi. Diğer örneklerde bcl-2 ekspresyonu saptanmadı.

#### 4.5.5. TNF- $\alpha$ ekspresyonu

Etanol uygulaması, TNF- $\alpha$  ekspresyonunu kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttırdı. CAPE öntedavisi, etanolün uyardığı TNF- $\alpha$  ekspresyonu artışını her iki deneyde de anlamlı olarak değiştirmede (tablo 10).

**Tablo 10.** Deney gruplarında TNF- $\alpha$  ekspresyonu.

|                | Birinci Deney             | İkinci Deney              |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
|                | TNF- $\alpha$ ekspresyonu |                           |
| Normal Kontrol | 1.00±0.00 <sup>a, b</sup> | 0.70±0.15 <sup>e, f</sup> |
| Etanol         | 1.60±0.52 <sup>c</sup>    | 1.44±0.53 <sup>g</sup>    |
| CAPE Kontrol   | 1.10±0.32 <sup>d</sup>    | 1.00±0.00 <sup>h</sup>    |
| CAPE+Etanol    | 1.80±0.92                 | 1.50±0.71                 |

Birinci Deneyde: <sup>a</sup> Etanol grubuna göre p=0.023, <sup>b</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.013, <sup>c</sup> CAPE Kontrol grubuna göre p=0.022, <sup>d</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.044

İkinci Deneyde: <sup>e</sup> Etanol grubuna göre, p=0.009, <sup>f</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.010, <sup>g</sup> CAPE Kontrol grubuna göre p=0.028, <sup>h</sup> CAPE+Etanol grubuna göre p=0.039.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada absolü etanolün sıçan midesinde genellikle lineer erozyonlara neden olduğunu, % 10 kadarında yaygın hemoraji yaptığını ve günde 10 ve 20 µmol/kg CAPE öntedavisinin akut absolü etanol ile uyarılan mide lezyonlarını anlamlı olarak önlemediğini saptadık. Bununla birlikte, günlük 20 µmol/kg CAPE dozu ile 3 gün öntedavi yapılan sıçan grubunda yaygın hemoraji gözlenmedi ve lineer erozyonların sayısı daha azdı. Mikroskopik değerlendirmelerde, uyguladığımız deney deseninde ve kullanılan dozlarda, CAPE'nin, etanolün uyardığı gastrik lezyonları engellemediği ortaya konmuştur.

Etanol gastritinin önlenmesinde kullanılan CAPE'nin başarısız kalmasının olası nedenleri aşağıda tartışılmıştır.

### 5.1. Etanolle Uyarılan Mide Lezyonlarında Oksidatif Stres ve CAPE

Etanolün oluşturduğu mide mukoza lezyonlarının patogenezinde serbest oksijen radikallerinin önemli bir yeri vardır. Etanolün mide mukozasına teması polimorfonükleer lökosit birikimine neden olmaktadır (56, 57). Polimorfonükleer lökositler bol miktarda lizozomal myeloperoksidaz ve nikotinamid dinükleotid fosfat hidrojen oksidaz enzimleri ihtiva etmektedirler. Aktive olan polimorfonükleer lökositlerdeki sitotoksik karakterdeki bu enzimler, serbest oksijen radikal kaynağıdır (56). Öte yandan, polimorfonükleer lökositlerin kapillerlerde birikerek, kan akımına karşı mikrovasküler direnç oluşturmak yoluyla da doku hasarının artmasına katkıda buldukları gösterilmiştir (56).

Etanol ile oluşturulan mide mukoza lezyonlarında, serbest oksijen radikallerinin rolünü ortaya koyan Terano ve arkadaşlarının çalışmasında (58), bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz ön tedavisi ile mide lezyonlarında % 70 düzeyinde azalma saptanmıştır. Perry ve arkadaşları ise (59), kedi mide mukozasında

iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde süperoksit dismutaz tedavisinin etkinliğini göstermişlerdir.

Bir çalışmada, etanolün uyardığı mide mukoza lezyonlarında, bir antioksidan olan allopurinolün, etanolün antioksidan savunma sistemleri üzerindeki zararlı etkisini azalttığı ve MDA konsantrasyonunu düşürdüğü gösterilmiştir (60). Benzer şekilde, Salim ve arkadaşları, sıçanlarda radikal temizleyici ajanlar, allopurinol ve dimetil sulfoksit'in, % 40 etanolle uyarılan mide mukoza lezyonlarının iyileşmesini arttırdığını bildirmişlerdir (7). Bir başka antioksidan, patates proteini hidrolizatının etanolle uyarılan mide lezyonlarını önlediği gösterilmiştir (10). Yine bir başka sıçan çalışmasında, etanol lezyonlarında 1,8-cineole'ün mide koruyucu etkisinin, antioksidan ve lipoksijenaz inhibitörü özelliklerine bağlı olduğu saptanmıştır (9). Safra yolu bağlanmış sıçanlarda, etanolle uyarılan mide haraplanmasında bir antioksidan olan Vitamin E'nin sitoprotektif rolüne ilişkin kanıtlar bildirilmiştir (8).

CAPE, mikromolar konsantrasyon aralığında linoleik asit ve araşidonik asitin 5-lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe etmektedir. Yaklaşık olarak 10 µmol/kg konsantrasyonda *in vitro* koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke ettiği bildirilmiştir (12). Yılmaz ve arkadaşları, bir deneysel diyabet çalışmasında, diyabetik sıçanların karaciğerindeki artmış MDA seviyesinin CAPE tedavisi ile kontrol grubu düzeyine çekildiğini bildirmişlerdir (11). Bir başka çalışmada, yanık oluşturulan sıçanlarda CAPE'nin, MDA düzeyini anlamlı ölçüde düşürdüğü ve antioksidan enzim düzeylerini arttırdığı saptanmıştır (61). Diğer bir çalışmada, sıçanlara tek doz bakteriyel lipopolisakkarit enjeksiyonu sonrası yine tek doz 10 µmol/kg CAPE uygulanmış, 24 saat sonra sıçanların akciğer dokusunda MDA konsantrasyonu CAPE ile tedavi edilmeyen gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (40).

Bu çalışmalar, CAPE'nin antioksidan etkisiyle etanol gastritinde mide koruyucu olabileceğini telkin etmekle birlikte bizim çalışmamızda CAPE öntedavisinin etanol lezyonlarını önlemediği görülmüştür. Çalışmamızda, etanol uygulanan sıçan gruplarının mide dokusunda, MDA konsantrasyonunun, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yükseldiği saptanmış, CAPE öntedavisi yapılan sıçanlarda MDA konsantrasyonunun düşmekle birlikte, bunun istatistik önemde

olmadığı bulunmuştur. Bunun bir nedeni, incelediğimiz patolojinin homojen dağılım göstermemesidir. Lezyonlu alanlarda MDA konsantrasyonunun artması beklenir ve etanolün uyardığı gastrik lezyonlar homojen dağılmamaktadır; her ne kadar lezyonlu alanları da içeren örnekler alınmış olsa da, alınan örneklerin farklı bölgelerdeki değişik büyüklükteki lezyonların temsilcisi olmaları tam olarak mümkün olmayabilir. Deneysel gruplarındaki MDA konsantrasyonu standard sapmalarının geniş bir aralıkta olması da bu düşüncüyü desteklemektedir.

Öte yandan, midedeki etanol lezyonları için CAPE “uygun bir antioksidan” olmayabilir. Etanolün uyardığı mide lezyonlarının önlenmesinde bütün antioksidanların etkin olamayabileceğine ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. Antioksidan enzimler, katalaz ve glutatyon peroksidaz, reaktif oksijen metaboliti hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalize ederler ve her iki enzimle yapılan ötedavinin etanolle oluşturulan mide lezyonlarında koruma sağlamadığı gözlenmiştir (59, 60, 62). CAPE ötedavisinin, etanolün uyardığı mide lezyonlarını önlememesi, kullandığımız CAPE dozunun yetersiz olmasıyla da ilişkili olabilir. Literatürde, CAPE'nin en etkin veya en uygun ip dozunun ne olduğunu araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Sıklıkla 10 µmol/kg gibi düşük günlük dozlarda kullanılmış ve bu dozda sıçanlarda ve farelerde oluşturulan farklı hastalık modellerinin düzelmesine katkıda bulunduğu ve bu dozda antioksidatif etkilerini gösterdiği bildirilmiştir (61,63-66). 10 µmol/kg dozu, 2.83 mg/kg'a karşılık gelmektedir. Daha yüksek CAPE dozlarının kullanıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır. Ospina ve arkadaşları, CAPE'nin ip 20 mg/kg dozda verilmesiyle Interlökin-1-beta (IL-1β)'nin uyardığı serobrovasküler COX-2 yapımının inhibe edildiğini (67), Fitzpatrick ve arkadaşları, 7 gün, 30 mg/kg/gün ip CAPE tedavisiyle bakteriyel peptidoglikan-polisakkarid ile uyarılan kolitin şiddetinin azaldığını bildirmişlerdir (68). Park ve arkadaşları, balb/c farelere peroral 5, 10, 20 mg/kg dozda verilen CAPE ile timus ağırlığı ve selülaritesinin tüm dozlarda azalırken, konkanavalin A ile uyarılan T lenfosit blastogenezisinin ancak 20 mg/kg dozda gerçekleştiğini ve anlamlı sitokin değişikliklerinin 20 mg/kg CAPE grubunda ortaya çıktığını saptamışlardır (69).

Çalışmamızda, MDA konsantrasyonunun önemli derecede olmasa da düşmesi, CAPE'nin antioksidan etkisiyle açıklanabilir. Mide lezyonlarını önlemekte yetersiz kalmasında, Park ve arkadaşlarının belirlediği gibi doz yetersizliği söz konusu



olabilir. Diğer taraftan, etanolün uyardığı mide lezyonlarının patogenezinde rol alan başka mekanizmalarla CAPE'nin olumsuz etkileşimi de mümkündür.

### **5.2. Etanolün Uyardığı Mide Mukoza Lezyonları ve NF-κB**

Bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB'nin; intersellüler adezyon molekülü-1, vasküler hücre adezyon molekülü-1, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 ve uyarılabilir nitrik oksid sentaz (iNOS) gibi çok sayıda proinflamatuar genin transkripsiyonunu aktive ettiği bildirilmiştir (70-73). IL-1, TNF-α gibi sitokinler, lipopolisakkarid, oksidatif stres ve viral ürünler de NF-κB'yi uyarırlar (74, 75). İnsan histiyosit hücre dizisinde CAPE'nin, NF-κB'nin özgül inhibitörü olduğu saptanmıştır (76). Daha sonra, birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada CAPE'nin NF-κB inhibisyonu yaptığı bulunmuştur (53, 68, 77). Teorik olarak, birçok proinflamatuar sitokinin aktive olduğu ve serbest radikalın ortaya çıktığı etanol gastritinin önlenmesinde NF-κB'nin inhibe edilmesinin olumlu etkisi beklenir. Bununla birlikte, etanolün uyardığı NF-κB aktivasyonu ve COX-2 ekspresyonunun mide lezyonlarının gelişmesi üzerine koruyucu rolü olduğunu ortaya koyan yeni bir çalışma yayımlanmıştır. Sıçan mide mukoza epitelinde yapılan bu *in vitro* çalışmada, etanolün NF-κB aktivasyonunu uyardığı ve COX-2 ekspresyonunu arttırdığı; NF-κB'nin NEMO-bağlayan peptid ile inhibisyonu ve CAY-14040 ile COX-2 aktivitesininin inhibe edilmesinin kaspaz-3 aktivitesini ve apoptozisi arttırdığı ve böylece hücre viabilitesini azalttığı gözlenmiştir (78). Dolayısıyla NF-κB'nin CAPE ile inhibe edilmesi, beklentimizin tersine apoptozisi arttırarak ve COX-2 ekspresyonunu azaltarak, etanolün uyardığı mukoza lezyonlarının şiddetlenmesine neden olmuş olabilir.

### **5.3. Etanolün Uyardığı Gastritte Apoptozis ve CAPE**

DeneySEL stres ülserinde (79), gama radyasyonun uyardığı gastropatide (80) apoptozisin arttığı bildirilmiştir. Etanolün uyardığı gastritte de apoptozisin arttığı

gösterilmiştir. Piotrowski ve arkadaşları, sıçanlarda etanolle uyarılan gastrit modelinde etanol verilmesinden 30 dakika sonra mide epiteli apoptozisinde 9,5 kat artış saptamışlardır (2). Domuz mide mukozası hücre kültürlerine etanol uygulaması sonrasında da apoptozisin uyarıldığı gözlenmiştir (20).

Biz de, sıçanlarda etanol uygulamasının mide mukozası apoptozisini uyardığını saptadık. CAPE öntedavisinin, normal mide mukozası apoptotik hücre sayısını değiştirmeyenken, etanolün uyardığı apoptozisi potansiyalize ettiğini gözledik.

CAPE'nin bazı çalışmalarda apoptozisi uyardığı, bazılarında inhibe ettiği bildirilmiştir. İnflamatuvar hücrelerde veya kanser hücrelerinde apoptozisin uyarılmasının olumlu tarafı olmasına karşın, normal hücrelerde uyarılmasının olumsuz etkileri olabilir. CAPE'nin, meme kanseri hücre kültüründe (13), HCT116 insan kolon kanser hücre dizisinde (54), androjen bağımsız PC3 prostat kanseri hücre dizisinde (55) ve sıçan karaciğer stellat hücrelerinde (81) apoptozisi uyardığı gösterilmiştir. Sıçanlarda peptidoglikan-polisakkarit ile uyarılan kolitte, CAPE tedavisinin kolon makrofajlarında apoptozisi uyardığı saptanmıştır (68). Diğer taraftan, CAPE'nin apoptozisi inhibe ettiğinin gösterildiği bazı çalışmalar da vardır. Örneğin, Çağlı ve arkadaşları, iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçan miyokardında, CAPE öntedavisinin apoptozisi inhibe ederek hücresel yıkımı azalttığını bildirmişlerdir (82).

#### **5.4. Etanolün Uyardığı Gastritte Proapoptotik ve Antiapoptotik Protein Ekspresyonları ve CAPE**

Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-8, proapoptotik proteinlerdir. Etanol uygulanan sıçanlarda apoptotik hücrelerin artışı ile uyumlu olarak bax, kaspaz-3 ve kaspaz-8 ekspresyonunun arttığını gözledik. Bununla birlikte, CAPE öntedavisi etanolün uyardığı apoptozisi potansiyalize etmesine karşın, bu proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırmadı; hatta azalmasına neden oldu. Bazı çalışmalarda da benzer durumlara rastlanmıştır. Örneğin, Gjørret ve arkadaşları, inek embriyo hücrelerinde kaspaz-3 boyanması olan hücrelerin bir kısmının hücre çekirdeklerinde apoptotik yapı gözlememiş, bazı TUNEL pozitif hücrelerde ise, ya çok zayıf kaspaz-3

boyanması göstermiş ya da hiç gösterememişlerdir (83). Yazarlar bu durumu, apoptotik süreç esnasında boyanma şekillerinin sırasına bağlamışlardır. Apoptoziste öncelikle sitoplazmik kaspaz-3 boyanmakta, daha sonra nükleer apoptotik morfoloji saptanmakta ve en sonunda TUNEL'le gösterilebilen apoptozis açığa çıkmaktadır. TUNEL boyası olup da kaspaz-3 boyanması rastlanmayan hücreler için ise Cryns ve arkadaşları, kaspaz-3'ün otoproteolitik yıkıma uğradığını öne sürmüşlerdir (84).

Kontrol gruplarımızın mide örneklerinde de zayıf bir kaspaz-3 ve 8 ekspresyonu olduğunu gözledik. Maliqueo ve arkadaşları, 2003 yılında yayımlanan bir makalelerinde, normal ve polikistik over sendromlu (PCOS) proliferatif endometriyumda immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyanmasının farklı olmadığını bildirmişlerdir (85). Aynı yazarlar 2007 yılında yayımlanan makalelerinde ise, kaspaz-3 ve prokaspaz-3'ü ayrı ayrı olarak Western-Blot yöntemi ile çalıştıklarını ve normal ve PCOS'lu endometrium hücrelerinin kaspaz-3 düzeylerinde önemli farklılaşma saptadıklarını, oysa prokaspaz-3 düzeyinin farklı olmadığını bildirmişlerdir (86). Yazarlar, 2003 yılında yayımlanan çalışmalarında kullanılan immünohistokimyasal boyanın aktif kaspaz-3'ü göstermediğini belirtmişlerdir. Dolayısıyla, kontrol grubunda yaygın olarak gözlediğimiz zayıf kaspaz-3 boyanması gerçekte doğal olarak bulunması beklenen prokaspaz-3'ü gösteriyor olabilir ve aynı olgu kaspaz-8 için de geçerli olabilir. Bizim kaspaz-3 ve kaspaz-8'i göstermek için kullandığımız immünohistokimyasal boyalar sırasıyla inaktif kaspaz-3'ü ve hem aktif hem de inaktif kaspaz-8'i boyamaktadır. Kaspaz-3'ün inaktif formu bütün hücrelerde bulunmaktadır (87, 88), kaspaz-8 ile ilgili literatüre ulaşamamıştır, ancak bu durumun kaspaz-8 için de mümkün olması beklenebilir.

Bcl-2, antiapoptotik bir proteindir. Hücrel hasar sonrası önemli işlevleri bulunmaktadır (89). Apoptotik hücrelerin çok olduğu bölgede az olması beklenmektedir. Çalışmamızda, birçok preparatta bcl-2 boyanması gözlenmemiştir. Braun ve arkadaşları, apoptozisin belirteci olarak bcl-2 yerine bcl-XL'nin daha güçlü bir gösterge olduğunu ileri sürmüşler ve bcl-XL'nin kullanılmasını önermişlerdir (90).

### 5.5. Etanolün Uyardığı Gastrit Patogenezinde TNF- $\alpha$

Sıçanlarda, etanol verilmesinden 30 dakika sonra değerlendirilen mide mukozasında yaygın lezyonlara TNF- $\alpha$  artışının eşlik ettiği bildirilmiştir (2). TNF- $\alpha$  sentezi ve/veya salınımının pentoksifilin, talidomid, deksametazon veya anti-TNF- $\alpha$  antikoru ile inhibe edilmesinin sirotik sıçanlarda etanolle uyarılan mide lezyonlarının şiddetini azalttığı gösterilmiş ve TNF- $\alpha$ 'nın, sirotik sıçanlarda etanolle uyarılan mide lezyonlarının patogenezinde rol aldığı öne sürülmüştür (39). Biz de, sıçanlara etanol verilmesinin, mide mukozasında TNF- $\alpha$  ekspresyonunu kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttırdığını immünohistokimyasal olarak saptadık.

Çalışmamızda CAPE öntedavisinin, etanolün neden olduğu TNF- $\alpha$  ekspresyonu üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. CAPE'nin TNF- $\alpha$  ekspresyonu üzerinde etkili olmamasının nedeni, kullandığımız CAPE dozlarının yetersiz olması olabilir. Balb/c farelerde konkanavalin A ile uyarılan anlamlı sitokin değişikliklerinin 20 mg/kg'dan düşük dozlarda gözlenmediği bildirilmiştir (69). Patolojinin türüne göre gereksinim duyulan CAPE dozu farklı olabilir. Örneğin, tüm vücut irradiasyonu yapılan sıçanlarda ip 30 mg/kg CAPE tedavisinin, artmış olan IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  ekspresyonlarını değiştirmedeği bildirilmiştir (91); fakat bir başka çalışmada, 7 gün 30 mg/kg/gün ip CAPE tedavisiyle, bakteriyel peptidoglikan-polisakkarid ile uyarılan kolitte kolon dokusunda TNF- $\alpha$  konsantrasyonunun azaldığı saptanmıştır (68).

Sıçanlarda 7 gün günde 10  $\mu$ mol/kg ve 3 gün günde 20  $\mu$ mol/kg CAPE öntedavisi, absö etanolün uyardığı mide mukoza lezyonlarını önlememiştir. Etanol, mide dokusunda MDA konsantrasyonunu arttırmış, mide mukozası yüzeyel epitel hücrelerinde apoptozisi ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunu uyarmıştır. CAPE, etanolün neden olduğu MDA konsantrasyonunu istatistik olarak önemli olmayan derecede düşürmüş ve apoptozisi potansiyalize etmiştir; dokuda TNF- $\alpha$  ekspresyonuna etkisi olmamıştır. Bir NF- $\kappa$ B inhibitörü olan CAPE'nin, bu çalışmada kullandığımız dozlarda, sıçanlarda etanolün neden olduğu mide mukoza lezyonlarını önlememesinin nedeni apoptozisi potansiyalize etmesi olabilir. Bununla birlikte, daha yüksek dozlarda kullanıldığı zaman, serbest radikal temizleyici ve proinflamatuvar sitokinleri azaltıcı

özellikleri baskın gelebilir; o nedenle daha yüksek dozların kullanıldığı başka çalışmaların yapılmasında yarar olduğu kanısındayız.

## 6. ÖZET

### **Sıçanlarda Etanol İle Uyarılan Gastritin Önlenmesinde Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkinliğinin Araştırılması**

Etanolle uyarılan gastrit, mide mukozasında erezyon, hemoraji ve mukozal inflamasyon ile karakterize klinikopatolojik durumdur. Etanol gastritinde, serbest radikal oluşumu ve sitokin-aracılı apoptozis yoluyla hücre kaybı meydana geldiği bildirilmiştir. CAPE, bal arısı propolisinde bulunan flavonoid benzeri yapıda antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri olan bir bileşiktir. Bu çalışmada, etanolle uyarılan deneysel gastrit modelinde CAPE'nin koruyucu etkinliğini, antioksidan ve apoptozisi modüle edici özelliklerini değerlendirmeyi amaçladık.

Seksen adet erkek Wistar albino sıçan ikiye ayrılarak iki deney deseninde kullanıldı. Birinci deney'de 7 gün günde bir kez, ikinci deney'de 3 gün günde 2 kez 10 µmol/kg CAPE ile öntedavi yapıldı. Kontrol gruplarına CAPE yerine SF verildi. Öntedavi bitiminin ertesi günü sabah 1 mL etanolün ig verilmesiyle gastrit uyarıldı. Etanol veya kontrol gruplarına SF verilmesinden 1 saat sonra hayvanların yaşamına son verilerek mideleri çıkarıldı. Midede gelişen lezyonlar makroskopik ve histolojik olarak değerlendirildi. Mide mukozasında biyokimyasal olarak MDA konsantrasyonu, mide mukoza yüzeyel epitel hücrelerinde TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks ve immünohistokimyasal olarak, bax, kaspaz-3, kaspaz-8, bcl-2 ve TNF-α ekspresyonları araştırıldı.

CAPE öntedavisi, etanolün neden olduğu lezyonları makroskopik ve histolojik olarak anlamlı düzeyde önlemedi; MDA konsantrasyonu artışını azalttı, ancak bu azalma istatistik açıdan anlamlı değildi. CAPE öntedavisi, etanolün uyardığı apoptozisi potansiyalize etti. Etanol; bax, kaspaz-3 ve 8 ekspresyonunu kontrol gruplarına göre arttırdı. İkinci Deney deseninde, CAPE öntedavisinin, etanolün uyardığı bax ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı görüldü. Tüm deney gruplarında seyrek olarak ve zayıf bcl-2 ekspresyonu saptandı. Sonuç olarak, deneylerimizde kullanılan süre ve dozlarda CAPE öntedavisinin, absölü etanolün uyardığı mide mukoza lezyonlarını önlememiştir, bunun nedenlerinin apoptozisi potansiyalize etmesi veya kullanılan dozun yetersiz kalması olduğu kanısındayız.

**Anahtar Sözcükler:** Apoptozis, CAPE, etanolle uyarılan gastrit, inflamasyon, serbest oksijen radikalleri.

## 7. SUMMARY

### **The Efficiency of Capheic Acid Phenethyl Ester on Prevention of Ethanol Induced Gastritis in Rats**

Ethanol induced gastritis is a clinocopathologic state that is characterized by erosion, hemorrhage and inflammation in gastric mucosa. It is reported that, cell loss occurs through cytokine related apoptosis and free radical generation in ethanol gastritis. CAPE, which is a flavanoid like compound and is found in honeybee propolis, shows anti-inflammatory and antioxidant properties. In this study, we want to evaluate the protective efficiency, the antioxidant and apoptotic modulator properties of CAPE on ethanol induced gastric model.

Eighty male Wistar Albino rat were divided into two groups in two different experimental designs. Pretreatment with 10  $\mu\text{mol/kg}$ . of CAPE was done on First Experiment once a daily for 7 days and on Second Experiment twice daily for 3 days. In control groups SF was given instead of CAPE. Gastritis was induced by 1 ml. ethanol ig. the day after the end of pretreatment. The animals were sacrificed and their stomach removed 1 hour after delivery of SF (control groups) or ethanol. The lesions on stomach were evaluated macroscopically and microscopically. In gastric mucosa, MDA concentration was evaluated by biochemistry, in gastric superficial epithelial cells of mucosa, apoptotic index was evaluated by TUNEL method and bax, caspase-3, caspase-8, bcl-2 and TNF- $\alpha$  expressions were evaluated by immunohistochemistry.

CAPE pretreatment didn't significantly prevent the lesions induced by ethanol macroscopical and histological; the increase in MDA concentration was reduced but the decline wasn't statistically significant. CAPE pretreatment potentiated apoptosis induced by ethanol. Ethanol increased bax, caspase-3 and caspase-8 expression compared to control groups. In Second Experiment design, CAPE pretreatment significantly reduced ethanol induced bax expression. In all experimental groups, seldom and weak bcl-2 expression is shown. In conclusion, the time and dosage of CAPE pretreatment in our experiments didn't prevent gastric mucosal lesions; we think that it is because CAPE pretreatment potentiated apoptosis or the dosage was insufficient.

**Key Words:** Apoptosis, CAPE, ethanol induced gastritis, inflammation, free oxygen radicals.

## 8. KAYNAKLAR

- 1- TEYSSEN S, SINGER MV. Alcohol-related diseases of oesophagus and stomach. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17:557-73.
- 2- PIOTROWSKI J, PIOTROWSKI E, SKDRODZKA D, SLOMIANY A, SLOMIANY BL. Gastric mucosal apoptosis induced by ethanol: effects of antiulcer agents. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 42:247-54.
- 3- PIRINÇÇI PA, BOLKENT S, YANARDAĞ R. The role of zinc sulfate and metallothionein in protection against ethanol-induced gastric damage in rats. *Dig Dis Sci* 2006; 51:2353-60.
- 4- LEE JS, OH TY, KIM YK, BAIK JH, SO S, HAHM KB, SURH YJ. Protective effects of green tea polyphenol extract against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. *Mutat Res* 2005; 579:214-24.
- 5- BUJANDA L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:3374-82.
- 6- KVIETYS PR, TWOHIG B, DANZELL J, SPECIAN RD. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology* 1990; 98:909-20.
- 7- SALİM AS. Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Digestion* 1990; 47:24-8.
- 8- CANTURK NZ, CANTURK Z, OZBİLİM G, YENİSEY C. Protective effect of vitamin E on gastric mucosal injury in rats with biliary obstruction. *Can J Gastroenterol* 2000 Jun; 14:499-503.
- 9- SANTOS FA, RAO VS. 1, 8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Dig Dis Sci* 2001 Feb; 46:331-7.
- 10- KUDOH K, MATSUMOTO M, ONODERA S, TAKEDA Y, ANDO K, SHIOMI N. Antioxidative activity and protective effect against ethanol-induced gastric mucosal damage of a potato protein hydrolysate. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49:451-5.
- 11- YILMAZ HR, UZ E, YUCEL N, ALTUNTAS I AND OZCELİK N. Protective effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18:234-38.
- 12- SUD'INA GF, MIRZOEVA OK, PUSKAREVA GA, KORSHUNOVA GA, SUMBATYAN NV, VARFOLOMEEV SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329:21-24.
- 13- WATABE M, HISHIKAWA K, TAKAYANAGI A, SHIMIZU N AND NAKAKI T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of Nf-kappaB and activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Biol Chem* 2004; 279:6017-26.
- 14- OZEN S, AKYOL Ö, IRAZ M, SÖĞÜT S, ÖZUĞURLU F, ÖZYURT H, ODACI E, YILDIRIM Z. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *J Appl Toxicol* 2004; 24:27-35.
- 15- WOLFE MM, LICHTENSTEIN DR, SINGH G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroid antiinflammatory drugs. *N Eng Jour Med* 1999; 340:1888-99.



- 16- CRAWFORD MJ. The oral cavity and gastrointestinal tract in *Basic Pathology* Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 1997:470-515.
- 17- SCHUCKIT MA. Alcohol and Alcoholism in *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 2005; 372:2562-66.
- 18- LIEBER CS. Alcohol and the liver. Metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med*. 2000; 17:84-94.
- 19- SINGER MV, LEFFMAN C, EYSSLEIN VE. Action of ethanol and some alcoholic beverages on gastric acid and release of gastrin in humans. *Gastroenterology* 1987; 93:1247-54.
- 20- HOSHINO T, TAKANO T, TOMISATO W, TSUTSUMI S, HWANG HJ, KOURA Y, NISHIMOTO K, TSUCHIYA T, MIZUSHIMA T. Effects of Sucralfate on gastric irritant-induced apoptosis and necrosis in cultured Guinea pig gastric mucosal cells. *Biol Pharm Bull* 2003; 26:24-27.
- 21- PARK S, HAHM KB, OH TY, JIN JH, CHOU R. Preventive effect of Flavanoid, Wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 2004; 49:384-94.
- 22- DINOSO VP JR, CHEY WY, BRAVERMEN SP, ROSEN AP, OTTENBERG D, LORBER SH. Gastric secretion and gastric mucosal morphology in chronic alcoholics. *Arch Intern Med* 1972; 130:715-19.
- 23- GE YB, DU J, FAN LL, LI YC, GU L. Chronic ethanol feeding alters epithelial cell proliferation and apoptosis in rat gastric mucosa. *Histol Histopathol* 2007; 22:185-90.
- 24- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: A basic physiological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
- 25- HETTS SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279:300-7.
- 26- FADEEL B, ORRELIUS S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258:479-517
- 27- BONFOCO E, KRAINIC D, ANKARCRONA M, NICOTERA P, LIPTON SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate and nitric oxide/ superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7162-6.
- 28- LEIST M, SINGLE B, CASTOLDI AF, KUHNLE S, NICOTERA P. Intracellular adenosin triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185:1481-86.
- 29- LAVRIK IN, GOLKS A, KRAMMER PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115 :2265-72.
- 30- SAMALI A, ZHIVOTOVSKY B, JONES D, NAGATA S, ORRENIUS S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 1999; 6:495-6.
- 31- CHANG DW, XING Z, PAN Y, ALGECIRAS-SCHIMNICH A, BARNHART BC, YAISH-OHAD S, PETER ME, YANG X. c-FLIP (L) is a dual function regulator for caspase 8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* 2002; 21:3704-14.
- 32- DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-19.

- 33- MEDAMA JP, SCAFFIDÌ C, KISCHKEL FC, SHEVCHENKO A, MANN M, KRAMMER PH, PETER ME. FLICE is activated by association with CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16:2794-2804.
- 34- KISCHKEL FC, HELLBARTH S, BEHRMANN I, GERMER M, PAWLITA M, KRAMMER PH, PETER ME. Cytotoxicity dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14:5579-88.
- 35- CHEN CN, WU CL, LIN JK. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:53-66.
- 36- OZER, MK, PARLAKPINAR H, VARDI N, CIGREMIS Y, UÇAR M, ACET A. Myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative renal damage in rats: Protection by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Shock* 2005; 24:97-100.
- 37- TSUJIMOTO Y, FINGER LR, JUNIS C, NOWELL PC, CROCE CM. Cloning of chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097-9.
- 38- YANG E, KORMEYER SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
- 39- FERRAZ JG, TIGLEY AW, APPELYARD CB, WALLACE JL. TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1997; 272:809-14.
- 40- KOKSEL O, OZDULGER A, TAMER L, CİNEL L, ERCİL M, DEĞİRMENCİ U, UNLU S, KANIK A. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipolysaccharide-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther* 2005; 19:90-5.
- 41- SON S, LOBKOWSKY EB, LEWIS BA. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): Synthesis and X-Ray crystallographic analysis. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 236-38.
- 42- MICHAILART P, MASSFERRER JP, CAROTHERS AM, SUBBARAMAIAH K, ZWEIFEL BL, KOBOLDT C, MESTRE JR, GRUNBERGER D, SACKS PG, TANABE T, DANNENBERG AJ. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res* 1999; 59:2347-52.
- 43- PARK EH, KAHNG JH. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arc Pharm Res* 1999; 22:554-58.
- 44- NOMURA M, KAJI A, MA WY, MIYAMATO KI, DONG Z. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Molecular Carcinogenesis* 2001; 31: 83-89.
- 45- AMODIO R, DE RUVO C, DI MATTEO V, POGGI A, DI SANTO A, MARTELLI N, DI MATTEO V, LORENZET R, POGGI A, ROTILIO D, CACCHIO M, ESPOSITO E. Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis induced by low potassium in cerebellar granule cells. *Int J Dev Neurosci* 2003; 2:379-89.
- 46- HEPSEN IF, ER H, CEKIC O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. *Ophthalmic Res* 1999; 31:426-31.
- 47- MATTSON MP, CAMANDOLA S. NF-κB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 2001; 107:247-254.

- 48- PARKS DA, GRANGER DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986; 548:87-99.
- 49- SAHİN S, SOGUT S, OZYURT H, UZ E, İLHAN A, AKYOL O. Tissue xanthine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparison of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and methylprednisolone. *Neurosci Res Commun* 2002; 31:111-21.
- 50- OKUTAN H, OZCELİK N, YILMAZ HR, UZ E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem* 2005; 38:191-96.
- 51- GUREL A, ARMUTCU F, SAHİN S, SOGUT S, OZYURT H, GULEC M, KUTLU NO, AKYOL O. Protective role of  $\alpha$ -tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clinica Chemica Acta* 2004; 339:33-41.
- 52- HOSNUTER M, GUREL A, BABUCCU O, ARMUTCU F, KARGI E, İSİKDEMİR A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 2004; 30:121-5.
- 53- SONG YS, PARK EH, HUR MH, RYU YS, LEE YS, LEE JY, KİM YM, JİN C. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activation. *Cancer Lett* 2002; 175:53-61.
- 54- WANG D, XIANG DB, HE YJ, Lİ PZ, WU XH, MOU JH, XIAO HL, ZHANG QH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 26:4008-12.
- 55- MC ELENY K, COFFEY R, MORRISSEY C, FITZPATRICK JM, WATSON RWG. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int* 2004; 94:402-6.
- 56- SMİTH SM, KVIETYS PR. Gastric ulcer: Role of oxygen radicals. *Crit Care Med* 1988; 16:892-98.
- 57- LEE M, ALDRED K, LEE E, FELDMAN M. Aspirin induced acute gastric mucosal injury is a neutrophil dependent process in rats. *Am J Physiol* 1992; 263:920-26.
- 58- TERANO A, HIRAİSHİ H, OTA S, SHIGA J, SUGİMOTO T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. *Gastroenterol Jpn* 1989; 24:488-93.
- 59- PERRY MA, WADHWA S, PARKS DA, PICKARD W, GRANGER DN. Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology* 1986 Feb; 90(2):362-7.
- 60- KATO S, KAVESE AJ, ALDERMAN J, INATOMİ N, LİEBER CS. Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 203-10.
- 61- GUREL A, ARMUTCU F, HOSNUTER M, UNALACAK M, KARGI E, ALTINYAZAR C. Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative organ damage in rat model of thermal trauma. *Physiol Res* 2004; 53:675-82.
- 62- EVANGETİSTA S, MELİ A. Influence of antioxidants and radical scavengers on ethanol-induced gastric ulcers in the rat. *Gen Pharmacol* 1985; 16:285-6.

- 63- AKYOL A, ULUSOY H, IMAMOGLU M, CAY A, YULUĞ E, ALVER A, ERTURK E, KOSUCU M, BESIR A, AKYOL A, OZEN I. Does propofol or caffeic acid phenethyl ester prevent lung injury after hindlimb ischaemia-reperfusion in ventilated rats? *Injury* 2006; 37:380-7.
- 64- BİLEN BT, KILINÇ H, ALAYBEYOGLU N, ÇELİK M, IRAZ M, SEZGİN N, GULTEK A. Effect of caffeic acid phenethyl ester on survival of axial pattern flaps in rats with ischaemia-reperfusion injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2006; 40:73-8.
- 65- INCE H, KANDEMİR E, BAGCI C, GULEC M, AKYOL O. The effect of caffeic acid phenethyl ester on short-term acute myocardial ischemia. *Med Sci Monit* 2006; 12:187-93.
- 66- OGETÜRK M, KUS I, COLAKOGLU N, ZARARSIZ I, ILHAN N, SARSILMAZ M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 97:273-80.
- 67- OSPINA JA, BREVIG HN, KRAUSE DN, DUCKLES SP. Estrogen suppresses IL-1beta-mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:2010-9.
- 68- FITZPATRICK LR, WANG J, LE T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:915-20.
- 69- PARK JH, LEE JK, KİM HS, CHUNG ST, EOM JH, KİM KA. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* 2004; 4:429-36.
- 70- BALDWIN AS JR. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-83.
- 71- BANDARI PS, QIAN J, YEHIA G, SEEGOPAL HP, HARRISON JS, GASCON P, FERNANDES H, RAMESHWAR P. Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells. *Neuropeptides* 2002; 3613-21.
- 72- MAASER C, SCHOPPENER S, KUCHARZIK T, KRAFT M, SCHOENHERR E, DOMSCHKE W, LUEGERING M. Colonic epithelial cells induce endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 by a NF-kappaB-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol* 2001; 124:208-13.
- 73- ROGLER G, ANDUS T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22:382-9.
- 74- GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:225-260.
- 75- GLASGOW JN, WOOD T, PEREZ-POLO JR. Identification and characterization of nuclear factor kappaB binding sites in the murine bcl-x promoter. *J Neurochem* 2000; 75:1377-89.
- 76- NATAJARAN K, SINGH S, BURKE TR JR, GRUNBERGER D. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-κB. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:9090-95.
- 77- MAFFIA P, IANARO A, PISANO B, BORRELLI F, CAPASSO F, PINTO A, IALENTI A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury. *Br J Pharmacol* 2002; 136:353-60.

- 78- MUSTONEN H, HIETARANTA A, PUOLAKKAINEN P, KEMPPAINEN E, PAIMELA H, KIVILUOTO T, KIVILAAKSO E. Ethanol induced NF- $\kappa$ B activation protects against cell injury in cultured rat gastric mucosal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:1614-21.
- 79- KONTUREK PC, BROZOWSKI T, KONTUREK SJ, PAJDO R, KONTUREK JE, KWIECIEŃ S, TAUT A, HAHN EG. Apoptosis in gastric mucosa with stress-induced gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50:211-25.
- 80- PRZEMECK SM, DUCKWORTH CA, PRITCHARD DM. Radiation-induced gastric epithelial apoptosis occurs in the proliferative zone and is regulated by p53, bak, bax, and bcl-2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:620-7.
- 81- ZHAO WX, ZHAO J, LIANG CL, ZHAO B, PANG RQ, PAN XH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1278-81.
- 82- CAGLI K, BAGCI C, GULEC M, CENGİZ B, AKYOL O, SARI I, CAVDAR S, PENCE S, DINCAN H. In vivo effects of caffeic acid phenethyl ester on myocardial ischemia-reperfusion injury and apoptotic changes in rats. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35:440-8.
- 83- GJORRET JO, FABIAN D, AVERY B, MADDOX-HYTTEL P. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovin in vitro produced pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:961-71.
- 84- CRYNS V, YUAN J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12:1551-70.
- 85- MALÍQUEO M, CLEMENTI M, GABLER F, JOHNSON MC, PALOMINO A, SIR-PETERMANN T, VEGA M. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; 80:812-9.
- 86- VILLAVICENCIO A, BACALLAO K, GABLER F, FUENTES A, ALBORNOZ J, CASALS A, VEGA M. Deregulation of tissue homeostasis in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol* 2007; 104:290-95.
- 87- EXLEY GE, TANG C, MCELHINNY AS, WARNER CM. Expression of caspase and bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* 1999; 61:231-39.
- 88- JURÍŠICOVA A, ANTENOS M, VARMUZA S, TILLY JL, CASPER RF. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the harakiri gene product and caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:133-41.
- 89- PERIANAYAGAM MC, BALAKRISHNAN VS, GUO D, PEREIRA BJ, JABER BL. Quantification of bax and bcl-2 in polymorphonuclear leukocytes from hemodialysis patients: Relation to hydrogen peroxide. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:905-11.
- 90- BRAUN T, DAR S, VOROBIŃOV D, LINDENBOIM L, DASCAL N, STEIN R. Expression of Bcl-x(S) in Xenopus oocytes induces BH3-dependent and caspase-dependent cytochrome c release and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2003; 1:186-94.
- 91- LINARD C, MARQUETTE C, MATHIEU J, PENNEQUIN A, CLARENCON D, MATHE D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-

irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58:427-34.