

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA ASPİRİN İLE UYARILAN GASTRİTİN
ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hakan ÇAM

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet İŞLER

ISPARTA

2007

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA ASPİRİN İLE UYARILAN GASTRİTİN
ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hakan ÇAM

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet İŞLER

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 989-TU-05 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA

2007

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet İŞLER başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Doç.Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Doç.Dr. H. Şenol COŞKUN, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Uzm. Dr. İbrahim GÖREN, Uzm. Dr. Murat Demir, Uzm. Dr. Banu Kale KÖROĞLU'na, laboratuvar imkanlarını kullandıran Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e ve laboratuvar çalışmalarımda bana yol gösteren Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Efkan UZ ve Patoloji Anabilim Dalı ÖğretimÜyesi Yrd. Doç. Dr. Nermin KARAHAN'a, laboratuvar çalışmamda emeği geçen başta Dr. Erkan Cüre, Dr. Oğuzhan AKSU olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, bu vesileyle çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşime ve sıkıntılı anlarımda bana neşe kaynağı olan sevgili kızım Zeynep'e en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Hakan ÇAM

KISALTMALAR

ASA	Asetil salisilik asit, aspirin
NSAİİ	Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
PG	Prostaglandin
COX	Siklooksijenaz
LT	Lökotrien
GİS	Gastrointestinal sistem
SOR	Serbest oksijen radikalleri
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
MPO	Myeloperoksidaz
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GSH	Redükte glutasyon
PMNL	Polimorf nüveli lökositler
NOS	Nitrik oksit sentaz
NF-κB	Nükleer transkripsiyon faktör kappa-B
OH ⁻	Hidroksil iyonu
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
NO	Nitrik oksit
HOCl	Hipokloröz asit
LOOH	Lipid hidroperoksit
LOO [·]	Peroksil radikalleri
ATP	Adenozin trifosfat
i.p.	İntraperitoneal
o.g.	Orogastrik
SF	Serum fizyolojik

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL GİLGİLER	3
2.1. Gastrit	3
2.1.1. Gastrit Sınıflaması	3
2.1.2. Gastrit Patogenezi	4
2.1.3. Deneysel Gastrit Modelleri	5
2.1.3.1. Strese Bağlı Gastrit	5
2.1.3.2. Alkolik Gastrit	5
2.1.3.3. Konjestif Gastropati	6
2.1.3.4. NSAİİ Gastropatisi	6
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	7
2.3. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	8
2.4. Serbest Oksijen Radikal Türleri	10
2.5. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	10
2.5.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	10
2.5.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	11
2.6. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler	11
2.6.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	11
2.6.2. Enzimatik Antioksidanlar	13
2.6.2.1. Glutasyon Peroksidaz	13
2.6.2.2. Katalaz	14
2.6.2.3. Süperoksit Dismutaz	15
2.7. Kafeik Asit Fenetil Ester	15
2.7.1. CAPE'nin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri	16
2.7.2. CAPE'nin Antioksidan Etkisi	16

3. MATERYAL ve METOD	17
3.1. MATERYAL	17
3.1.1. Deney Hayvanları	17
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Aletler	18
3.2. YÖNTEM	18
3.2.1. Deney Protokolü	18
3.2.2. Makroskopik Değerlendirme	20
3.2.3. Doku Örneklerinin Alınması	20
3.2.4. Histolojik Değerlendirme	20
3.2.5. Mide Dokusunun Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi	21
3.3. İstatistiksel Analiz	21
4. BULGULAR	23
4.1. Gastrik Mukozanın Makroskopik Değerlendirilmesi	23
4.2. Histolojik Değerlendirme	24
4.2.1. Mukozal Hasar Değerlendirilmesi	24
4.2.2. Vasodilatasyon Değerlendirmesi	25
4.2.3. İnflamasyonun Değerlendirilmesi	26
4.2.4. Mukozal Mast Hücre Sayımı	27
4.3. Biyokimyasal Ölçümlerin Değerlendirilmesi	27
4.3.1. Mide Dokusunda MPO Aktivitesi	27
4.3.2. Mide Dokusundaki MDA Düzeyleri	28
4.3.3. Mide Dokusunda Antioksidan Enzim Aktiviteleri	29
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ	37
7. ÖZET	38
8. ABSTRACT	39
9. KAYNAKLAR	40

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Aspirin (asetil salisilik asit, ASA), antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik özelliklere sahip bir ilaçtır. Aspirin ve diğer non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) dünyada yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Aspirinin midede erozyon ve ülserlere neden olduğu bilinmektedir; bu lezyonlar, kanama ve perforasyonla da komplike olabilir.

Aspirin ve diğer NSAİİ'nin mide mukozasında yapmış olduğu hasarın mekanizması halen tam olarak anlaşılmış değildir. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada NSAİİ'nin neden olduğu mide mukoza lezyonlarında nötrofil aktivasyonu ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) major rol oynadığı ortaya konmuştur (1,2).

NSAİİ'nin yol açtığı mide mukoza lezyonlarının oluşumunda, mukozal prostaglandin (PG) yapımının azalması ve lokal irritan etkilerinin rolü de bulunmaktadır (3,4). Mide mukoza fonksiyonlarının ve defans mekanizmalarının sürdürülmesinde PG'ler önemli bir yer tutar. Prostanoidler ve E vitamininin karşılıklı etkileşimi hakkında yayınlar vardır. Birçok çalışmada E vitamininin başlıca fosfolipaz A₂ ve siklooksijenaz (COX) enzimlerinin aktivitelerini etkilemek suretiyle bazı prostanoidlerin sentezini modüle ettiği gösterilmiştir (5,6). Bu iki enzim de, araşidonik asidin PG ve prostanoidlere dönüşmesini katalize etmektedir. Diyete vitamin E eklenmesinin deney hayvanlarında aspirin ile uyarılan gastritin şiddetini azalttığı da saptanmıştır (7,8). Vitamin E'nin hem lipid peroksidasyonu, hem de aktive nötrofil birikimini inhibe ederek aspirin'le uyarılan gastrik mukozal lezyonları önlediğinin saptandığı bir çalışma da vardır (9).

Kafeik asit fenetil ester (CAPE) yapıca flavonoidlere benzeyen bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir. Mikromolar yoğunluk aralığında linoleik asit ve araşidonik asidin 5-lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe etmektedir. Yaklaşık olarak 10 µmol/L konsantrasyonunda *in vitro* koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke ettiği bildirilmiştir (10). Yapılan birçok çalışmada CAPE'nin antiinflamatuvar, sitostatik, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (11,12).

Son yıllarda antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği ile ön plana çıkan CAPE'in mide mukoza hasarlanması üzerine etkisi bilinmemektedir. Mevcut özelliklerinden dolayı CAPE, E vitamini gibi, aspirinle uyarılan mide lezyonlarının önlenmesinde yararlı bir ilaç olabilir. Bu çalışmada sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin, CAPE ötedavisi ile önlenip önlenemeyeceğini araştırmayı ve CAPE'nin koruyucu etkinliğini E vitamini ile karşılaştırmayı amaçladık.

Bu amaçla mide dokusunda enzimatik antioksidan sistemin ana öğeleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px); doku hasarında kesin bir tetikleyici mekanizma olarak kabul edilen ve dokuya lökosit invazyonunun bir göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO); lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) tayini yapıldı. CAPE ve E vitamininin belirtilen parametreler üzerine etkisi incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gastrit

Gastrit mide mukozasının inflamasyonudur. Gastrit sık karşılaşılan bir hastalıktır ve hastaların çoğu asemptomatiktir. Genellikle şikayetler nonspesifiktir. İnflamasyonun olmadığı veya minimal olduğu, asıl anormalliğin epitelyal veya vasküler düzeyde olduğu durumlar için gastropati terimi kullanılmaktadır.

2.1.1. Gastrit Sınıflaması

Gastrit uzun yıllar akut ve kronik olmak üzere kabaca iki şekilde sınıflandırılmıştır. Yapılan çalışmalar gastritin daha kapsamlı bir sınıflamaya ihtiyacı olduğunu göstermiştir. Günümüzde en çok kabul gören ve kullanılan sınıflama sistemi aşağıdaki gibidir (13).

I. Erozif ve hemorajik gastrit

A. İlaç ve kimyasal maddeler

NSAİİ

Alkol

Korozif madde

Diğer (KCl, demir, kemoterapikler, kokain vb)

B.Travma ve fiziksel ajanlar

Mekanik

Nazogastrik tüp, kusma

Endoskopik hemostazis: lazer, termal, skleroz

Yabancı cisim

Radyasyon

C. Vasküler

İskemi: emboliye bağlı (terapötik, kolesterol), vaskülit

Konjestif gastropati

D. Reflüye bağlı

Duodenogastrik reflü: postgastrektomi
Gastroözofagial reflü: kardial bölge inflamasyonu
E. İdiyopatik
Sporadik, insidental
Diffüz varyoliform gastrit (kronik eroziv gastrit)

II. Noneroziv gastrit

Helicobacter pylori (*H. pylori*) gastriti
Reaktif gastropati
Lenfositik gastrit
Atrofik gastrit (pernisyöz anemi var veya yok)

III. Spesifik gastritler (eroziv – noneroziv)

İnfeksiyöz gastritler (bakteriyel, viral, parazitik, fungal, flegmonoz, sifilitik)
Eozinofilik gastrit
Crohn hastalığı
Sarkoidoz
Menetrier hastalığı
Zollinger-Ellison Sendromu

2.1.2. Gastrit Patogenezi

Mide mukozasının inflamasyonu, mukozaya hasar veren etkenlerle, koruyucu dinamikler arasındaki dengenin bozulmasına bağlıdır. Bu dengenin bozulmasının derecesine bağlı olarak gastrit veya daha ileri bir lezyon olan ülser gelişir. Gastrointestinal sistem (GİS) mukozasının koruyucu faktörleri bikarbonat, aktif yüzey fosfolipidleri, kan akımı, hızlı hücre yenilenmesi ve koruyucu PG'dir. Mukozayı zarara uğratan başlıca etkenler ise, mukozal inflamasyon mediatörleri, mide asidi ve *H. pylori*'dir (14).

Akut mide mukozal lezyonların patofizyolojisini belirlemeyi amaçlayan birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, patogenezi hala net olarak ortaya

konulamamıştır. Mide mukozal hasarının patogenezi aydınlatmak amacıyla pek çok deneysel model, hasar oluşturmak için de çeşitli ajanlar kullanılmaktadır.

2.1.3. Deneysel Gastrit Modelleri

2.1.3.1. Strese Bağlı Gastrit Modeli

Gastritin oluşmasında önemli nedenlerden biri travma, yanık, sepsis gibi çeşitli sebeplerle oluşan strestir. Strese bağlı gastrik mukozal hasarın mekanizmasında birçok faktör rol almaktadır. Temel mekanizma hipotansiyon, hipoksi ve sepsis ile agreve olan gastrik mukozal iskemidir. İskemi ile serbest oksijen radikallerinin oluşumu artmaktadır. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır (15). Hücre membranları çok miktarda lipid içerirler ve serbest oksijen radikallerinin varlığı hücre nekrozuna neden olur. Serbest oksijen radikallerinin önemli bir kaynağı, polimorf nüveli lökositlerdir (PMNL). Yanık travması sonrasında gastrik mukozal kan akımının 15 dakika içinde azaldığı, bu dönemde arterioller kontraksiyon ve venüllerde lökosit yığılımı olduğu gösterilmiştir (16, 17). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, endotelinin gastrik vasküler tonusu etkilediği ve bu yolla mukozal hasarı artırdığı, endotelin reseptör antagonistlerinin mukozal lezyonları önlediği saptanmıştır (18).

2.1.3.2. Alkolik Gastrit Modeli

Deneysel çalışmalarda mukozal hasarın direkt olarak alkolün konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olduğu ortaya konmuştur (19). Patogenezinde mikrovasküler yapıda zedelenme, kan akımının konjesyonu ve vasküler permeabilitede artış rol oynamaktadır (20,21).

Etanol uygulamasından sonra NADPH oksidaz aktivitesinin de arttığı ve bunun süperoksit radikali aracılığıyla hidroksil radikali oluşumuna katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (22). Sıçanlara CAT, SOD gibi antioksidan enzimlerin verilmesiyle, alkole bağlı gastrik lezyonların önemli derecede önlediği gözlenmiştir (22).

2.1.3.3. Konjestif Gastropati Modeli

Portal hipertansiyon geliştirilen sıçan modelinde, yüzeysel gastrik mukozanın oksijenizasyonunun azalması sonucunda submukozal ödem ve mikrovaskülopati geliştiği ve mukozanın alkol, NSAİİ gibi çeşitli dış etmenlere daha hassas hale geldiği görülmüştür (23).

2.1.3.4. NSAİİ Gastropatisi Modeli

Aspirin ve diğer NSAİİ dünyada yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Aspirin uzun yıllar etki mekanizması bilinmeden kullanılmıştır. 1971'de John R. Vane aspirin'in COX enzimini inhibe ettiğini göstermiştir (24). Aspirin COX'u geri dönüşümsüz olarak asetillemekte ve PG sentezini inhibe etmektedir. Aspirin COX inhibisyonu ile tromboksan-A₂ sentezini azaltarak antiagregan etkinlik göstermektedir. Bu etki trombosit COX'unun geri dönüşümsüz olarak asetile edilmesi nedeniyle yaklaşık olarak trombosit yarı ömrü kadar (7 gün) sürer. Diğer NSAİİ ise geçici olarak antiagregan etki gösterirler (25). COX-1, fizyolojik olaylarda yer alan bir enzimdir, COX-2 ise inflamasyonun aracılık ettiği patolojik olaylarda rol oynamaktadır. Aspirin hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe etmektedir. Ancak COX-2'yi inhibe eden dozu göreceli olarak yüksek dozlarıdır. Aspirinin anti-inflamatuar, anti-piretik ve analjezik etkilerinden COX-2 inhibisyonu sorumludur. Antiagregan ve peptik ülser aracılık eden etkisi ise COX-1 inhibisyonuna bağlıdır (26).

Aspirinin terapötik etkileri çoğunlukla GİS komplikasyonları ile sınırlanmaktadır. Klasik NSAİİ'nin kullanımı ile üst GİS kanama riskinde artış olduğu bilinmektedir. Düzenli aspirin kullanımı sonucu bir yılda peptik ülser gelişme olasılığı %15-20 olup, hastaların %3'ünde kanama ve/veya perforasyon oluşur (27). Aspirin ile oluşan gastrointestinal lezyonlar tüm formülasyonlar ve tüm dozajlarda olabilmektedir. Göreceli olarak düşük dozda kanama riski daha az olmasına karşın, yine de anlamlı düzeyde yüksektir. Weisman ve Graham'ın metaanalizinde düşük doz aspirinde (<325 mg/gün) GİS kanama riskinin 2.5 kat

arttığı bulunmuştur (28). Yine 325 mg'ın altında 3 değişik aspirin formülasyonu (düz, enterik kaplı ve tamponlanmış) ile yapılan çalışmalarda, mide ve duodenal kanama risklerinde formülasyonlar arası anlamlı fark saptanmamıştır (29).

Bu ilaçların mide mukozasında yapmış olduğu hasarın mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat, aspirinin gastrointestinal sistem yan etkilerinin mekanizmasında sitoproteksiyonda rol oynayan PG sentezinin inhibe olması önemli yer tutar. PG yapımının baskılanması, mukus ve bikarbonat sekresyonunda azalma, mukoza kan akımında azalma, lokal iritasyon etki ve mukoza geçirgenliğinde artış suçlanan mekanizmalardır (24). Öte yandan, aspirinin mukozaya doğrudan temasının da lezyon yapıcı etkisi bulunmaktadır. Gastrik pH'da eriyen zayıf bir asit olan aspirin, diffüzyon ile mukoza hücrelerine geçerek hasarlanmaya yol açar ve asidin geri diffüzyonunu başlatarak erozyon, hatta ülser oluşumuna sebep olabilir (30).

NSAİİ, gastrik asit sekresyonunu ve mukozanın Na^+ ve H^+ iyonlarına karşı geçirgenliğini artırırlar. Mide mukus oluşumunu azalttıkları ve mukus tabakasının kalınlığını değiştirdikleri gösterilmiştir (31). Ayrıca COX inhibisyonu ile lökotrien sentezinde artış olduğu ve böylece bu olaylar sırasında ortaya çıkan serbest radikallerin damarlara doğrudan zarar vermesiyle mukozal hasarın arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (32).

Çeşitli çalışmalarda, NSAİİ'nin neden olduğu gastrit patogeneğinde SOR'nin rolü incelenmiş, deneysel modellerde serbest radikal temizleyicilerin mide hasarlanmasının şiddetini azalttığı bulunmuştur (19, 33). Bazı deneysel modellerde de, NSAİİ'nin gastropati patogeneğinde damar endotel hücrelerine lökosit adhezyonunun esas rol oynadığı ortaya konmuş; tedavi edici dozda indometazin ve aspirinin midede lökosit adhezyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (34, 35).

2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, orbitallerinde eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi gösteren maddelerdir. Genellikle radikal olmayan herhangi bir molekül veya atoma elektronun girmesi çıkması ile

meydana gelirler. İnsan vücudunda bütün hücelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O_2), yapısı itibariyle radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında SOR akla gelmektedir. Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan SOR ile antioksidan defans sistemi bir denge halindedir. Yoğun SOR üretimi ya da antioksidan defansın azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur. PMNL'in aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, SOD, nitrik oksit sentaz (NOS) ve MPO gibi enzimler süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve hipokloröz asit (HOCl) gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar (36, 37, 38). Aşırı reaktif bu maddeler, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerek, onların kimyasal yapılarını değiştirmek suretiyle kararsız (reaktif) bir atom haline gelmesine yol açabilirler.

Serbest radikaller hücrede lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir (39, 40). Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres”, sonuçta bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkım ve doku hasarını getirir.

Oksidatif hasarın oluştuğu dokuda artan radikal metabolitler ve bunların oluşturduğu lipit peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu hücre membranında kontrol kaybolur; geçirgenlik artışı ve hücresel ölüm gelişir (39, 41). Günümüzde serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücresel yaşamı tehdit ve tahrip ettiği, genetik mutasyonlara yol açtığı bilinmektedir (42, 43). Bu bağlamda SOR'nin düzeylerini arttırıcı etkenler olarak özellikle oksidatif strese yol açan nedenlerin bilinmesi, bunlardan uzak durulması oldukça önemlidir.

2.3. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır :

A) Eksojen kaynaklar

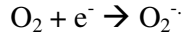
- Radyasyon etkisi
- Bağışıklık yapan maddeler: alkol, uyuşturucu vs.
- Ksenobiyotikler: hava kirliliği, hiperoksi, pestisitler, solventler, anesteziik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı vs.
- Antineoplastik ajanlar
- Stres; streste katekolamin düzeyi artar, artan katekolamin oksidasyonu ile radikal üretimi artmaktadır.

B) Endojen kaynaklar

- Mitokondrial elektron transport sistemi
- Oksidatif stres durumları (iskemi, travma, intoksikasyon gibi durumlara bağlı olarak)
- Peroksizomlarda bulunan enzimler
- Enzimler ve proteinler; XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vs.
- Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiotikler vs.
- Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)
- Makrofaj gibi fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama
- Plazma membranı enzimleri; NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu vs. Nötrofiller fagositoz esnasında, membran ve sitoplazmalarında bulundukları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virus, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem ana hem de ara ürün olarak çok fazla miktarda SOR oluşur (44).

2.4. Serbest Oksijen Radikal Türleri

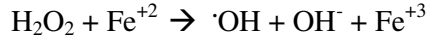
Serbest radikaller ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tarif edilmektedir. Biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikaller şüphesiz oksijen radikalleridir. İskemi, hemoraji, intoksikasyon, radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerde aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları oluşur. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit, O_2^-) oluşturmaktadır.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur (45).



Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin daha reaktif ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan hidroksil radikalini (OH^\cdot) oluşturur.



Bu ifade edilen reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (46).

2.5. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

2.5.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlara serbest radikallerin etki etmesi lipid peroksidasyonu üzerinden membranların poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına yol açabilir.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (47). Lipid peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir fenomendir. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon

sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri ($LOO\cdot$) bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (47). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile rölatif olarak daha stabil olan son ürün MDA oluşur (47). Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (48). MDA'nın kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde bir çok yapıya zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur.

2.5.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Protein ve nükleik asitler serbest radikal etkilerine karşı poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır (49). Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (50).

2.6. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

2.6.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

E Vitamini: E vitamini tokoferol yapısındadır. Dört tipi vardır. Alfa-tokoferol en fazla bulunan ve antioksidan etkisi en fazla olan şeklidir. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır (47, 51). Membranların lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Hücre membranlarında O_2^- , OH^- gibi radikalleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu tepkimelerini engeller (52).

Sellüler ve subsellüler membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturduğu ve bu nedenle bu bölgelerde yoğunlaştığı düşünülmektedir.

E vitamini antioksidan özelliği nedeniyle birçok çalışmada kullanılmıştır. İskemi/reperfüzyon ve aspirinin neden olduğu mide mukoza hasarına karşı koruyucu etkisi deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (7, 53). Jaarin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçanların yemlerine 4 hafta boyunca günlük 50 mg/kg E vitamini eklenmesinin aspirinin neden olduğu mide lezyonlarını önlemede etkili olduğu görülmüştür (7). Başka bir çalışmada, günlük 100 mg/kg E vitamini intramuskuler verilmesinin, sıçanlarda stresin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak gastrik mukozal hasara karşı koruyucu olduğu saptanmıştır (54).

C vitamini: Ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalının doğrudan temizleyicisidir (52).

Seruloplazmin: SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Bu sayede serbest radikal oluşmasını inhibe eder (55).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir (56).

Ürik asit: Normal plazma konsantrasyonlarında süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizler (55).

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, LOOH ve HOCl toplayıcısıdır (55).

Bilirubin: Serbest radikal tutucusudur, süperoksit ve hidroksil radikal toplayıcısıdır (56).

Piruvat: Güçlü antioksidandır ve H₂O₂ bağlayıcı özelliği vardır (57).

Taurin: Lipid peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek antioksidan etkili olduğu gösterilmiştir. Taurin sıçanlarda MTX'in yol açtığı doku hasarını önlemiştir. Ksenobiotiklere bağlanma yeteneği vardır. Hipoklorit ile de reaksiyona girerek etkisini azaltır (58).

β-Karoten: Vitamin A'nın prekürsörüdür. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek onları inaktif hale getirir (59).

Melatonin: Pineal bezden salgılanan indolamin yapısında bir hormondur. Yüksek lipofilik özelliği olup membranları kolaylıkla geçer. Melatonin antioksidan olarak özellikle ·OH radikalini ortadan kaldırmada çok etkilidir (60).

Glutasyon: Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan antioksidandır. Redükte glutasyon (GSH)/ okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalır. Karaciğerde, genetik bilgiye gerek olmadan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (61).

Sistein: Serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır (47).

Hemoglobin oksidanları, haptoglobin hemoglobini, hemopeksin de serbest hemi bağlayarak antioksidan özellik göstermektedir.

2.6.2. Enzimatik Antioksidanlar

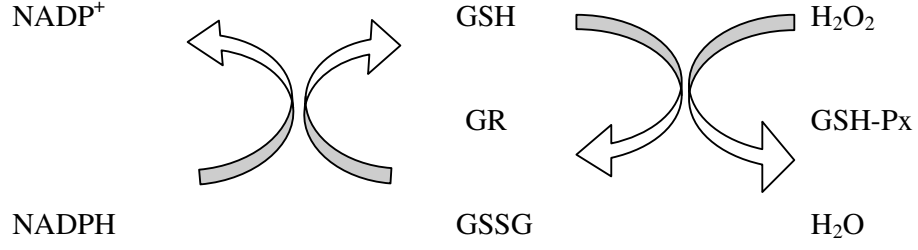
Başlıca antioksidan enzimler; Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD)'dir (61).

2.6.2.1. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px yapısında bir metal olan selenyumu bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutasyona çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda H₂O₂'i yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir (Şekil 1). GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda glutasyon peroksidaz enzimi H₂O₂'i suya indirger. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutasyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (61).

Reaksiyon şu şekildedir:

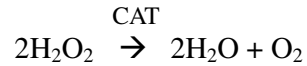




Şekil 1: Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit).

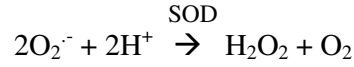
2.6.2.2. Katalaz

Katalaz enzimi, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Özellikle hidrojen peroksite yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (62). Okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksiti direkt olarak suya dönüştürür. Bu enzimin aktivitesi, ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun çok fazla arttığı durumlarda belirgin olarak artmaktadır. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde ise hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (63). Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri, benzer etkisi olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. Katalaz enzimi peroksisomlarda daha etkili iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



2.6.2.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



Hücreyi radikallerin etkisinden koruyan savunma mekanizması arasında SOD enzimi ilk rolü oynar. SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürünün birikimi CAT enzimi tarafından önlenmektedir. SOD enzimi metal ihtiva ettiği için metalloenzim grubundandır. İnsanda sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD) ve mitokondrial SOD (Mn-SOD) ilk defa 1969 yılında McCord ve Fridovic tarafından tanımlanmıştır (64). Ökaryotlarda en son 3 SOD izoformu tanımlanmaktadır. Bunlar ekstrasellüler SOD (ec-SOD), sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD) ve mitokondrial SOD (Mn-SOD)'dur (65).

2.7. Kafeik Asit Fenetil Ester

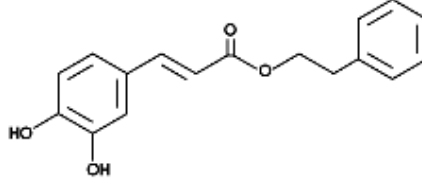
Son yıllarda doğal bazı maddelerin tıbbi özelliklerine yönelik artan bir ilgi vardır. Özellikle bal ve propolis gibi arı ürünleri bu ilginin merkezi konumundadır. Propoliste yaklaşık 100 çeşitten fazla bileşen bulunmuştur. CAPE yapıcı flavonoidlere benzeyen bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir (66).

Yapılan çalışmalarda CAPE'nin antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immünomodülatör olduğu gösterilmiştir (10, 11, 12, 66, 67, 68).

Bunların yanında hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda CAPE'nin transforme olmuş hücrelerde sitostatik özellikleri olduğu fakat normal hücrelerin büyümesini değiştirmediği gösterilmiştir (69, 70).

2.7.1. CAPE'nin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

Yapıca flavonoidlere benzeyen CAPE'nin iki halkasal yapısı vardır (68). Halkalardan bir tanesinde molekülün hemen hemen bütün kimyasal özelliklerini gösteren ve fonksiyonel olan iki "-OH" grubu vardır (Şekil 2). Hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik gösterirler. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliktedir (10, 66). Böylece molekülün kolayca hücre membran yapılarından geçmesi ve etki edeceği bölgeye ulaşması kolaylaşır. Yapılan araştırmalarında CAPE her türlü yoldan rahatlıkla verilebilmekte ve ilgili vücut bölgesine ulaşımı kolay olmaktadır (71).



Şekil 2: Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kimyasal yapısı.

2.7.2. CAPE'nin Antioksidan Etkisi

CAPE, linoleik asit ve araşidonik asitin 5-lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe eder. Yaklaşık olarak 10 µmol/L konsantrasyonda in vitro koşullarda nötrofiller veya ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke ettiği bildirilmiştir (10, 72).

Yılmaz ve ark. streptozosinle diyabet geliştirilen sıçanların karaciğer MDA seviyesi, SOD ve CAT aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, diyabetik sıçanların karaciğerindeki MDA seviyesinin kontrol grubuna göre arttığını, fakat CAPE grubunda kontrol grubu düzeyinde kaldığını; CAPE tedavisi verilen diabetik sıçan karaciğerinde SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığını bildirmişlerdir (73). Yazarlar, CAPE'nin serbest oksijen radikallerini süpürücü etkisinden dolayı diabetik sıçan karaciğerinde SOD ve CAT aktivitelerinde yükselmeyi engellediğini öne sürmüştür (73).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi, Tıbbi Biyoloji ve Patoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı ve çalışmamız etik kurul kurallarına uygun olarak yapıldı.

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 8-12 haftalık, ortalama 250 gr ağırlığında 60 adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23 °C) bulunduruldu ve standard sıçan yemi ile beslendi. Son gün işlemlerinden 24 saat önce katı besin, 2 saat önce de su alımları kesildi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

CAPE SIGMA firmasının, Evigen ampul Aksu Farma firmasının, Aspirin Bayer firmasının üretimidir. Genel anestezi için Ketalar (Eczacıbaşı) kullanıldı. Ayrıca biyokimyasal ölçümler için gerekli kimyasallar; Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (2N), kloroform, n-Butanol, etanol MERCK firmasından; glutathione redüktaz, glutathione-reduced form (GSH C10H17N3O6S), glycine (amino asetic acid; aminoethanoic acid; glycocoll) (C2H5NO2), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form NADPH; C21H27N7O14P2Na2) nitroblue tetrazolium (NBT C40H30C12N10O6), Xanthine (C5H4N4O2), Xanthine Oxidase SIGMA firmasından sağlandı.

3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Aletler

Tablo 1. Kullanılan malzeme ve aletler

1	Çıktmalı santrifüj	(Eppendorf MR 5415, Almanya)
2	Derin dondurucu	(Facis, Fransa)
3	Hassas terazi	(Scaltec, İsviçre)
4	Vorteks (karıştırıcı)	(Nüve NM 100, Türkiye)
5	Otomatik pipetler	(Gilson, Fransa), (Eppendorf MR 5415, Almanya)
6	UV spektrofotometre	(Shimadzu UV 1601, Japonya)
7	Homojenizatör	(Ultra Turrax T25, Almanya)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney protokolü:

Sıçanlar, aşağıda ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi 10'arlı 6 gruba ayrıldı. 14 gün boyunca serum fizyolojik (SF) veya aktif ilaçla intraperitoneal (i.p.) ön tedavi verildi (Tablo 2).

Grup 1 (Normal Kontrol): İlk 14 gün, günde bir kez, 1ml SF i.p. yoldan verildi. 15. gün, orogastrik (o.g.) olarak 1 ml SF uygulandı.

Grup 2 (CAPE Kontrol): İlk 14 gün, günde bir kez, 10 µmol/kg dozunda CAPE i.p. yoldan verildi. 15. gün, o.g. olarak 1 ml SF uygulandı.

Grup 3 (E-vit Kontrol): İlk 14 gün, günde bir kez, 100 mg/kg dozunda E vitamini i.p. yoldan verildi. 15. gün, o.g. olarak 1 ml SF uygulandı.

Grup 4 (ASA): İlk 14 gün, günde bir kez, 1ml SF i.p. yoldan verildi. 15. gün, o.g. olarak tek doz 300 mg/kg aspirin uygulandı.

Grup 5 (CAPE+ASA): İlk 14 gün, günde bir kez, 10 µmol/kg dozunda CAPE i.p. yoldan verildi. 15. gün, o.g. olarak tek doz 300 mg/kg aspirin uygulandı.

Grup 6 (E-vit+ASA): İlk 14 gün, günde bir kez, 100 mg/kg dozunda E vitamini i.p. yoldan verildi. 15. gün, o.g. olarak tek doz 300 mg/kg aspirin uygulandı.

15. gün, o.g. SF veya aspirin uygulandıktan 4 saat sonra sıçanların yaşamına son verilerek mideleri alındı.

Öntedavide aktif ilaç olarak verilen CAPE ve E vitamini dozları literatürlerle uyumlu olarak sırasıyla 10 µmol/kg/gün (73) ve 100 mg/kg/gün (107) dozunda verildi. 15. gün lezyon oluşturuca ajan olarak aspirin 300 mg/kg dozunda verildi.

Deney başlangıcında, ortasında ve 15. gün işlemlerinden önce sıçanların ağırlıkları tartıldı. İlaç uygulamaları hayvanların ağırlıklarına göre yapıldı. 15. gün deneylerine başlamadan 24 saat önce katı besin, 2 saat önce de su alımları kesildi. Orogastrik uygulamalar gavaj iğnesi ile gerçekleştirildi. Gavaj işlemi sırasında E vit + ASA grubundan 2 sıçan öldü. Hayvanların sakrifiye edilmesi genel anestezi ile gerçekleştirildi. Genel anestezi için 1 mg/kg xynlazine + 0.5 ml/kg ketamin i.p. olarak yapıldı. Dekapite edilen sıçanların median hattın yapılan insizyonla batınları açılarak, proksimalde özefagus, distalde pilorları klemplenerek mideleri çıkarıldı. Büyük kurvatur boyunca açılan mideler SF ile yıkanarak makroskopik olarak incelendi.

Tablo 2. Deney protokolü, günlere göre ilaç uygulamaları

GRUP	1 –14 .Günler	15.Gün	
		→ 4 saat sonra	
Grup 1 (Normal Kontrol)	SF (i.p.)	SF (o.g.)	Ex
Grup 2 (CAPE Kontrol)	CAPE (i.p.)	SF (o.g.)	Ex
Grup 3 (E-vit Kontrol)	E vit (i.p.)	SF (o.g.)	Ex
Grup 4 (ASA)	SF (i.p.)	ASA (o.g.)	Ex
Grup 5 (CAPE + ASA)	CAPE (i.p.)	ASA (o.g.)	Ex
Grup 6 (E-vit + ASA)	E vit (i.p.)	ASA (o.g.)	Ex

Not: SF 1ml/gün, CAPE 10 µmol /kg/gün, E vit 100 mg/kg/gün, ASA 300 mg/kg olarak verildi.

i.p. : İntraperitoneal, o.g. : Orogastrik

3.2.2. Makroskopik Değerlendirme

Çıkarılan mideler makroskopik lezyon açısından değerlendirildi ve fotoğraflandı. a: nokta erozyon, b: lineer erozyon, c: yaygın erozyon, d: yaygın hemoraji olarak kaydedildi.

3.2.3. Doku Örneklerinin Alınması

Histolojik ve biyokimyasal incelemeler için doku örnekleri korpus orta kesimden alındı. Histopatolojik inceleme için midenin tüm katlarını içeren örnekler %10'luk formaldehid içinde muhafaza edildi. Biyokimyasal çalışmalar için doku örnekleri -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.4. Histolojik Değerlendirme

Doku örnekleri, H&E ve Toluidin Blue ile boyanarak ışık mikroskopunda (x100, x200 ve x400) incelendi (74). Mukoza lezyonlarının şiddeti, Murakami ve ark.'nın tanımladığı gibi 0'dan 4'e kadar skorlandı (75). Damarsal patoloji değerlendirmesi Konturek ve ark.'nın önerdikleri şekilde 0-2 arasında ve nötrofil akümülyasyonu 0-4 arasında skorlandı (76) (Tablo 3-5).

Tablo 3. Mukoza lezyonu şiddetinin sınıflandırılması.

Evre 0	Mide mukoza hücreleri normal görünümde ve normal şekil, yerleşim ve yoğunlukta.
Evre 1	Yüzeyel mukus hücre haraplanması (vakuollü, piknotik nüveli, parlak boyanmış veya lizise uğramış sitoplazmalı hücreler)
Evre 2	Yüzeyel hücre haraplanması ve gastrik pitleri döşeyen hücrelerin ayrılma ve ekfoliyasyonu.
Evre 3	Gastrik pitler boyunca uzanan, fakat mukoza kalınlığının %50'sinden azını tutan haraplanma.
Evre 4	Mide mukoza kalınlığının %50'sinden fazlasını tutan yaygın mukoza haraplanması.

Tablo 4. Damarsal patolojinin sınıflandırılması.

Evre 0	Normal.
Evre 1	Minimal vazodilatasyon.
Evre 2	Belirgin vazodilatasyon.

Tablo 5. İnflamasyonun sınıflandırılması.

Evre 0	Normal.
Evre 1	40'lık büyütmede 2-5 nötrofil.
Evre 2	5 üzerinde nötrofil
Evre 3	20 üzerinde nötrofil
Evre 4	Folikül oluşturmuş nötrofil kümesi.

Mukoza ve submukozadaki mast hücre sayısı, 42 immersiyon sahası 1 mm² alınarak, Cho ve ark.'nın tanımladıkları yöntemle değerlendirildi (74) .

3.2.5. Mide Dokusunun Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

MDA düzeyini tayin için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı (77). SOD enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının (78), GSH-Px enzim aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının (79), CAT enzim aktivitesi Aebi'nin (80) metoduna göre çalışıldı.

Dokuya nötrofil infiltrasyonunu gösteren MPO enziminin aktivitesi, MPO aracılı H₂O₂ ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrine/phenol solusyonu kullanılarak yapıldı (81).

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 9.0 istatistik programında yapıldı. Gruplarda yer alan sonuçların normal dağılıma sahip olup olmadıklarını belirlemek için non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov testi

kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösteriyordu. Analizde; ölçüm verileri aritmetik ortalama \pm standart sapma, sayım verileri (mast hücre sayımları) ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi. Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık düzeyi iki yönlü olarak alındı ve $p<0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gastrik Mukozanın Makroskopik Değerlendirmesi

Normal kontrol, CAPE kontrol ve E-vit kontrol gruplarında makroskopik lezyon tespit edilmedi. ASA grubunda sıçanların 9'unda lezyon oluştu; bunlardan 6'sında yaygın hemoraji vardı. CAPE öntedavisinin aspirinin oluşturduğu lezyonları belirgin olarak azalttığı görüldü: CAPE+ASA grubundaki 6 sıçanın midesinde lezyon saptanmadı. E-vit+ASA grubunda ise, sadece 1 sıçanda lezyon oluşmadı; fakat lezyonların şiddeti ASA grubundakinden azdı (Tablo 6).

Tablo 6. Lezyonların makroskopik değerlendirilmesi

Gruplar	Lezyonlu sıçan sayısı	Saptanan lezyon türü*			
		a	b	c	d
Normal Kontrol	0/10	-	-	-	-
CAPE Kontrol	0/10	-	-	-	-
E-vit Kontrol	0/10	-	-	-	-
ASA	9/10	1	1	1	6
CAPE + ASA	4/10	3	1	-	-
E-vit + ASA	7/8	2	2	1	2

a: nokta erozyon, b: lineer erozyon, c: yaygın erozyon, d: yaygın hemoraji

Gruplar, saptanan lezyon türüne bakılmaksızın sadece lezyonu olan ve olmayan sıçan sayıları dikkate alınarak karşılaştırıldığında (kesin Fisher testi ile) ASA grubunda lezyonlu sıçan sayısı tüm kontrol gruplarına göre anlamlı olarak fazla saptandı ($p<0.001$). ASA grubu ile CAPE+ASA grubu arasında belirgin farklılık vardı ($p=0.057$). ASA grubu ile E vit+ASA grubu arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı. CAPE+ASA grubu ile E vit+ASA grubu arasında anlamlı düzeyde olmasa da belirgin farklılık ($p=0.066$) saptandı. CAPE+ASA grubu ile tüm kontrol grupları arasında anlamlı düzeyde fark yoktu. E vit+ASA ile kontrol grupları arasında anlamlı düzeyde fark saptandı ($p<0.001$).

4.2. Histolojik Değerlendirme

Sıçan gruplarında histolojik olarak saptanan mukozal hasar, vazodilatasyon ve inflamasyon evrelerinin ortanca (min-max) değerleri Tablo 7’da sunulmuştur. Daha sonra her bir parametre ayrı ayrı ele alınmıştır.

Tablo 7. Farklı tedavi alan sıçan gruplarında histolojik sonuçların ortanca (min-max) değerleri.

Gruplar	Evreleme median (min-max)		
	Mukozal hasar	Vazodilatasyon	İnflamasyon
Normal Kontrol	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
CAPE Kontrol	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)
E-vit Kontrol	1 (0-3) ^{1,2}	1 (0-2) ⁵	0 (0-0)
ASA	2 (1-3) ^{3,4}	1 (0-2) ⁵	1 (0-3) ⁶
CAPE + ASA	1 (0-3) ^{1,2}	1 (0-1) ¹	0 (0-3)
E-vit + ASA	2 (1-3) ^{3,4}	0.5 (0-1)	0 (0-1) ⁷

Veriler, ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir. ¹ Normal Kontrol grubuna göre p<0.01, ² CAPE Kontrol grubuna göre p<0.05, ³ Normal Kontrol ve CAPE Kontrol grubuna göre p<0.001, ⁴ E-vit Kontrol grubuna göre p<0.05, ⁵ Normal Kontrol ve CAPE Kontrol grubuna göre p<0.01, ⁶ Normal Kontrol, CAPE Kontrol ve E-vit Kontrol grubuna göre p<0.01, ⁷ Normal Kontrol, CAPE Kontrol ve E-vit Kontrol grubuna göre p<0.05

4.2.1. Mukozal Hasar Değerlendirilmesi

Normal kontrol grubundaki sıçanların tümünde, yüzeyel epitel haraplanması açısından histolojik değerlendirme normal bulundu. CAPE kontrol grubunda sadece bir sıçanda evre 1 düzeyinde mukoza lezyonu vardı; diğerlerinde lezyon görülmedi. E-vit kontrol grubunda ise, 4’ünde evre 1, 1’inde evre 2, 1’inde evre 3 düzeyinde mukoza lezyonu görüldü. Bu grupta 4 sıçanda mukoza lezyonu yoktu.

ASA grubundaki sıçanların 4’ünde evre 1, 4’ünde evre 2, 2’sinde evre 3 düzeyinde haraplanma vardı. CAPE+ASA grubundaki sıçanların 2’sinde mukoza lezyonu yoktu. 4’ünde evre 1, 3’ünde evre 2, 1’inde evre 3 düzeyinde mukozal hasar

vardı. E-vit+ASA grubundaki sıçanların 1'inde evre 1, 5'inde evre 2, 2'sinde evre 3 şiddetinde mukozal hasar tespit edildi (Tablo 8).

Tablo 8. Mukozal hasar değerlendirme açısından gruptaki sıçan sayılarının dağılımı.

Gruplar	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3
Normal Kontrol	10	-	-	-
CAPE Kontrol	9	1	-	-
E-vit Kontrol	4	4	1	1
ASA	-	4	4	2
CAPE + ASA	2	4	3	1
E-vit + ASA	-	1	5	2

4.2.2. Vasodilatasyon Değerlendirmesi

Normal kontrol ve CAPE kontrol gruplarındaki sıçanların mide mukoza, muskularis mukoza veya submukoza venlerinde vazodilatasyon yoktu. E-vit kontrol grubunda ise sıçanların 4'ünde vazodilatasyon saptanmadı; 4'ünde evre 1, 2'sinde evre 2 düzeyinde vazodilatasyon vardı.

ASA grubundaki sıçanların sadece 2'sinde vazodilatasyon yoktu. Altısında evre 1, 2'sinde evre 2 düzeyinde vazodilatasyon izlendi. CAPE+ASA grubundakilerin 3'ünde vazodilatasyon yoktu; 7'sinde evre 1 düzeyinde vazodilatasyon vardı. E-vit+ASA grubundakilerin ise, 4'ünde evre 1 şiddetinde vazodilatasyon vardı, 4'ünde vazodilatasyon saptanmadı (Tablo 9).

Tablo 9. Vazodilatasyon evreleri açısından sıçan sayılarının dağılımı.

Gruplar	Evre 0	Evre 1	Evre 2
Normal Kontrol	10	-	-
CAPE Kontrol	10	-	-
E-vit Kontrol	4	4	2
ASA	2	6	2
CAPE + ASA	3	7	-
E-vit + ASA	4	4	-

4.2.3. İnflamasyonun Değerlendirilmesi

Kontrol gruplarında inflamasyon görülmedi. ASA grubundaki sıçanların birinde evre 3, birinde evre 2 ve dördünde evre 1 düzeyinde nötrofil infiltrasyonu saptandı. CAPE+ASA grubundakilerden birinde evre 3, birinde evre 2, birinde evre 1 düzeyinde nötrofil birikimi vardı. E-vit+ASA grubundaki 8 sıçandan 2'sinde evre 1 düzeyinde nötrofil infiltrasyonu bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. Deney gruplarında inflamasyon evresi açısından sıçan sayılarının dağılımı

Gruplar	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3
Normal Kontrol	10	-	-	-
CAPE Kontrol	10	-	-	-
E-vit Kontrol	10	-	-	-
ASA	4	4	1	1
CAPE + ASA	7	1	1	1
E-vit + ASA	6	2	-	-

4.2.4. Mukozal Mast Hücre Sayımı

Aspirin uygulanan sıçanların mide mukozalarında normal kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az sayıda mast hücresi saptandı ($p<0.05$). CAPE ve E vitamini öntedavileri, mide mukozası mast hücre sayısını anlamlı olarak arttırmadı (Tablo 11). E vitamini öntedavisi mast hücre sayısını bir miktar arttırdı. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 11. 1 mm²'deki degranüle olmamış mast hücre sayılarının dağılımı

Gruplar	mast hücre sayısı
Normal Kontrol	62.5 (39-72)
CAPE Kontrol	53 (35-75)
E-vit Kontrol	55.5 (38-77)
ASA	37 (16-69) ¹
CAPE + ASA	36 (28-68) ²
E-vit + ASA	44.5 (23-63) ¹

Veriler, ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir. ¹ Normal Kontrol grubuna göre $p<0.05$, ² Normal Kontrol grubuna göre $p<0.01$

4.3. Biyokimyasal Ölçümlerin Değerlendirilmesi

4.3.1. Mide Dokusunda MPO Aktivitesi

Aspirinin neden olduğu MPO aktivitesi artışına ($p<0.01$), CAPE ve E vitamini ile yapılan öntedaviler enzim aktivitesinde azalma şeklinde yanıt verdiler, p değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla, $p<0.01$, $p<0.05$, Tablo 12).

Tablo 12. Deney gruplarında MPO aktiviteleri

Gruplar	MPO (U/g protein)
Normal Kontrol	0.034 ± 0.003
CAPE Kontrol	0.035 ± 0.005
E-vit Kontrol	0.036 ± 0.005
ASA	0.058 ± 0.009 ^{1, 2, 3}
CAPE + ASA	0.033 ± 0.008 ⁴
E-vit + ASA	0.038 ± 0.005 ⁵

Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ¹ Normal Kontrol grubuna göre p<0.01, ² CAPE Kontrol grubuna göre p<0.01, ³ E vit Kontrol grubuna göre p<0.05, ⁴ ASA grubuna göre p<0.01, ⁵ ASA grubuna göre p<0.05.

4.3.2. Mide Dokusundaki MDA Düzeyleri

Lezyon oluşturuıcı olarak aspirin verilen grupta MDA seviyesi normal kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.001). CAPE+ASA grubunda MDA seviyesi normal kontrol grubu ile hemen hemen aynı seviyede bulundu (p<0.001). E vitamini öntedavisi MDA konsantrasyonunu anlamlı olarak azalttı (p<0.01, Tablo 13). Lezyon oluşturuıcı olarak SF verilen CAPE ve E vitamini gruplarında MDA seviyeleri değışmedi.

Tablo 13. Deney gruplarında mide mukozası MDA konsantrasyonları

Gruplar	MDA (nmol/g protein)
Normal Kontrol	0.639 ± 0.033
CAPE Kontrol	0.649 ± 0.055
E-vit Kontrol	0.762 ± 0.038
ASA	1.010 ± 0.081 ^{1, 2, 3}
CAPE + ASA	0.647 ± 0.033 ⁴
E-vit + ASA	0.778 ± 0.095 ⁵

Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ¹ Normal Kontrol grubuna göre p<0.001, ² CAPE Kontrol grubuna göre p<0.001, ³ E vit Kontrol grubuna göre p<0.01, ⁴ ASA grubuna göre p<0.001, ⁵ ASA grubuna göre p<0.01.

4.3.3. Mide Dokusunda Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Lezyon oluşturucu olarak aspirin verilen grupta SOD aktivitesi normal kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldi ($p<0.001$). Aspirinle oluşan SOD enzim aktivitesi artışını, CAPE ve E vitamini öntedavileri anlamlı olarak düşürdü (sırasıyla, $p<0.01$, $p<0.05$, Tablo 14).

ASA grubunda CAT aktivitesi normal kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.01$). Aspirinle oluşan CAT enzim aktivitesi artışını, CAPE ve E vitamini öntedavileri anlamlı olarak düşürdü (sırasıyla, $p<0.001$, $p<0.01$, Tablo 14).

ASA grubunda GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0.05$). Aspirinle oluşan GSH-Px enzim aktivitesi artışını, E vitamini öntedavisi değiştirmediği görüldü. CAPE ntedavisi verilen grupta ise azalma olmakla birlikte bu istatistik öneme sahip değildi (Tablo 14).

Tablo 14. Mide dokusunda SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri

Gruplar	SOD (U/mg protein)	CAT (k/ g protein)	GSH-Px (U/g protein)
Normal Kontrol	0.041 ± 0.003	0.106 ± 0.006	0.014 ± 0.002
CAPE Kontrol	0.040 ± 0.003	0.099 ± 0.012	0.014 ± 0.001
E-vit Kontrol	0.046 ± 0.003	0.112 ± 0.007	0.015 ± 0.001
ASA	0.075 ± 0.003 ^{1,2,3}	0.145 ± 0.011 ^{2,6,7}	0.018 ± 0.002 ^{8,9}
CAPE + ASA	0.064 ± 0.002 ⁴	0.103 ± 0.006 ¹⁰	0.016 ± 0.001
E-vit + ASA	0.066 ± 0.004 ⁵	0.113 ± 0.006 ⁴	0.018 ± 0.002 ⁸

Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ¹ Normal Kontrol grubuna göre $p<0.001$, ² CAPE Kontrol grubuna göre $p<0.001$, ³ E vit Kontrol grubuna göre $p<0.001$, ⁴ ASA grubuna göre $p<0.01$, ⁵ ASA grubuna göre $p<0.05$, ⁶ Normal Kontrol grubuna göre $p<0.01$, ⁷ E vit Kontrol grubuna göre $p<0.01$, ⁸ Normal Kontrol grubuna göre $p<0.05$, ⁹ CAPE Kontrol grubuna göre $p<0.05$, ¹⁰ ASA grubuna göre $p<0.001$

5. TARTIŞMA

Aspirin ve diğ er NSAİİ birçok akut ve kronik inflamatuvar olayda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların istenen etkileri GİS komplikasyonları ile sınırlanmaktadır. Bu ilaçlara bağı lı geliş en peptik ülser ve gastritin etyopatogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, bu lezyonların patogenezinde serbest radikal yapımının önemli yer tuttuğ una ilişkin kanıtlar vardır (82, 83). Gastrointestinal sistemin NSAİİ (84), alkol (85), stres (86) ve *H. pylori* (87) kaynaklı mukozal hasarlanma modellerinde O_2^- , H_2O_2 , OH^- gibi serbest oksijen radikallerinin rolü gösterilmiştir.

Şimdiye kadar pek çok çalışmada deneysel gastrit oluşumu için aspirin kullanılmış ve etki mekanizması ile ilgili çeşitli görüşler belirtilmiştir. Literatür taramalarımıza göre sıçanlarda deneysel gastrit oluşturmak için kullanılan aspirin'in dozu genellikle 50-400 mg/kg arasında değı şmektedir ve aspirin'in doza bağı mlı mukozal hasar oluşturduğ u saptanmıştır (88). Çalışmamızda, daha önceki çalışmalarda en sıklıkla kullanılan ve ortalama bir doz olan 300 mg/kg'lık aspirin dozu tercih edilmiştir. Diğ er taraftan, önceki çalışmalarda o.g. olarak aspirin'in verilmesinden sonra farklı saatlerde (2 ila 6 saat sonra) hayvanların yaşamına son verildiğ i görülmüştür (7). Biz en çok tercih edilen ve ortalama bir süre olan 4. saati seçtik.

Deney sonunda beklenen şekilde SF verilen gruplarda makroskopik olarak lezyon oluşmadı. Koruyucu öntedavi verilmeden o.g. yoldan aspirin verilen sıçanların mide mukoza lezyonları beklendiğ i gibi diğ er gruplara göre belirgin derecede fazlaydı. CAPE öntedavisi alan sıçanların 6'sında (%60) lezyon gözlenmedi ve bu grupta oluş an en şiddetli lezyonun lineer erozyon olması dikkat çekiciydi. Oysa, E vitamini öntedavisi sadece bir sıçanda lezyon oluşumunu engelledi ve iki sıçanda yaygın hemoraji geliş mesini önleyemedi. Bu bulgular, CAPE'nin, E vitaminine göre makroskopik lezyonları önlemede daha başarılı olduğ una işaret etmektedir.

Aspirinin PG sentezini inhibe ederek mukus ve bikarbonat sekresyonunun, yüzey aktif fosfolipidlerin ve mukoza kan akımının azalmasına neden olduğ u ve böylece mide mukozasının koruyucu unsurlarını zayıflattığ ı bilinmektedir (89).

Bunun dışında direkt olarak mukozayı hasarlandırıcı etkisi de bulunmaktadır. Gastrik pH'da eriyen zayıf bir asit olan aspirin, diffüzyon ile mukoza hücresine geçip hasara neden olmakta ve asidin geri diffüzyonunu başlatmaktadır; böylece mukoza hücreleri, kapiller ve venlerin yıkımına neden olan bir süreci tetiklemektedir. Bu şekilde erozyona, hatta ülsera sebep olabilir (30). NSAİİ tarafından lökotrein sentezinin artırılması da vasokonstrüksiyona ve vasküler permeabilite artışına yol açarak SOR üretimine katkıda bulunur. Mukozada ATP sentezini ve hücre turnoverini azaltır. Tüm bu değişiklikler hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve toplamda serbest radikal üretimini artırarak mide hasarını başlatabilir (1, 33). NSAİİ gastrik peroksidazı inhibe edip mukozal H₂O₂ ve OH⁻ seviyelerini arttırarak da oksidatif mukozal hasara sebep olabilir (90). Artan OH⁻ lipid peroksidasyonuna sebep olur ve aspirin ile uyarılmış gastrik lezyonları artırır (19).

Önceki çalışmalar serbest radikal temizleyicilerin deneysel modellerdeki mide hasarının şiddetini azalttığını göstermiştir (19, 33). Başlıca antioksidan enzimler; süperoksit anyonlarını ortadan kaldıran SOD, hidrojen peroksit miktarını azaltan GSH-Px ve CAT'dır. Dokularda ortaya çıkan oksijen radikalleri antioksidan enzim aktivitelerini değiştirmektedir. Ortamda O₂⁻ radikalinin artmış olması SOD enzim aktivitesini, H₂O₂'in artmış olması GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerini dolaylı olarak arttırmaktadır. Literatürde mide mukoza hasarı oluşturulan deneysel modellerde antioksidan enzimlerin düzeyleri hakkında değişik sonuçlar vardır. Gastrit oluşturulan sıçanlarda SOD, GSH-Px ve CAT enzim düzeylerinin azaldığını (91) veya arttığını (92, 93) belirten çalışmalar vardır. Bir çalışmada 30 gün süreyle 10 mg/kg/gün dozunda aspirin verilen insanların eritrositlerinde MDA düzeyi ile birlikte CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada 440 mg/kg/gün aspirin verilen gün domuzların kalp dokuları incelendiğinde MDA düzeyi artmış, SOD azalmış, GSH-Px değişmemiştir. CAT enzim düzeyi ise artmış ama istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (94). İndometazinle gastrit uyarılan bir deneysel çalışmada MDA düzeyi artarken CAT enzim aktivitesi de yüksek bulunmuştur (93). 10 ml/kg etanol ile oluşturulan mide mukoza hasarında özellikle O₂⁻ artışına bağlı olarak SOD enzim aktivitesinin kayda değer olarak arttığı izlenmiştir (95).

Çalışmamızda aspirin verilerek mide hasarı oluşturulan grupta SOD, CAT, GSH-Px enzim düzeylerinin arttığını bulduk. Mide dokusunda CAT aktivitesindeki artış, oksidatif stres artışına adaptif bir cevap olabilir. Böylece CAT aktivite artışı endojen H₂O₂ artışı ile birlikte olan yüksek derecede bir oksidatif stresin belirtici olabilir. SOD, O₂⁻ radikalini H₂O₂'e dönüştüren reaksiyonu katalize ederek O₂⁻ radikalininin toksik etkisine karşı hücreyi korur. Saptadığımız SOD enzim aktivitesi artışı da mide dokusunda oksidatif stres artışının bir başka işareti olabilir. CAPE ve E vitamini tedavileri ile söz konusu radikallerin ortamdaki süpürülmesi ile antioksidan enzim düzeylerindeki artış önlenmiş olabilir. GSH-Px, H₂O₂ eliminasyonunda rol alan önemli bir antioksidan enzimdir. GSH-Px aktivite artışı hasarlı mide dokusunda oluşan H₂O₂ miktarının artışına işaret edebilir. Fakat CAPE ve E vitamini tedavileri ile GSH-Px aktivitesinde bir değişiklik olmamıştır.

SOR, doymamış yağ asitlerini yıkarak membranlarda lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (51, 96). Lipid peroksidasyonu ile membran proteinlerindeki hasarlanma membran geçirgenliğini, enzim ve reseptörlerin aktivitelerini ve hücrelerin aktivasyonunu azaltmaktadır. Bunun sonucunda mukoza hasarlanmasının önü açılmaktadır. MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Çalışmamızda, lipid peroksidasyonun indirekt göstergesi olarak mide dokusu MDA konsantrasyonu ölçülmüştür. Aspirinin uyardığı mukoza haraplanması sonucunda MDA konsantrasyonunun arttığını bulduk; bu durum aspirin gastropatisinde serbest radikallerin yer aldığını göstermektedir. Ayrıca, aspirinle gastrit uyarılan mide dokusunda MDA konsantrasyonu yükselmesini CAPE ve E vitamini öntedavilerinin önlediğini saptadık. Bu bulgu, bu ilaçların aspirin gastropatisindeki olumlu etkinliğinin mekanizmalarından en azından birinin, serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu önleme olduğunu ima etmektedir.

NSAİİ gastropatisi patogenezinde, mide mukozasına olan nötrofil infiltrasyonu önemli bir süreçtir. Santucci ve arkadaşları indometazinle oluşturulan mide mukoza hasarında, TNF- α düzeylerinin nötrofil marginasyonu ve mukoza hasarı ile orantılı şekilde arttığını saptamışlardır (97). Nötrofillerin mide mikrosirkülasyonuna adezyonu mukoza hasarının erken basamaklarını teşkil eder. Hasarlı bölgede nötrofil infiltrasyonu ile konjesyon oluşmakta ve konjesyon sonucu mikrovasküler iskemi meydana gelmektedir. İskemi de serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (98, 99).

Çalışmamızda, aspirinle gastrit uyarılan sıçanların mide dokusunda nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan MPO aktivitesinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, CAPE ve E vitamini ötedavilerinin MPO enzim aktivitesini kontrol grubuna yakın düzeylere indirdiği gözlenmiştir.

CAPE, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile ön plana çıkan bir molekül olarak pek çok çalışmada kullanılmıştır. Diyabetik sıçan karaciğerinde oksidatif hasarı CAPE'nin önlediği gösterilmiştir (73). Diyabetik sıçanların karaciğerinde MDA seviyelerinin kontrol sıçanlara göre arttığı ve CAPE grubunda kontrol grubunun düzeyinde kaldığı gösterilmiştir. CAPE tedavisi verilen diabetik sıçan karaciğerinde SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığı, GSH-Px düzeyinin ise değişmediği görülmüştür. Sıçan ince barsağında reperfüzyon hasarını önlemede CAPE'nin etkisini araştıran Koltuksuz ve arkadaşları, CAPE'nin SOR oluşumunu önlediğini ve lökosit infiltrasyonunu inhibe ederek dokuyu hasardan koruduğunu bildirmişlerdir (100). Böbrek iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı oluşturulan bir çalışmada CAPE, E vitamininden daha etkili bir şekilde I/R hasarını baskılamış ve lipid peroksidasyonunu azaltmıştır (101).

CAPE 10µmol/L konsantrasyonda nötrofillerden SOR üretimini inhibe etmiştir (10). Ayrıca CAPE, nükleer transkripsiyon faktörü kapp B (NF-kB) aktivasyonunu potent ve spesifik olarak engellemektedir (102). NF-kB inhibisyonu CAPE'nin antiinflamatuvar, antioksidan, antikanserojen etkileri için oldukça önemlidir. Bilindiği gibi NF-kB proinflamatuvar sitokinler (IL-1, TNF vb), bakteriyel ürünler, oksidatif stres gibi birçok faktör tarafından indüklenmektedir.

Literatür taramalarımızda, aspirinle oluşturulan mide mukoza hasarlanması üzerine CAPE'nin etkisini araştıran bir makaleye rastlamadık. Çalışmamız bu konuda yapılan ilk araştırmadır. CAPE'nin normal mide mukozası üzerine zararlı etkisinin olmadığını gözledik. Makroskopik olarak aspirin ile oluşturulan lezyonları önemli derecede azalttığını ve aspirinin neden olduğu antioksidan enzim aktivitelerindeki artışı GSH-Px dışında anlamlı olarak düşürdüğünü saptadık.

MPO aktivitesinin ölçümü dokuda inflamasyonun şiddetini ve invaze olan nötrofillerin miktarını tayin etmede oldukça önemlidir. Çalışmamızda i.p. CAPE ötedavisi, aspirinin uyardığı mide mukozası MPO aktivitesi artışını önleyerek

kontrol grubuna yakın düzeye getirmiştir. Bu bulgu, CAPE'nin mide dokusuna nötrofil invazyonunu engellediğini ima etmektedir. E vitamini de CAPE'ye benzer bir etki göstermekle birlikte CAPE kadar etkin olmamıştır.

Oksidatif stres SOR miktarındaki artışla seyreden bir durumdur. Bu artış membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu organizmada moleküler hasarlara sebep olarak önemli hücresel yapıları ve fonksiyonları etkiler. Aspirin ile oluşturulan gastrit modelinde hücrenin hasara uğraması ve inflamasyonun artmasında membran yapılarının bozularak hücrelerin savunmasız hale gelmesi önemli rol oynar. MDA lipid peroksidasyon işleminin son ürünüdür. CAPE hem radikal süpürücü etkisi hem de nötrofil invazyonunu önleyici etkisi ile MDA düzeylerini azaltarak mide mukoza hasarını en aza indirmektedir. E vitamini daha az etkili bir şekilde MDA düzeylerini düşürmüştür.

E vitamini biyolojik sistemlerde doğal olarak bulunan bir antioksidandır. Membran fosfolipidleri ile yakın ilişkisi nedeniyle hücre membranlarında yoğun olarak bulunur. Poliansatüre yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruyan önemli bir antioksidandır. Serbest radikal zincir reaksiyonunu ve lipid peroksidasyonunu bloke ederek deneysel mide lezyonlarının şiddetini azalttığı gösterilmiştir (103). Oksidatif stres sonucu E vitamininin tüketilmesinden kaynaklanan, dokularda vitamin E azalması, kolayca mukozal lezyonlara yol açabilir. Bu şekilde E vitamininin mide mukozası üzerine bir antioksidan koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (104). Diyete vitamin E eklenmesinin deney hayvanlarında aspirin ile uyarılan gastritin şiddetini azalttığı da saptanmıştır (7, 8). Ayrıca mide mukoza korumasında, PGE₂ düzeyini normale getirdiği de saptanmıştır (91).

Bununla birlikte stresle oluşturulan mide lezyonlarına E vitaminin etkisi olmadığını belirten çalışmalar da vardır (105). Yine bir çalışmada indometazin uygulaması ile oluşturulan mide lezyonlarına E vitaminin etkili olmadığı belirtilmiştir (106). Ayrıca, konnektiv dokudan mast hücre degranülasyonuna yol açan C48/80 ile yapılan akut gastrik lezyonda E vitamininin histamin ve serotonin salınımını etkilemediği gösterilmiştir (107). Aynı çalışmada E vitamini 50,100 ve 250 mg/kg dozlarında oral olarak verilmiştir. 100 ve 250 mg/kg dozlarında E vitaminin oksidatif stresi, mide mukus azalmasını ve de endotel hücrelerine nötrofil adezyonunu engelleyerek sıçanlarda akut mide lezyonunu önlediği belirtilmiştir.

Çalışmamızda E vitamini i.p. yoldan 100 mg/kg dozda verildi. E vitamini ötedavisi yapılarak aspirin gastropatisi uyarılan grupta sadece bir sıçanda lezyon oluşmadı (%12,5); 2 sıçanda ise yaygın hemoraji izlendi. CAPE ile karşılaştırıldığında E vitaminin mide mukozası üzerine koruyucu etkisinin daha az olduğu gözlemlendi. Yukarıda belirtildiği gibi, E vitaminin antioksidan enzim düzeyleri, MDA ve MPO enzim aktiviteleri üzerine, CAPE'ye paralel, fakat onun kadar güçlü olmayan bir etkisi olduğunu gözledik. En azından sunulan deney modelinde CAPE, E vitamininden daha etkili bir antioksidan / radikal süpürücü gibi görünmektedir. Ayrıca PG'lerin E vitamini ile etkileşimi ve mide mukozası üzerine koruyucu etkisi bilindiğine göre, aspirinin neden olduğu mide hasarında PG inhibisyonu yanı sıra serbest radikal oluşumu, oksidatif stres ve nötrofil infiltrasyonunun önemli mekanizmalardan biri olduğu sonucuna varabiliriz. Santucci ve arkadaşları, indometazinle mide hasarı oluşturulan sıçanlarda pentoksifilin tedavisinin mide mukozası PG seviyelerini etkilemediğini saptamışlardır. Adı geçen ajanın mide mikrosirkülasyonuna nötrofil adezyonu ile birlikte TNF- α sentez ve salınımı inhibe ederek etkili olduğu saptanmıştır (97).

Mast hücreleri vücutta yaygın olarak bulunan metakromatik hücrelerdir. Mast hücreleri sitoplazmalarında toluidin mavisi ve metakromasi veren boyama yöntemleri ile pozitif sonuç alınan membranlı granüller içerir (108). Gastrointestinal inflamasyonda hiperemi, protein ve sıvılara karşı vasküler geçirgenlik artışı, hasar bölgesine lökosit toplanmasının artışı mast hücrelerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. İnflamasyonlu mide mukozalarında mast hücresi varlığı ve artışı görülmektedir (109). Nakajima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, mukozada mast hücre yoğunluğunun artışı polimorfonükleer ve mononükleer hücre yoğunluğunun artışı ile orantılı bulunmuş, aktif H. pylori gastritinde mukozadaki mast hücrelerinin nötrofil toplanmasında aktif rol aldığı öne sürülmüştür (108).

Stachura ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sıçanlarda aspirin ile oluşturulan gastritte, mast hücre sayısının mide mukozasında hasar ile arttığı gözlenmiştir (110). Bazı çalışmalarda da mide mukoza hasarında histolojik kesitlerde mast hücre sayılarının azaldığı görülmüştür. Bu azalmanın mast hücrelerinin degranülasyonu ile olduğu belirtilmiştir. Kimyasal ajanlarla midede mukozal bariyerin bozulması ve H⁺ iyonu geri difüzyonu mast hücrelerinde

degranülasyona yol açmaktadır. Sonuçta histamin salınımı artarak gastrik hiperemik cevap oluşmaktadır. Bu şekilde mukozal mast hücrelerinin sayısı azalmaktadır. Hasar öncesi mast hücre stabilizatörü verilen sıçanlarda degranülasyonun engellendiği ve histamin salınımının da önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (111).

Çalışmamızda 300 mg/kg aspirinin mide mukozasında degranüle olmamış mast hücre sayısını önemli olarak azalttığı gözlenmiştir. Aspirin mast hücre degranülasyonuna neden olmuştur. Fakat CAPE ve E vitamini öntedavilerinin mast hücre sayılarına anlamlı düzeyde etki etmediği görülmüştür. Bu bulgular, aspirinle oluşturulan gastritte, CAPE ve E vitamini öntedavilerinin olumlu etkinliğinin mast hücreleri üzerinden olmadığına işaret etmektedir.

Bu çalışmada, sıçanların mide mukozasının histojik incelemesinde yüzeyel epitelin her iki öntedaviyle de tam olarak korunmadığı görüldü. Bununla birlikte öntedavi verilen grupların hepsinde, koruyucu tedavi verilmeden aspirine maruz bırakılan gruba göre daha iyi sonuçlar elde edildi. Özellikle CAPE grubunda en iyi dereceler izlendi. Bu sonuçlar makroskopik bulgular ile paralellik gösteriyordu. Aspirin ve diğer ajanlarla yapılan deneysel gastrit modellerinde makroskopik ve mikroskopik değerlendirmenin farklı olabileceği belirtilmiştir. Sadece bir parametre ile sonuca gidilemeyeceği ama fikir vermesi açısından her birisinin önemli olduğu belirtilmiştir.

6. SONUÇ

Aspirin sıçan mide mukozasında kayda değer bir haraplanma meydana getirmiştir. Makroskopi ve biyokimya sonuçları dikkate alındığında, CAPE öntedavisi mide mukoza haraplanmasını büyük ölçüde azaltmıştır; E vitaminin koruyucu etkisinin daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Sıçan mide dokusunda aspirinin neden olduğu -lipid peroksidasyonunun son ürünü- MDA ve -dokuya nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan- MPO enzim aktivitelerinin yükselmesini, CAPE ve E vitamini anlamlı olarak azaltmıştır. Sonuç olarak bulgularımız, klinikte aspirin ve diğer NSAİİ komplikasyonlarının önlenmesinde CAPE'nin yararlı bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

7. ÖZET

AMAÇ: Aspirinle oluşturulan mide mukoza lezyonlarının önlenmesinde kafeik asit fenetil ester (CAPE)'nin etkinliğini araştırmak ve CAPE'nin koruyucu etkinliğini E vitamini ile karşılaştırmak.

MATERYAL VE METOD: Çalışmaya, 60 erkek Wistar-albino sıçan alınarak, 10'arlı 6 gruba ayrılmıştır. Sıçanlara 14 gün boyunca serum fizyolojik (SF) veya aktif ilaçla intraperitoneal öntedavi verilmiştir. Aktif ilaç olarak CAPE (10 µmol/kg/gün) ve E vitamini (100 mg/kg/gün) kullanılmıştır. 15. gün kontrol gruplarına SF, aspirin gastriti uyarılacak gruplara orogastrik yoldan aspirin (300 mg/kg) verilmiştir. 4 saat sonra hayvanların yaşamına son verilerek laparotomi yapılmış ve mideleri çıkarılmıştır. Mide mukozası makroskopik ve histolojik olarak değerlendirilmiş, ayrıca mide dokusunda malondialdehit (MDA) konsantrasyonu, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve myeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ölçülmüştür.

BULGULAR: Sıçanlarda aspirin, hem makroskopik hem de mikroskopik olarak değişik derecelerde mide mukoza hasarına yol açmıştır. CAPE, E vitamini öntedavisine göre, aspirinle uyarılan gastrik lezyonları makroskopik ve mikroskopik olarak daha fazla azaltmıştır. Mide dokusunda aspirinle uyarılan MPO aktivitesi artışı CAPE ve E vitamini öntedavileri önemli derecede azaltmıştır (sırasıyla, $p<0.01$, $p<0.05$). Aspirin mide dokusu MDA konsantrasyonunu normal kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseltirken ($p<0.001$), CAPE ve E vitamini öntedavileri aspirinin uyardığı MDA konsantrasyonunu artışı anlamlı olarak azaltmıştır (sırasıyla, $p<0.001$, $p<0.01$). Aspirin mide dokusu SOD aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseltmiş ($p<0.001$), CAPE ve E vitamini öntedavileri düşürmüştür (sırasıyla, $p<0.01$, $p<0.05$). CAT enzim aktivitesinde de benzer değişiklikler olmuştur. Aspirin, mide dokusunda GSH-Px aktivitesini kontrol grubuna göre yükseltirken ($p<0.05$), CAPE ve E vitamini öntedavileri anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

SONUÇ: Bulgularımız, klinikte aspirin ve diğer NSAİİ komplikasyonlarının önlenmesinde CAPE'nin yararlı bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

8. ABSTRACT

AIM: We investigated the protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on aspirin induced gastric mucosal injury in rats comparing protective effect of vitamin E.

MATERIALS AND METHODS: Sixty male Wistar rats were randomly divided into six groups. Control group received intraperitoneal serum physiologic (0.9%, w/v), experimental groups were intraperitoneally pretreated with CAPE (10 $\mu\text{mol/kg/day}$) and vitamin E (100 mg/kg/day) for 14 days. At the 15th day of the study, aspirin (300 mg/kg) was given to treatment groups by gastric gavage. All the animals were sacrificed after 4 hours aspirin treatment and stomach tissue samples were taken, for histological evaluation and determination of malonyldialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and myeloperoxidase (MPO) enzyme concentration.

RESULTS: Aspirin caused to macroscopic and microscopic gastric mucosal injury. CAPE and vitamin E have protective effect at different levels. Pretreatment with CAPE ($p<0.01$) and vitamin E ($p<0.05$) resulted in significant decrease in the increased MPO enzyme activities of aspirin administrated groups. MDA levels and SOD activities were significantly increased in the tissue samples of aspirin groups although their values were significantly decreased in CAPE ($p<0.01$) and vitamin E ($p<0.05$) pretreated groups. Same changes were observed in the catalase activities of the groups. GSH-Px activities were higher in aspirin groups than in control groups although its activity did not change by CAPE and vitamin E administration.

CONCLUSION: CAPE may be have protective effect on the aspirin induced gastric mucosal lesions.

9. KAYNAKLAR

1. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Iinuma S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahashi S, Kondo M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and anti-oxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 1993; 34: 732-737.
2. Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, Arai M, Matsuyama K, Iinuma S, Yagi N, Naito Y, Miyasaka M, Kondo M. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2300-2304.
3. Schoen RT, Vender RJ. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med* 1989; 86: 449-458.
4. Cryer B, Feldman M. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on endogenous gastrointestinal prostaglandins and therapeutic strategies for prevention and treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced damage. *Arch Intern Med* 1992; 152:1145-1152.
5. Pritchard KA, Karpen CW, Merola AJ, Panaganamala RL. Influence of dietary vitamin E on platelet thromboxane A2 and vascular prostacyclin I2 in rabbit. *Prostaglandins Leukot Med* 1982; 9: 373-376.
6. Sakamoto W, Fujie K, Nishihira J, Mino M. Vitamin E inhibits PG2 and O2 production in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1074: 251-255.
7. Jaarin K, Gapor MT, Nafeeza MI, Fauzee AM. Effect of various doses of palm vitamin E and tocopherol on aspirin-induced gastric lesions in rats. *Int J Exp Path* 2002; 83: 295-301.
8. Stickel F, Meydani M, Wu D, Bronson R, Martin A, Smith D, Meydani SN, Russell RM. Effect of vitamin E supplementation on prostaglandin concentrations in aspirin-induced acute gastric injury in aged rats. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 1218-1223.
9. Sugimoto N, Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, Ichikawa H, Naito Y, Kondo M. Effect of vitamin E on aspirin induced gastric mucosal injury in rats. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 599-605.
10. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1993 Aug 23;329(1-2): 21-24.
11. Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994; 41: 9-13.
12. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35: 77-82.
13. Weinstein WM. Other types of gastritis and gastropathies, including menetrier's disease. (Eds) M. Feldman, L. S. Friedman and M. H. Sleisenger. In: Sleisenger – Fordtran- Gastrointestinal and liver disease. W.B. Saunders Company; 7 Har/Cdr edition. 2002. Pages 711-732.
14. Wallace JL, Tingley AW. Review article: new insights into prostaglandins and

- mucosal defence. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: 227-235.
15. Overmier JB, Murison R, Ursin H. The ulcerogenic effect of a rest period after exposure to water restraint stress rats. *Behav Neural Biol* 1986; 46: 372-382.
 16. Yoshikawa T, Naito Y, Ueda S. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12: 65-71.
 17. Yoshida M, Wakabayashi G, Otani Y. Active oxygen species generation by circulating leucocytes and gastric submucosal microcirculatory disturbances in the early period after thermal injury. *J Clin Gastroenterol* 1995; 21: 87-92.
 18. Huribal M, Cunningham ME, D' Aiuto ML. Endothelin-1 and PGE2 levels increase in patients with burns *J Am Coll Surg* 1995; 180: 318-322.
 19. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mukosal injury. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 1395-1401.
 20. Wilcox CM, Alexander LN, Straub RF, Clark WS. A prospective endoscopic evaluation of the causes of upper GI hemorrhage in alcoholics: A focus on alcoholic gastropaty. *Am J Gastroenterol* 1996; 101: 1343-1347.
 21. Hauge T, Persson J, Kjerstadius T. *Helicobacter pylori*, active chronic antral gastritis and gastrointestinal symptoms in alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1994; 18 (4) : 886-888.
 22. Szelenyi I, Brune K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 865-871.
 23. Sarfeh IJ, Tarnawski A. Increased susceptibility of the portal hypertensive gastric mucosa to damage. *J Clin Gastroenterol.* 1991; 13: 518-521.
 24. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol* 1971; 231: 232-235.
 25. Kayaalp O. Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji-2. cilt, yedinci baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara. 1995: 1957-2013.
 26. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P. Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 1997; 53: 563-582.
 27. Lanza FL. Gastrointestinal toxicity of newer NSAIDs. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1318-1323.
 28. Weisman SM, Graham DY. Evaluation of the benefits and risks of low dose aspirin in the secondary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events. *Arch Intern Med* 2002; 162: 2197-2202.
 29. Kelly JP, Kaufman DW, Jurgelon JM, et al. Risk of aspirin-associated major upper-gastrointestinal bleeding with enteric coated or buffered product. *Lancet* 1996; 348: 1413-1416.
 30. Jackson LM., Hawkey CJ. NSAIDs and GI tract-potential hazards and benefits. *Apoptosis* 1999; 4: 397-402.
 31. Miller T: Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am J Physiol* 1983; 245: 601-623.
 32. Peskar BM: Role of leucotrien C4 in mucosal damage caused by necrotising agents and indomethacin in the rat stomach. *Gastroenterology* 1991;100: 619-626.
 33. Vaananen PM, Meddings JB, Wallace JL. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. *Am. J. Physiol* 1991; 261: G470-G475.

34. Asako H, Kubes P, Wallace JL, Wolf RE and Granger DN. Modulation of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate. *Gastroenterology* 1992; 103: 146-152.
35. Asako H, Kubes P, Wallace JL, Gaginella T, Wolf RE and Granger DN. Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am J Physiol*. 1992; 262: G903-908.
36. Thomas MJ: The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35: 21-39.
37. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 479-481.
38. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1995; 35: 7-20.
39. Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation* 1982; 4: 412-426.
40. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; 23:1396-1398.
41. Reilly PM, Schiller, III, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161: 488-503.
42. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
43. Parks DA. Oxygen radicals: mediator of gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 1989; 30: 293-298.
44. Özyurt H. Deneysel olarak bleomisin ile sıçan akciğerinde oluşturulan fibroziste serbest radikallerin rolü ve fibrozis oluşturan mekanizmalar üzerine kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) etkisi. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, 2002.
45. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002; 73: 53-63.
46. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 2005; 21: 24-28.
47. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. Mimoza Yayınları, Konya.1995; 1-132.
48. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 222: 1-15.
49. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. Uzmanlık Tezi. Ankara Uni. Tıp Fak. Biyokimya A.D., 1994.
50. Kayalı R, Cakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 83-89.
51. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7915-7922.
52. Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 289-306.

- 53.** Yoshiwa A, Yasuda K, Veda S, et al. Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia - reperfusion. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 2105-2145.
- 54.** Cetin M, Ozbakir O, Kontas O, Taskapan H, Yucesoy M. Protective effects of vitamin E and Ginkgo biloba extract on stress induced gastric mucosal injury in rats. *The Turkish Journal of Gastroenterology* 2001;12: 23-26.
- 55.** Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005; 26: 257-264.
- 56.** Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 775-778.
- 57.** Zhou FQ. Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 5: 385-392.
- 58.** Cetiner M, Sener G, Sehirli AO, Eksioglu-Demiralp E, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yegen BC. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 209: 39-50.
- 59.** Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecologic Oncol* 2003; 88:434-439.
- 60.** Mollaoglu H. GSM 900 MHz telefonların oluşturduğu manyetik alanın etkisiyle meydana gelen oksidatif değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. *Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üni. Tıp Fak Fizyoloji A.D.* 2003.
- 61.** Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003; 189: 41-54.
- 62.** Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
- 63.** Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* 1986; 77: 319-321.
- 64.** McCord JM, Fridowich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
- 65.** Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999; 77: 577-592.
- 66.** Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73: 21-29.
- 67.** Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM et al. 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: 2347-2352.
- 68.** Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre E, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 595-608.
- 69.** Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Olts EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44: 230-232.
- 70.** Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat

embriyo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res* 1994; 54: 1865-1870.

71. Da Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, Calixto JB. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic Res* 2004; 38: 1241-1253.

72. Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Uz E, Ilhan 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 and methylprednisolone. *Neurosci Res Com* 2002; 31: 111-121.

73. Yılmaz HR, Uz E, Yücel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 234-238.

74. Garg GP, Cho CH, Ogle CW. Ethacrynic acid and Sulphasalazine inhibit the generation of leukotriene C4 in rat stomachs: A possible gastric Anti-Ulcer Mechanism in cold-restraint-Stressed Rats. *Pharmacology* 1992; 44: 177-189.

75. Murakami M, Saita H, Teramura S. Gastric ammonia has a potent ulcerogenic action on the rat stomach. *Gastroenterology* 1993; 105: 1710-1715.

76. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Effect of Ammonia, urea and urease on the rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996; 31: 837-846.

77. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-431.

78. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.

79. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-169.

80. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London: Academic Press 1974; 673-677.

81. Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promotertreated mouse skin. *Cancer Res* 1991; 51: 4443-4449.

82. Santra A, Chowdhury A, Chaudhuri S, et al. Oxidative stress in gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Indian J Gastroenterol* 2000; 19: 21-23.

83. Choi MA, Kim BS, Yu R. Serum antioxidative vitamin levels and lipid peroxidation in gastric carcinoma patients. *Cancer Lett* 1999; 136: 89-93.

84. Joseph RM, Varela V, Kanji VK, et al. Protective effects of zinc in indomethacin-induced gastric mucosal injury: evidence for a dual mechanism involving lipid peroxidation and nitric oxide. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 203-208.

85. Simith GS, Mercer DW, Cross JM, et al. Gastric injury induced by ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. Differing roles for lipid peroxidation and oxygen radicals. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1157-1164.

86. Yelken B, Dorman T, Erkasap S, et al. Clonidine pretreatment inhibits stress-induced gastric ulcer in rats. *Anesth Analg* 1999; 89: 159-162.

87. Drake IM, Mapstone NP, Schorah CJ, et al. Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis: relation to gastric

mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H pylori* eradication. Gut 1998; 42: 768-771.

88. Wallace JL, McKnight W, Wilson TL, Cirino G. Reduction of shock-induced gastric damage by a nitric oxide-releasing aspirin derivative: role of neutrophils. Am J Physiol 1997; 273: G1246- G1251.

89. Langman MJS, Brok P, Hawkey CJ, Silverstein F, Yeomans N. Non-steroidal anti-inflammatory drug associated ulcer; epidemiology, causation and treatment. Journal of Gastroenterology and Hepatology 1991; 6: 442-448.

90. Banerjee RK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit gastric peroxidase activity. Biochim Biophys Acta. 1990; 1034: 275-280.

91. Fesharaki M, Nasimi A, Mokhtari S, Mokhtari R, Moradian R, Amirpoor N. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: Gastroprotection by Vitamin E. Pathophysiology 2006; 13: 237-243.

92. Bulbuloglu E, Inanc F, Bakaris S, Kantarceken B, Cetinkaya A, Caglar R, Ilhami TK, Kılinc M. Association of adenosine deaminase, superoxide dismutase and catalase activities with *Helicobacter pylori*. Digestive Diseases and Sciences 2005; 50: 2296-2299.

93. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 103: 59-65.

94. Durak I, Karaayvaz M, Cimen MYB, Avcı A, Cimen OB, Buyukkocak S, Ozturk HS. Aspirin impairs antioxidant system and causes peroxidation in human erythrocytes and guinea pig myocardial tissue. Human and Experimental Toxicology. 2001; 20: 34-37.

95. Ko JKS, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. World J Gastroenterol 2004; 10: 2503-2508.

96. Takeuchi K, Ueshima K, Hironaka Y, Fujioka Y, Matsumoto J, Okabe S. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. Relation to gastric hypermotility. Digestion 1991; 49: 175-184.

97. Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M, Brunori PM, Di Matteo FM, Morelli A. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. Gut 1994; 35: 909-915.

98. Elliot SN, Wallace JL. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. Canadian Journal of Gastroenterology. 1998; 12: 559-568.

99. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. FEBS Letters. 1998; 425: 243-248.

100. Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydin M, Karaman A, Gultek A, Akyol O, GURSOY H, Aydin E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. Journal of Pediatric Surgery. 1999; 34: 1458-1462.

101. Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yagmurca M, Ozyurt H, Karaman A, Akyol O. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with α -tocopherol in rat kidneys. Urol Res 2001; 29: 190-193.

- 102.** Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggrawal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NFkappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 20: 9090–9095.
- 103.** Mayes PA. Structure and function of lipid-soluble vitamins, in: Murray, et al. (Eds.), *Harper's Biochemistry*, APPELTON & LANGE, Stamford, 1996; 614–624.
- 104.** Kurose I, Fukumura D, Miura S. Fluorographic study on the oxidative stress in the process of gastric mucosal injury attenuating effect of vitamin E *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8: 254-258.
- 105.** Armario A, Campmany Li, Bi. Borrás M. and Hidalgo J. Vitamin E-supplemented diets reduce lipid peroxidation but do not alter either pituitary – adrenal, glucosa and lactate responses to immobilization stress or gastric ulceration. *Free Rad Res Comms* 1990; 9: 113-118.
- 106.** Zaror-Behrens G, Mueller R, Greselin E and Behrens WA. Lack of vitamin E cytoprotective effects on indomethacin-induced gastric lesions. *Research communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1991; 72: 327-335.
- 107.** Ohta Y, Kobayashi T, Imai Y, Inui K, Yoshino J, Nakazawa S. Effect of Oral Vitamin E Administration on Acute Gastric Mucosal Lesion Progression in Rats Treated with Compound 48/80, a Mast Cell Degranulator. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 675-683.
- 108.** Nakajima S, Krishnan B, Ota H et al. Mast cell involvement in gastritis with or without *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1997; 113: 746-754.
- 109.** Muezzinoglu B, Gurbuz Y, Sentürk O. Mast cells in antral gastritis: Associated *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. *Patoloji Bülteni* 2001; 18: 24-26.
- 110.** Stachura J, Konturek JW, Dembinski A, Domschke W. Do infiltrating leucocytes contribute to the adaptation of human gastric mucosa to continued aspirin administration? *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 966-972.
- 111.** Rydning A, Lyng O, Adamsen BL, Falkmer S, Sandvik AK, Gronbech JE. Mast cells are involved in the gastric hyperemic response to acid back diffusion via release of histamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1061-G1069.