

30045

T. C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalı

**SIÇANDA STRES ÜLSERLERİNİN OLUŞUMU
VE İYİLEŞMESİNDE
GASTRİK LİPİD PEROKSİDASYON VE KALSİYUMUN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

(Doktora Tezi)

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

İNÇİ ALİCAN

Danışman
Doç. Dr. Berrak Ç. YEĞEN
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

İstanbul, 1993

Doktora Tezi çalışmalarım süresince değerli desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Berrak YEĞEN'e, Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şule OKTAY'a , Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. A. Süha YALÇIN'a ve histolojik incelemeleri ve fotoğraf çekimleri için Histoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Y. Doç. Dr. Serap ARBAK'a teşekkür ederim.

KISALTMALAR:

ACTH: Adrenokortikotrop hormon

GABA: Gama amino butirik asit

NT: Nörotensin

BBS: Bombesin

SRIF: Somatostatin

SP: P maddesi

TRH: Tirotropin-salıverdirici hormon

VIP: Vazoaktif-intestinal peptid

CRF: Kortikotropin-salıverdirici faktör

PG: Prostaglandin

LT: Lökotrien

TCA: Triklorasetik asit

MDA: Malondialdehit

LP: Lipid peroksidasyon

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Giriş ve Genel Bilgiler.....	1
Amaç.....	12
Araç ve Yöntemler.....	12
Bulgular.....	15
Tartışma.....	33
Özet	36
Summary	37
Kaynaklar.....	38

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Stres ve gastrointestinal sistem:

Stres vücutta kalp, akciğerler ve gastrointestinal sistem başta olmak üzere çok çeşitli sistemleri etkileyen bir olgudur. Strese bağlı mide ülserleri iki asır gibi uzun bir süreden beri gerek klinisyenleri gerekse araştırmacıları yoğun bir biçimde ilgilendirmektedir. Strese bağlı mide ülserleri ile ilgili ilk klinik bulgu 1772 yılında John Hunter adlı araştırmacıya aittir (1). 1930'lu yıllarda ise stres ülserlerine yol açabilen çeşitli klinik durumlar belirlenmiştir. Bunlar travma, sepsis, cerrahi girişimler, yanık, kafa travmaları ve nörolojik bozukluklardır. Bugün stres ülserlerinin gelişiminde pek çok faktörün rolü olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Bunlar arasında mide asit ve pepsin salgılamasında artma, müküs salgılamasında azalma, adrenal steroid ve katekolamin düzeylerinde değişimler, gastrik mukoza iskemisi ve sindirim sisteminde prostaglandinlerin sentezindeki değişimler sayılabilir. Bu olayların bir kısmı santral sinir sisteminin kontrolü altındadır. Gastrointestinal sistemin homeostazında santral sinir sisteminin rolü olduğu kesin olarak bilinmektedir. Bu düzenleyici etkinin bir kısmı otonom sinir sisteminin parasempatik (kolinerjik) ve sempatik (adrenerjik) bölümleri ile ilişkilidir.

Sen ve Anand (1957) tarafından amigdaloid nukleusun anteromedial bölümlerinin elektriksel olarak uyarılmasının ciddi gastrik hemoraji ve akut ülserlere yol açtığı gösterilmiştir (2). O tarihten bu yana hipotalamus ve özellikle limbik sistem en fazla araştırılan beyin bölgeleri olmuştur. Anterior hipotalamus, tuber cinerium, ventromedial ve lateral hipotalamik alanların lezyonları çeşitli hayvan türlerinde ülserlere yol açmaktadır. Anterior ve lateral hipotalamusun elektriksel uyarılmasının da mide hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenlerle amigdalanın stres ile ilgili uyarıların integrasyonunda ve muhtemelen hipotalamik bağlantıları ile stres ülserlerinin oluşumunda stratejik bir bölge olduğu öne sürülmektedir (3).

Stres ülserlerinin etiopatogenezi hakkında bilgi edinmek amacı ile deneysel olarak hayvanlar üzerinde çeşitli stres modelleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında en sık kullanılanlar,

hayvanın ön veya arka bacağına elektroşok uygulanması, immobilizasyon ve aktivite stresleridir. Özellikle sıçanların açlığı takiben, fiziksel olarak hareketsizlik ile birlikte soğuk bir ortamda (4°C) tutulması şeklindeki soğuk-immobilizasyon stresi midede ülserlere yol açan en etkin deney modelidir (4).

Stres ülseri patogenezinde rol oynayan periferik otonomik nörotransmitterler:

Yapılan araştırmalara göre mide eksitator parasempatik ve inhibitör sempatik postgangliyonik sinir liflerinin kontrolü altındadır. Adrenerjik iletinin inhibisyonu gastrik lezyonlara yol açmaktadır. Örneğin, guanetidin, rezerpin ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) gibi çeşitli ilaçlar ile yapılan kimyasal sempatektomi, adrenalektomi ve spinal kesi gastrik lezyonlara neden olmakta ya da çeşitli faktörlere bağlı ülser oluşumunu şiddetlendirmektedir (5). Ayrıca sempatik tonusu azaltan sistemin de mide ve duodenumda ülserlere yol açmaktadır (6). Adrenerjik reseptör subtiplerinin farmakolojik ajanlarla uyarılması stres ülserinin gelişimine karşı koyarken, alfa ve beta adrenerjik reseptörlerin antagonistler tarafından birlikte bloke edilmesi mediyal hipotalamik lezyona bağlı ülserleri şiddetlendirmektedir (7). Diğer taraftan dopamin agonistlerinin de stres ülserlerinde koruyucu oldukları gözlenmiştir (8). Dopamin hem santral ve periferik presnaptik veziküllerde, hem de mide mukoza ve kas tabakası başta olmak üzere gastrointestinal kanalda yer alan bir nörotransmitterdir.

Stres ülseri oluşumunda parasempatik sistemin rolü de yaygın olarak araştırılmıştır. Kolinerjik muskarinik ve nikotinik reseptörlerin karbakol ile uyarılması soğuk-immobilizasyon stresine bağlı ülserlerde etkili bulunmazken, muskarinik reseptörlerin atropin ile bloke edilmesi bu tip ülserlere karşı çok etkili bulunmuştur (9). Ayrıca vagotomi veya tetraetilammonyum (gangliyon blokeri) ile parasempatik (kolinerjik) aktivitenin ortadan kaldırılması da stres ülserlerinden korunmada etkili bulunmuştur (9).

Yakın zamanlarda stres ülserlerinde periferik ve santral endojen opioid peptidlerin rolleri olduğu öne sürülmüştür (10,11). Periferik morfin uygulanması ile μ reseptörlerinin uyarılması soğuk-immobilizasyon stresine karşı korumaktadır. Narkotik antagonist nalokson ise ülser

insidansı ve şiddetini artırmaktadır (11). Bu bulgular strese bağlı olarak hipofizden β -endorfin ve ACTH salınımı olduğu şeklindeki klasik bilgiler ile paralellik göstermektedir (12). Buna ek olarak β -endorfinin intrasisternal uygulanmasının da koruyucu etki göstermesi, endojen beyin ve periferik opioid peptidlerin stresin mide üzerindeki zararlı etkilerine karşı koruyucu rol oynadıklarını ortaya koymaktadır (10, 11).

Mukozal hücre hasarına yol açan intraselüler biyokimyasal mekanizmalar henüz açıklığa kavuşmamıştır. Adrenerjik (β) ve dopaminerjik (D_1) reseptörlerin uyarılmasına bağlı hücre içi cAMP ve/veya prostaglandin düzeyinin artması muhtemelen ülserasyona karşı gelişen ilk rezistansın bir bölümünü oluşturmaktadır. Bunlar daha sonra tek başlarına veya adrenal steroidlerle birlikte lizozomal membranları stabilize ederek sitolitik enzimlerin salınımını inhibe etmektedirler (1).

Stres ülseri patogenezinde rol oynayan beyin nörotransmitterleri ve peptidleri:

Stres ülseri üzerine etkili olan periferik nörotransmitterlerin direkt olarak serebrospinal sıvıya uygulanması yolu ile çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların ışığı altında strese bağlı olarak norepinefrin ve dopamin dahil olmak üzere beyinde bazı biyolojik aminlerin miktarı azalmaktadır. Stres beyin ve mide katekolamin düzeylerini düşürmekte, buna bağlı olarak adrenerjik ileti giderek zayıflamakta ve reseptörler üzerindeki tonik inhibitör adrenerjik etki ortadan kalkmaktadır.

Intraserebroventriküler uygulanan β -endorfin ve gama amino butirik asit (GABA) stres ülserlerine karşı koruyucu etki göstermektedir (13). GABA'nın bu etkisini direkt ya da başka nörotransmitterler ile ilişkili olarak gösterdiğine dair henüz kesin deliller mevcut değildir. Diğer bir beyin transmitteri olarak bilinen histaminin stres ülserleri üzerindeki etkisi de kesinleşmemiştir. Ancak histaminerjik nöronlar lateral hipotalamus, korteks, amigdala ve hippokampus dahil stresle ilişkili olduğu bilinen çeşitli beyin bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (14).

Yine yapılan çalışmalarda, endojen peptidlerden nörotensin (NT), bombesin (BBS) ve β -endorfinin intrasisternal olarak uygulanmaları stres ülseri gelişimini tamamen önlemektedir (13). Somatostatin (SRIF) ve P-maddesi (SP) kısmen koruyucu olmaktadır. Bir başka önemli bulgu ise, intrasisternal tirotropin-saliverdirici hormon (TRH) ve vazoaktif-intestinal peptid (VIP) verilmesinin strese bağlı ülserleri anlamlı şekilde şiddetlendirmesidir (15,16). Diğer taraftan stres modeli üzerinde çalışılan diğer bazı endojen peptidler ise etkisiz olarak bulunmuştur. Bunlar arasında kolesistokinin oktapeptid, gastrin, leu- ve met-enkefalin, bradikinin, xneopsin, gonadotropin-saliverdirici hormon, büyüme hormonu-saliverdirici faktör ve melanosit-inhibe edici faktör sayılabilir. Stres ülseri gelişimine karşı koruyuculuğu kabul edilen diğer bir endojen peptid de kortikotropin-saliverdirici faktör (CRF)'dür (13,16). Bu koruyucu peptidler (CRF, nörotensin, bombesin ve β -endorfin) ve bazı biyojenik aminler (dopamin, norepinefrin, GABA) santral olarak salınırlar ve muhtemelen limbik, hipotalamik ve beyin sapı alanlarında otonom sinir sistemi ile ilgili yolları uyarırlar. Dolayısıyla adrenallere ve mideye sempatik deşarjı artırır. Aynı zamanda kolinerjik (vagal) efferentler üzerine inhibe edici etki de gösterirler (13).

Stres ülseri patogenezinde rol oynayan lokal faktörler:

Mide mukozası sürekli olarak hidrojen iyonları, sindirim enzimleri ve safra asitlerinin etkileri ile karşı karşıyadır. Midedeki epitelyal hücreler bu zarar verici faktörlere karşı direnç gösterirler. Hücrel rezistans ile zarar verici faktörler arasındaki dinamik ilişki fiziksel ya da psikolojik her türlü strese bağlı olarak bozulmaya uğradığında ülserler oluşmaya başlar. Mide mukozasına zarar verdiği uzun zamanlardan beri bilinen en önemli faktör mide asitidir. Stres esnasındaki asit salınımı vagal etki altındaki histamin (H_2) reseptörleri aracılığı ile olmaktadır. Ayrıca özellikle soğuk-immobilizasyon modelindeki hipotermi hipotalamustan TRH salınımına ve beyindeki GABAerjik mekanizmaları uyarak asit salınımında artışa neden olmaktadır (16). Ancak midede artan asit tek başına ülser oluşturmaya yeterli bir faktör değildir.

Stres modeli uygulanan hayvanların mide dış duvarına yerleştirilen transdüserler yardımıyla mide kontraksiyonları incelendiğinde, stres sırasında mide boyunca düzenli, yavaş,

yüksek amplitüdü ve uzun süreli kasılmalar olduğu gözlenmiştir. Strese bağlı mide kontraktilesindeki artış, muskarinik ve histaminerjik reseptörlerin aktivasyonuna bağlı bulunmuştur. Bu kontraktile artışı ile birlikte mide asitindeki artış ülser oluşumu için yeterli faktörleri oluşturmaktadırlar (16).

Bu iki önemli faktörün yanısıra mide veya duodenum bikarbonat salınımında azalma da ülser gelişiminde rol oynayan önemli bir etkidir (16). Mide ve duodenumdan salınan bikarbonat, hidrojen iyonlarına ve bu iyonların mukozal hücrelere geri difüzyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur. Bikarbonat salınımı vagal ve sempatik sistem tarafından kontrol edilir. Vagal aktivitede artış bikarbonat salınımını uyarırken, sempatik aktivite inhibe eder. Ayrıca intraluminal asit, prostaglandinler ve VIP de güçlü bikarbonat uyarıcılarıdır.

Mide ve duodenum başta olmak üzere sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan prostaglandinler (PG) de stres ülseri gelişiminde rol oynarlar. Bunlardan PGE₂ ve PGI₂ (prostasiklin), histamin, pentagastrin ve vagal yolla uyarılan mide asit salınımını inhibe ederler ve potent vazodilatör özellikleri ile mide mukozal kan akımını artırır (17). Araşidonik asit metabolizmasının siklooksijenaz yolağının diğer bir ürünü olan tromboksan A₂ güçlü vazokonstriktör etkiye sahiptir. Araşidonik asit metabolizmasının lipoksijenaz ürünü olan lökotrienler (LT) ise genel olarak inflamasyonu artırarak ülser iyileşmesini geciktirirler. Bunlardan LTB₄ nötrofillerin kemotaksis, kemokinezisini artırır ve lizozomal enzimlerin salınımını uyarır. LTC₄ ve LTD₄ vazokonstriktör özellikleri ile mide kan akımını azaltırlar ve izole paryetal hücrelerden asit salınımını uyarırlar (17). Dolayısıyla, ülser oluşumu araşidonik asit oksidasyon ürünlerinin miktarca değişimlerine bağlanabilir. Stres sırasındaki hipoksiye bağlı olarak metabolizmanın lökotrien yolağına kayması koruyuculuğu engellemektedir.

Mide mukozasında stres ülseri gelişimine ortam hazırlayan diğer bir faktör de, mide mukozal kan akımında azalmadır. Mukozal iskemi sonucu dokuda glikojen azalması ve yedek enerji kaynağı olarak anaerobik glikolizisin yapılamaması söz konusudur. Tüm bunlar gastrik mukozada ciddi bir enerji kaybına neden olur. Mukozal iskemi ayrıca intramural pH'yı da düşürmektedir (18).

Stres ülseri gelişiminde rol oynadığı ileri sürülen diğer bir faktör ise serbest O_2 radikalleridir.

Serbest Oksijen Radikalleri:

Normal koşullar altında tüm biyolojik sistemlerdeki moleküler oksijenin yaklaşık %95'i mitokondriyumlardaki sitokrom oksidaz sistemi sayesinde moleküllerine 4 elektron ilavesi (tetravalan) şeklinde bir indirgenmeye uğrar. Geriye kalan moleküler oksijen ise univalan şekilde indirgenerek süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oldukça reaktif olan hidroksil radikali ($OH\cdot$) gibi kısmen indirgenmiş serbest oksijen radikallerine dönüşürler. Serbest radikaller bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içeren, oldukça reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Aerobik organizmalarda, moleküler oksijenin yaşamsal önemi ve kolayca indirgenebilmesi nedeniyle, hücrelerde oksijen kaynaklı serbest radikaller oldukça fazla miktarlarda oluşurlar ve ileri derecede reaktif olduklarından hızla hücrelerin alt birimleri ile reaksiyona girme eğilimi gösterirler. Dokuların bu oksidatif ürünlere karşı en etkin savunma mekanizmaları süpeoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir. Süperoksit dismutazlar intraselüler metalloproteinler grubuna ait enzimler olup süperoksit anyonunun hidrojen peroksitine dismutasyonunu katalize ederler. Bu enzim plazma, spinal sıvı ve lenf sıvısı gibi ekstraselüler sıvılarda çok az bulunur. H_2O_2 'nin intraselüler düzeyini düzenleyen diğer iki enzim sisteminden katalaz bir hemoprotein olup H_2O_2 'nin suya parçalanmasını katalizler. Glutatyon peroksidaz ise selenyum içeren sitoplazmik bir enzimdir ve H_2O_2 'nin ve organik peroksitlerin su ve organik alkole parçalanmalarını katalizler. Glutatyon peroksidazın antioksidan aktivitesi, indirgenmiş glutatyonun oksidasyonuna dayanır ve daha sonra okside glutatyon, NADPH'ya bağımlı glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar indirgenir. Antioksidan enzimlerin yanısıra, oksidanlara karşı ikinci derece öneme sahip diğer maddeler de vardır. Bunlar arasında suda çözünen askorbik asit, sistein ve yağda çözünen α -tokoferol, β -karoten başta gelir (19).

Oksijen radikallerinin kaynağı ve etkileri:

Serbest oksijen radikallerinin kaynakları çok çeşitlidir. Bunların başlıcaları mitokondriyal elektron taşıma sistemlerinin komponentleri, endoplazmik retikulum, prostaglandin sentetaz, lipoksijenaz sistemleri, bazı çözüner enzimler ve proteinler (hemoglobin, triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz v.b.), çeşitli küçük moleküller (flavinler, tiol bileşikleri, iki değerlikli metaller v.b.) ve çevresel etkenlerdir (radyasyon, hava kirliliği, zararlı kimyasallar v.b.).

Oluşan serbest radikaller hücre içinde çeşitli metabolik bozukluklara yol açarak hücre hasarı ve nihayet hücre ölümüne sebep olurlar. Hücre membranlarının fosfolipid tabakasında yer alan doymamış yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyonu başlatırlar. Lipid peroksidasyon, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna kadar ilerleyen bir kimyasal olay olarak tanımlanmaktadır. Lipid peroksidasyon, kuvvetli yükseltgen bir radikalın, zar yapısında yer alan doymamış yağ asidi zincirindeki alfa-metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ve yağ asiti zincirinin radikal özellik kazanması ile başlar. Dayanısız olan lipid radikalinden önce lipid konjuge dien molekülü, daha sonra da moleküler oksijenin bağlanmasıyla lipid peroksi radikali oluşur. Lipid peroksi radikali ise, ya başka bir lipid molekülü ile etkileşerek lipid hidroperoksid molekülünü oluşturur ya da lipid endoperokside dönüşür. Oluşan lipid peroksi radikalleri zar yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlar ve olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid endoperoksitleri ise, aralarında malondialdehitin de bulunduğu alkol, keton, aldehit ve eter gibi çeşitli yıkım ürünlerini oluştururlar.

Serbest radikallere bağlı hücre hasarında 3 ana mekanizma rol oynar: (a) serbest radikallerin belirli bir hedefe saldırarak yaptıkları direkt etki, (b) yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu lipid membranların hasarı ve buna bağlı olarak membran enzimleri ve membran taşıma sistemlerinin zarar görmesi, (c) toksik, non-radikal lipid parçalanma ürünlerinin belirli bir hedef ile reaksiyona girmesi. Özellikle sonuncu mekanizma hücre içinde oluşan radikallerin ne şekilde zincirleme yayılım göstermelerini açıklamak açısından önemlidir. Gerçekten de endojen oluşan bazı non-radikal maddeler, kaynaklandıkları yerden difüze olarak ana radikale ait hasar verici

potansiyeli hücre membranına, mitokondriuma, ribozomlara, nukleusa ve diğer hücre içi organellere taşırlar (20).

Günümüzde serbest oksijen radikallerinin kanser ve hatta yaşlanma dahil pek çok patolojik olayın ortaya çıkışında rolleri olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Serbest radikallerin iskemi/reperfüzyon, soğuk-immobilizasyon, etanol ve nonsteroidal anti-enflamatuvar ilaçlara bağlı gelişen gastrik mukoza hasarındaki rolleri de kesinleşmiştir; ancak mide mukozasında hasar oluşturmalarının mekanizması tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Doymamış yağ asitlerine, sülfürlü aminoasitler içeren proteinlere, ve nükleik asitlere saldırarak membranların vitalitesini değiştirdikleri, bu yolla epitel ve endotelin bariyer özelliklerini etkiledikleri düşünülmektedir. Diğer etkilerinin ise araşidonik asit metabolizma ürünleri ile reaksiyona girerek tromboksan yapımını uyarmak yoluyla olduğu öne sürülmektedir. Tromboksanlar mukozal ve submukozal damarlarda vazokonstriksiyona yol açarak mide mukozal kan akımını azaltırlar. Ayrıca süperoksit anyonlarının endotelyum-kaynaklı gevşetici faktörü (EDRF), hidroksil radikallerinin ise prostasiklin yapımını inhibe ettikleri gösterilmiştir. Diğer taraftan oksidanlara karşı korunmada önemli rol oynayan sulfhidrillerin en büyük non-protein fraksiyonu olan glutatyon düzeyinin strese bağlı mide ülserlerinde anlamlı bir şekilde azaldığı da gösterilmiştir. Tüm bu bulgular serbest oksijen radikallerinin tam olarak açıklanmayan mekanizmalar ile strese bağlı mide ülserlerinde rol oynadıklarını göstermektedir.

Bazı araştırmacılara göre, serbest oksijen radikalleri sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu artırmak yoluyla da etkili olmaktadır. Son yıllarda, perfüze sıçan kalbinde ve böbrek mitokondrimunda hücrel ve mitokondrial hasar oluşturmada serbest radikaller ile sitozolik kalsiyumun sinerjistik etki gösterdikleri ortaya konmuştur (21). Dolayısıyla, hücre hasarı serbest radikaller ve/veya kalsiyum artışına bağlı ise, kalsiyum kanal blokerleri serbest oksijen radikallerine bağlı doku toksisitesini önemli ölçüde engelleyebilir.

Kalsiyum ve kalsiyum kanal blokerleri:

Kalsiyum sinir uyarılarının ilerlemesinde, nörotransmitterlerin salınmasında, ekzokrin ve endokrin bezlerden sekresyonların gerçekleşmesinde ve kas liflerinin kasılmasında rol oynayan önemli bir iyonudur. Uyarılmamış bir hücrede sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonu 10^{-7} mol/l'dir. Bu değerin 10^{-6} - 10^{-5} mol/l değerlerine artması hücrelerin uyarılmasına yol açar. Hücre dışı ile hücre içi kalsiyum gradiyentinin normal düzeyde devamı hücre membranındaki etkili pompalama sistemleri sayesinde gerçekleştirilir. Bunlar, kalsiyumu hücre içinden hücre dışına taşıyan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değişimi ve Ca^{+2} -pompalayan ATPaz sistemleridir. Bunlar kalsiyumu hücre içinden hücre dışına taşırlar. Sitolitik kalsiyum konsantrasyonunun artması kalsiyum-bağımlı membran fosfolipazlarını ve bazı kalsiyum-bağımlı nonlizozomal proteazları aktive eder. Bu enzimlerin aktivasyonunun mitokondriyum ve plazma membranlarının lipid ve proteinlerini değiştirdiği, bu yolla mitokondriyum ve plazma membranının fonksiyonlarını bozduğu düşünülmektedir. Bu olumsuz değişimler de hücrenin ölümüne yol açabilmektedir (22,23).

Hücrenin uyarılması, hücre içi depolardan kalsiyumun salınmasına veya spesifik Ca^{+2} kanalları yolu ile membrandan hücre içine Ca^{+2} geçişine neden olur. Bunlar voltaja-bağımlı kanallar ve reseptöre-bağımlı kanallardır. Bu kanallar içinde sadece voltaja-bağımlı kanallar hücre depolarizasyonu ile uyanılır ve Ca^{+2} iyonlarına karşı yüksek afinite gösterirler. Elektrofizyolojik çalışmalara göre lokalizasyonları, iyon seçicilikleri, toksin ve ilaçlara karşı selektiviteleri açısından 3 farklı tip voltaja-bağımlı kalsiyum kanalı vardır: L-tipi, N-tipi ve T-tipi kanallar. N-tipi kanallar nörotransmitter salınımı ile ilişkili kanallardır. w-Conotoksin GVIA adlı 27 aminoasitli bir peptid N-tipi kanallara bağlanarak, nörotransmitter için gerekli olan kalsiyumun hücre içine girişini engeller. L-tipi kanallar kalsiyum ile uyarılan pek çok olayda görev alır. Bu kanallar fenilalkilamin (verapamil ve gallopamil), benzodiazepin (diltiazem) ve dihidropiridin (nifedipin) grubu ilaçlar tarafından bloke edilirler. T-tipi kanallar ise uyarıcı doğurmada (pacemaker aktivite) rol oynarlar ve çoğu organik ve inorganik kalsiyum kanal blokerlerine karşı duyarsızdırlar (24).

Kalsiyum, pekçok uyarılabilir hücrede olduğu gibi, mide mukozal oksintik hücrelerinde de kasılma için gerekli bir iyonudur. Bu nedenle, kalsiyum homeostazındaki değişimler gastrik ülseratif hastalıkların patogenezinde önemli role sahiptir. Kalsiyumun mide asit salınımını in vitro ve in vivo koşullarda uyardığı gösterilmiştir (25). Histamin ve dibutil siklik AMP ile uyarılan asit salınımının kalsiyuma bağlı olmadığı, buna karşın pentagastrin ve kolinerjik olarak uyarılan asit salınımının kalsiyum yokluğunda azaldığı ortaya konulmuştur (26). Ayrıca gastrin salınımında payı olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Buna göre, asetilkolin ve gastrin ile uyarılan asit salınımı paryetal hücre membranından kalsiyum girişine ve ikincil ulak olarak görev yapmasına bağlanmaktadır. Bu nedenle kalsiyum kanal blokerlerinin kalsiyumun bu etkilerini antagonize etmesi beklenmektedir. Gerçekten de, kalsiyum kanal blokerlerinin histamin, gastrin, karbakol ve siklik adenozin monofosfat ile uyarılan asit salınımını inhibe ettikleri gösterilmiştir (27). İn vitro bir çalışmada bu grup ilaçlardan verapamil ve gallopamil'in mide paryetal hücresinde proton pompası K^+/H^+ -ATPazı inhibe ederek asit salınımını engelledikleri gösterilmiştir (28). Kalsiyum kanal blokerleri bazal ve uyarılmış asit salınımını inhibe etmelerinin yanısıra mide kasının kontraktilesini de inhibe ederler. Düz kas kasılmasını inhibe etmeleri nedeniyle mide motilitesini yavaşlatırlar (27, 29). Nitrendipin ile yapılan bir çalışmada, soğuk-immobilizasyon stresi sırasında mide boyunca gözlenen uzun süreli, yüksek amplitüdü kasılmaların azaldığı bulunmuştur (26).

Bu ilaçların etkisinde, mide asit salınımının ve kontraktilesinin inhibisyonunun yanısıra mukozal mast hücrelerinin degranülasyonunun inhibisyonu da önem taşımaktadır. Yine bir çalışmada, verapamil'in mast hücrelerinden amin salınımını azalttığı ortaya konmuştur (30). Ayrıca, kalsiyum kanal blokerlerinin mide kan akımını artırarak da mide mukozasını korudukları öne sürülmektedir. Yapılan bir araştırmada, hücre içi kalsiyum artışının miyokardın kan akımını azaltarak ve mitokondriyal hasara yol açarak miyoselüler nekroza neden olduğu gösterilmiştir (27, 31).

Kalsiyum kanal blokerlerinin koruyucu etkilerinde araşidonik asit metabolizmasına etkilerinin de rolü olduğu düşünülmektedir. Gerçekten de, kalsiyum kanal blokerlerinin

lipoksijenaz yolağını inhibe ettikleri gösterilmiştir (32). Böylece, lökotrienlerin oluşumuna yol açan lipoksijenaz yolağını engelleyerek, arasıdonik asit metabolizmasını koruyucu prostaglandinler tarafına yöneltirler (27, 32). Bir başka bulgu da mide mukozal glutatyon düzeyinde azalmanın, oksintik hücrelerde intraselüler kalsiyum düzeyini artırarak indirekt olarak mide lezyonlarına yol açmasıdır. Bu durum, stres esnasında, antioksidan özelliğe sahip glutatyon düzeyinde azalmanın intraselüler kalsiyum düzeyinde artış ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (27).

Yakın zamanda yapılan çalışmalara göre, kalsiyum kanal blokerlerinin strese karşı koruyucu etkilerinde antioksidan özellik göstermelerinin de payı bulunmaktadır. Kimyasal olarak farklılık göstermelerine rağmen bu ilaçlar değişik derecelerde lipofilik özellik gösterirler ve bağlanma yerleri esas olarak fosfolipidden zengin membranların lipid bölümleridir. Bu nedenlerle, membrandaki lipid peroksidasyon zincirini kırarak antiperoksidan özellik gösterdiklerine dair bulgular mevcuttur (33, 34, 35, 36).

Membranda lipid peroksidasyon zincirinin kırılması hidrojen veya elektron transferi ile gerçekleşir. Kalsiyum kanal blokerleri de yapısal özellikleri nedeni ile elektron transferinde bulunarak bu zincirin kırılmasına yol açarlar. Lipid peroksidasyonun engellenmesi dolaylı olarak glutatyon düzeyindeki azalmayı önler. Böylece antioksidan glutatyon, stres sırasında oluşan serbest oksijen radikallerine karşı koruyucu özelliğini sürdürmüş olur.

Kalsiyum kanal blokerlerinin stres ülseri üzerindeki çok yönlü etkileri araştırılırken, ekzojen kalsiyum verilmesinin ülserleri ne yönde etkileyeceği de pek çok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Gerçekten de, kalsiyum-glukonat (Ca-glukonat) verilmesinin sıçanlarda gerek etanol ile oluşturulan ülserde gerekse stres ülserlerinde iyileştirici rol oynadığı gösterilmiştir (37, 38). Bu iyileştirici etkinin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte, stres ülseri patogenezinde yer alan mide glandular kas hücresinde artmış intraselüler kalsiyum düzeyinin Ca-glukonat ile engellendiği öne sürülmektedir (38).

AMAÇ

Sıçanlarda soğuk-immobilizasyon modeli ile midede stres ülserleri oluşturarak, oluşan stres ülserleri üzerinde kalsiyumun rolünün araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla, potensleri açısından birbirlerinden farklı üç ayrı kalsiyum kanal blokeri ve ayrıca Ca-glukonat kullanmak suretiyle kalsiyumun stres ülseri oluşumuna, stres sonrasındaki iyileşme sürecine ve bu olaylar sırasında gastrik lipid peroksidasyon ile glutatyon düzeylerine etkileri araştırılmıştır. Böylece kalsiyumun ülser patogenezi ve serbest oksijen radikalleri ile olabilecek olası etkileşimlerine ışık tutulması amaçlanmaktadır.

ARAÇ VE YÖNTEMLER

Sıçanda stres ülseri oluşturma yöntemi:

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen, her iki cinsten Sprague-Dawley albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanda stres ülseri oluşturmak amacı ile, soğuk-immobilizasyon modeli kullanıldı. Bu yöntemle göre, sıçanlar stres uygulanmadan 48 saat öncesinden itibaren aç bırakıldılar. Açlık süresi boyunca hayvanlara yem verilmedi, ancak su serbest bırakıldı. Bu sürenin sonunda, hayvanlar, içinde hareket edemeyecekleri şekilde yaptırılmış özel pleksiglas kafeslere yerleştirilerek 3 saat süreyle soğuk bir ortamda (2-4°C) tutuldular. Hayvanlar 4 ayrı gruba ayrıldılar: I. Kontrol grubu

II. Açlık grubu

III. Stres grupları:

a) Tedavisiz grup

b) Kalsiyum kanal blokerleri ve Ca-glukonat ile ön tedavi uygulanan gruplar

IV. Stres sonrası iyileşme grupları:

a) Tedavisiz gruplar

b) Kalsiyum kanal blokerleri ile tedavi uygulanan gruplar

Kontrol grubunu oluşturan sıçanlar 3 saatlik açlık sonrası, açlık grubunu oluşturanlar ise 48 saat açlık sonrası öldürüldüler. Tedavisiz stres grubu sıçanlar herhangi bir ilaç verilmeden, ön tedavili grup ise stresten 1 saat önce kalsiyum kanal blokerleri verapamil, devapamil veya gallopamil 0.01, 0.1 ve 1 mg/kg, intra peritoneal (i.p.) veya Ca-glukonat (100 mg/kg, i.p.) verilmesini takiben strese maruz bırakıldı. Her iki grup hayvan da stres sonrası hemen öldürüldüler. Stres sonrası iyileşme gruplarından tedavi uygulanmayanlar, stresten sonra 2, 4, 12, 24, 48 ve 72 saat süreyle yaşatıldılar. Yaşatılan sıçanların beslenmelerine ve su içmelerine izin verildi. İyileşme gruplarından tedavili olanlara ise stresten hemen sonra kalsiyum kanal blokerleri (1 mg/kg, i.p.) verildi ve aynı sürelerde yaşamaya bırakıldılar..

Stres ülserlerinin değerlendirilmesi:

Sıçanlar aşırı doz eter ile öldürüldükten sonra, mideleri çıkarıldı. Mideler küçük kurvatürleri boyunca kesilerek açıldı. Serum fizyolojik ile yıkayıp temizlendikten sonra, mide mukozası makroskopik olarak incelendi. Oluşan ülserlerin uzunlukları mm. cinsinden ölçülerek kaydedildi. Ülser indeksi, her midede ölçülen ülserlerin uzunluklarının toplanması yoluyla hesaplandı (39). Peteşi olarak değerlendirilen lezyonlarda, üç peteşi 1mm.'lik ülsere eşdeğer olarak kabul edildi. Dokular, lipid peroksidasyon ve glutatyon ölçümleri için sıvı nitrojen içinde dondurularak -20°C'de saklandılar. Ayrıca her deney grubundan iki adet doku örneği, histolojik olarak incelenmek üzere %10'luk formaldehit içinde fikse edildi.

Gastrik lipid peroksidasyon düzeyinin ölçülmesi:

Lipid peroksidasyon derecesi tiyobarbitürik asit reaktif maddesinin ölçümü ile yapıldı (40). Bu amaçla, mideler Ultra Turrax doku homojenizatörü ile soğuk-triklorasetik asit (1 gr. doku + 10 ml. %10'luk TCA) içinde homojenize edildi. Daha sonra, 15 dak. süreyle 3000 devir/dak.'da santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant 9000-10 000 devir/dak.'da yaklaşık 8 dak. tekrar santrifüj edildi ve örnekten belirli bir hacim alınarak aynı hacim % 0.67'lik tiyobarbitürik asit ile karıştırıldı. Bu karışım 15 dak. süreyle kaynayan su içinde bekletildi. Örnekler oda ısısında soğumaya bırakıldıktan sonra, 532 nm. dalga boyunda absorbansları spektrofotometrik olarak ölçüldü. Gastrik lipid peroksidasyon düzeyi $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak malondialdehit (MDA) eşdeğeri olarak ifade edildi.

Gastrik glutatyon düzeyinin ölçülmesi:

Glutatyon ölçümü için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı (41). Dokular lipid peroksidasyon ölçümü için yapıldığı şekilde homojenize ve santrifüj edildikten sonra, 2 hacim süpernatant, 8 hacim 0.3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1 hacim ditiyobisnitrobenzoat (0.4 mg/ml %1'lik sodyum sitrat) solüsyonu ile karıştırıldı. Daha sonra karışımın 412 nm. dalga boyunda absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü ve glutatyon düzeyleri $13\ 600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Kalsiyum kanal blokerleri ve Ca-glukonat uygulanması:

Stres sonrası ön tedavi grubunda, sıçanlara iki farklı tedavi uygulandı. Bir grupta, stres uygulanmasından 1 saat önce kalsiyum kanal blokerleri olan verapamil, desmetoksiverapamil (devapamil) veya metoksiverapamil (gallopamil) ön tedavisi uygulandı. İlaçlar i.p. olarak 0.01,

0.1 ve 1 mg/kg dozlarında kullanıldı. Diğer taraftan, başka bir grup hayvana ise stresten 1 saat önce ön tedavi olarak Ca-glukonat 100 mg/kg, i.p. uygulandı.

Stres sonrası tedavili iyileşme grubunda ise, hayvanlara stresten hemen sonra sadece kalsiyum kanal blokerleri 1 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandı ve hayvanlar 2, 4 ve 12 saat süreyle yaşamaya bırakıldılar.

Her deney grubu için 10-15 sıçan kullanıldı.

Dokuların histolojik olarak incelenmesi:

Her deney grubundan iki adet doku örneği %10'luk nötral formaldehit ile fikse edildikten sonra histolojik yönden incelenmeye alındı. Alınan parçalar hematoksilin eozin boyası ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelendi.

İstatistiksel analiz:

Tüm veriler ortalama \pm standart hata ile ifade edildi. Gruplar arasındaki farklılığı karşılaştırmak için Student'in t -testi ve regresyon analizi yapıldı. "p" değerinin 0.05'den küçük olması ($p < 0.05$) halinde gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklı kabul edildi.

BULGULAR

I. KONTROL GRUBU:

Sadece 3 saat açlık uygulanan kontrol grubu sıçanlarda ülser indeksi ve ülser gelişme yüzdesi sıfır iken, gastrik lipid peroksidasyon düzeyi 24.7 ± 4.1 nmol MDA/g, glutatyon düzeyi 2.58 ± 0.23 μ mol/g olarak bulundu (Tablo I).

II. AÇLIK GRUBU:

48 saat açlık uygulanan açlık grubu sıçanlarda ülser indeksi ve ülser gelişme yüzdesi kontrol grubunda görüldüğü gibi sıfır iken, gastrik lipid peroksidasyon düzeyi kontrol ve stres gruplarından anlamlı şekilde düşük (8.7 ± 1.6 nmol MDA/g), glutatyon düzeyi ise kontrolden anlamlı şekilde düşük (1.20 ± 0.11 μ mol/g; $p < 0.001$) olarak bulundu (Tablo I).

III. STRES GRUPLARI:

a) TEDAVİSİZ GRUP:

Ülser indeksi ve ülser gelişme yüzdesi:

Soğuk-immobilizasyon stres modeli sıçanların %92'sinde mide ülserlerine yol açtı. Bu grupta ülser indeksi 13.5 ± 3.3 mm olarak bulundu. Ülser indeksi ile ülser gelişme yüzdesi arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi ($r=0.783$, $p < 0.001$) (Tablo I; Şekil 1 ve 2). Kontrol ve stres gruplarına ait mide örneklerinin ışık mikroskopisi düzeyindeki görüntüleri gösterilmiştir (Şekil 3a ve b).

Gastrik lipid peroksidasyon düzeyi:

Soğuk-immobilizasyon stresi uygulanan hayvanlarda, gastrik lipid peroksidasyon düzeyinde açlık grubuna göre anlamlı şekilde artma gözlemlendi (19.5 ± 2.1 nmol MDA/g; $p < 0.005$) (Tablo I; Şekil 4).

Gastrik glutatyon düzeyi:

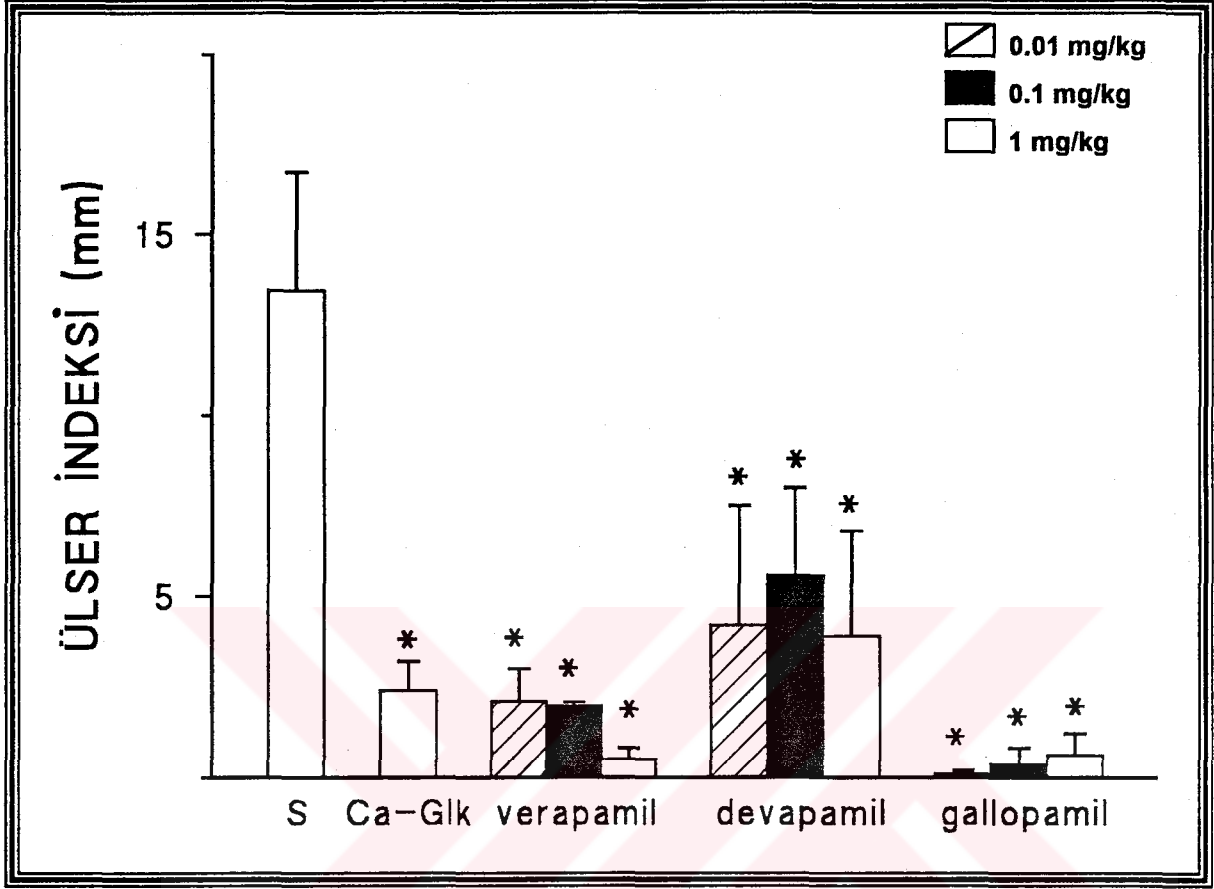
Soğuk-immobilizasyon stresi uygulanan grupta gastrik glutatyon düzeyi 1.42 ± 0.11 μ mol/g olarak gözlemlendi. Stres grubundaki bu değer, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.0005$) (Tablo I; Şekil 5).

Fablo I: Tedavisiz ve kalsiyum kanal blokerleri ya da Ca-glukonat ön tedavisi uygulanan gruplarda ülser indeksleri, ülser gelişme yüzdeleri, gastrik lipid peroksidasyon (LP) ve glutatyon düzeyleri.

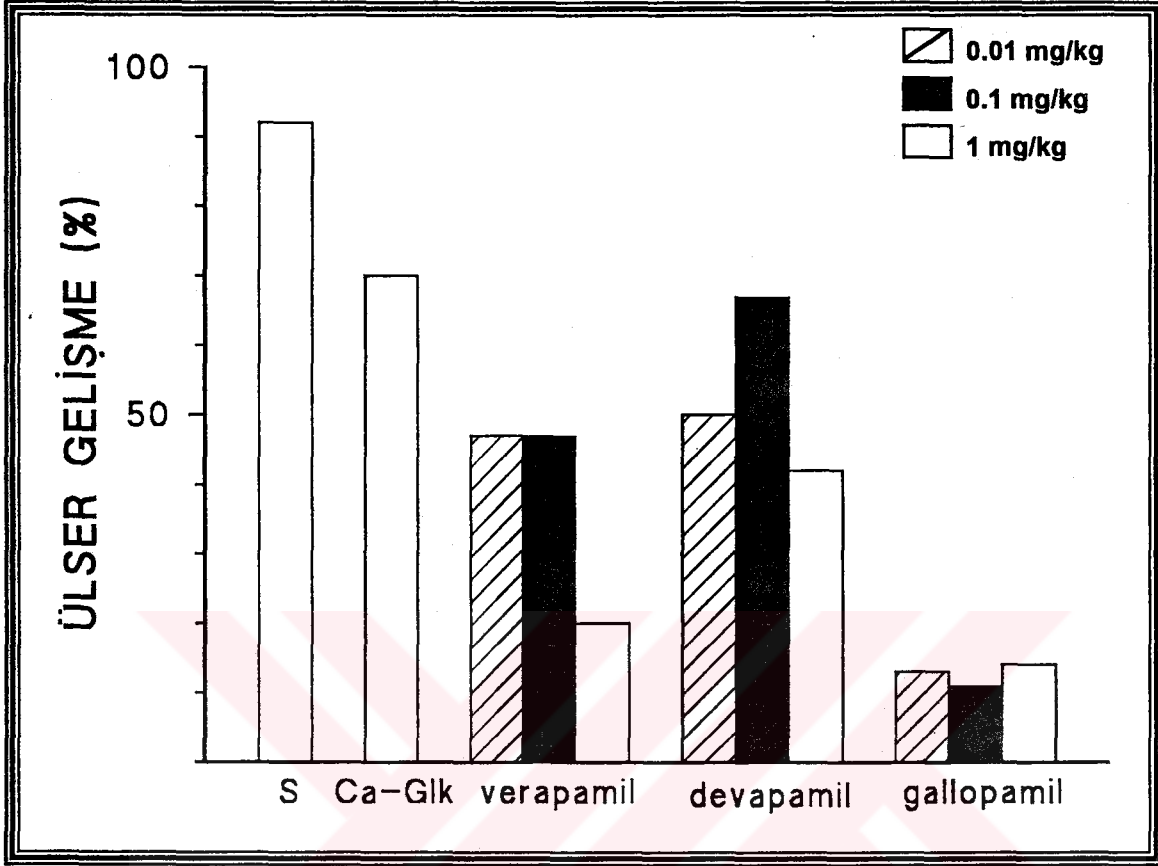
		ÜLSER İNDEKSİ (mm)	ÜLSER GELİŞME YÜZDESİ (%)	LP (nmol MDA/g)	GLUTATYON (μ mol/g)
I. KONTROL		0	0	24.7 \pm 4.1	2.58 \pm 0.23
II. AÇLIK		0	0	8.7 \pm 1.6*+	1.20 \pm 0.11+
III. STRES		13.5 \pm 3.3+	92	19.5 \pm 2.1	1.42 \pm 0.11+
IV. ÖN TEDAVİ	DOZ (mg/kg)				
Verapamil	0.01	2.1 \pm 0.9*	47	9.0 \pm 0.3*+	0.15 \pm 0.01*+
	0.1	2.0 \pm 0.8*	47	11.8 \pm 0.6*+	0.95 \pm 0.17*+
	1	0.5 \pm 0.3*	20	12.3 \pm 0.7*+	0.88 \pm 0.13*+
Devapamil	0.01	4.2 \pm 3.2*	42	33.2 \pm 3.6*	0.86 \pm 0.10*+
	0.1	5.6 \pm 2.4*	67	31.2 \pm 2.6*	0.63 \pm 0.06*+
	1	3.9 \pm 2.9*	42	64.6 \pm 7.0*+	0.33 \pm 0.04*+
Gallopamil	0.01	0.1 \pm 0.1*	13	32.9 \pm 5.6*	0.71 \pm 0.06*+
	0.1	0.4 \pm 0.4*	11	69.9 \pm 15.0*+	0.39 \pm 0.05*+
	1	0.6 \pm 0.6*	14	78.9 \pm 14.9*+	0.35 \pm 0.07*+
Ca-glukonat	100	2.4 \pm 0.8*	70	16.6 \pm 2.0+	0.51 \pm 0.04*+

* Stres grubundan anlamlı farklılık (p< 0.001-0.05).

+ Kontrol grubundan anlamlı farklılık (p< 0.001-0.05).



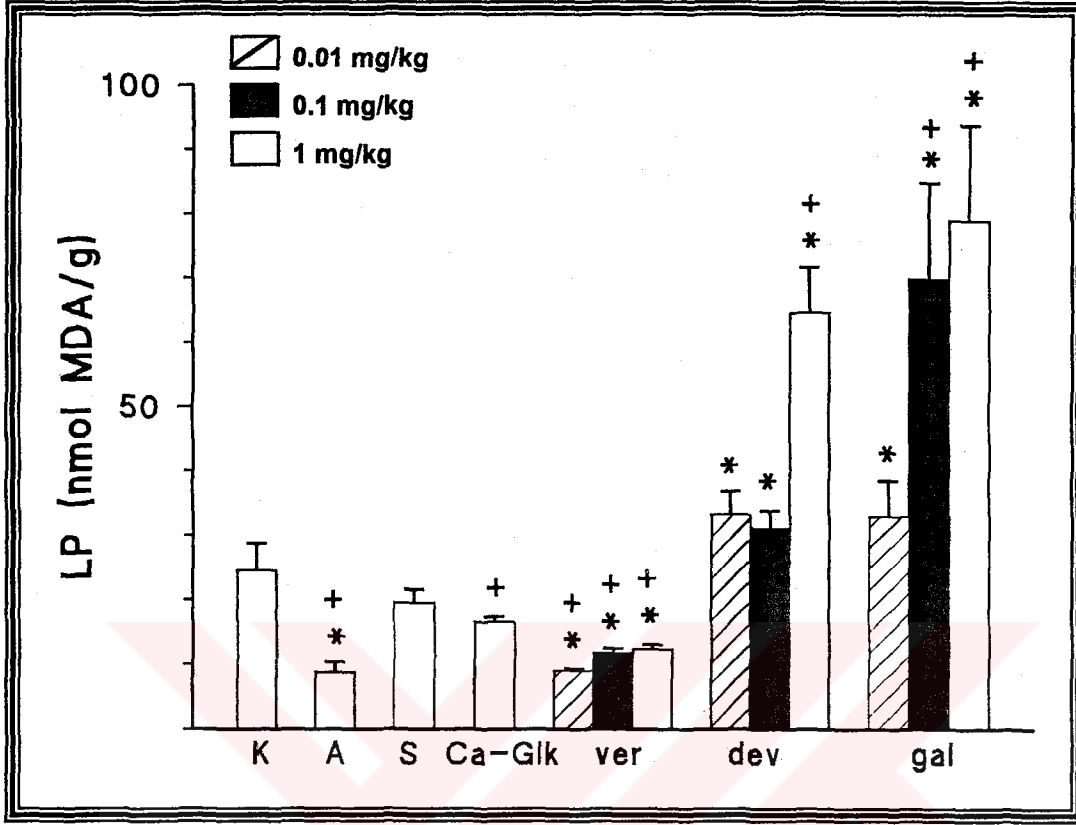
Şekil 1. Soğuk-immobilizasyon stresine bağlı (S) ülser indeksi ve kalsiyum kanal blokerleri ile Ca-glukonat'ın (Ca-Glk) ülser indeksine etkileri. * Stres grubundan anlamlı farklılık ($p < 0.001-0.05$).



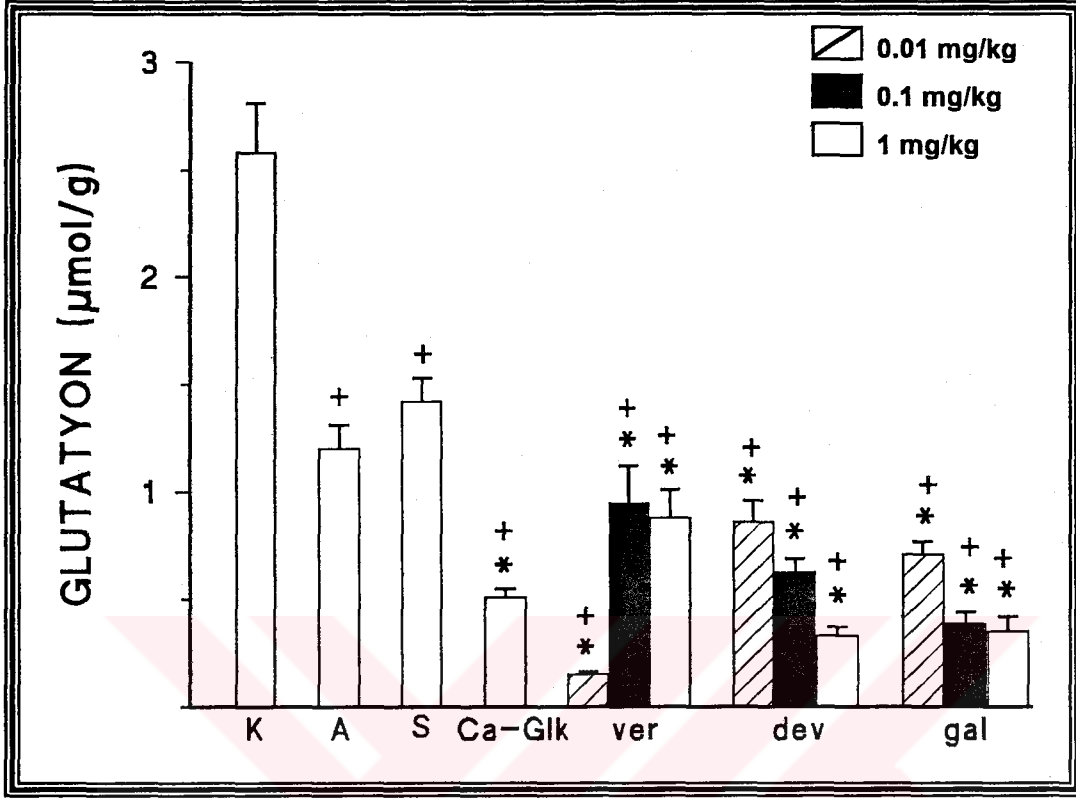
Şekil 2. Soğuk-immobilizasyon stresinde (S) ülser gelişme yüzdesi, kalsiyum kanal blokerleri ve Ca-glukonat'ın (Ca-Glk) ülser gelişme yüzdesine etkileri.



Şekil 3a. Normal sıçan mide dokusunun ışık mikroskopu düzeyindeki görüntüsünde yüzey epitel ve bez epitel hücrelerinin normal morfolojiyi yansıttıkları izlenmektedir (Hematoksilen Eozin, x 149 büyütme ile). b. Soğuk-immobilizasyon stresi uygulanan sıçan mide mukozasında yüzey ve bez epitelinde hücre kaybı ve dökülmesine bağlı düzensizlik, piknotik nükleuslu (PN) bez epitel hücrelerinde vakuolizasyon (V), bez lümenlerinde genişleme ve lamina propria'nın diplerine dek inen derin kanama alanları (KA) izlenmektedir (Hematoksilen Eozin, x 594 büyütme ile).



Şekil 4. Kontrol (K), açlık (A), stres (S) gruplarında kalsiyum kanal blokerleri (ver: verapamil, dev: devapamil, gal: gallopamil) ile Ca-glukonat'ın (Ca-Glk) gastrik LP düzeyine etkileri. * Stres grubundan anlamlı farklılık ($p < 0.001$); + Kontrol grubundan anlamlı farklılık ($p < 0.001-0.05$)



Şekil 5. Kontrol (K), açlık (A), stres (S) gruplarında kalsiyum kanal blokerleri (ver: verapamil, dev: devapamil, gal: gallopamil) ile Ca-glukonat'ın (Ca-Glk) glutasyon düzeyine etkileri. *Stres grubundan anlamlı farklılık ($p < 0.001-0.05$); + Kontrol grubundan anlamlı farklılık ($p < 0.001$).

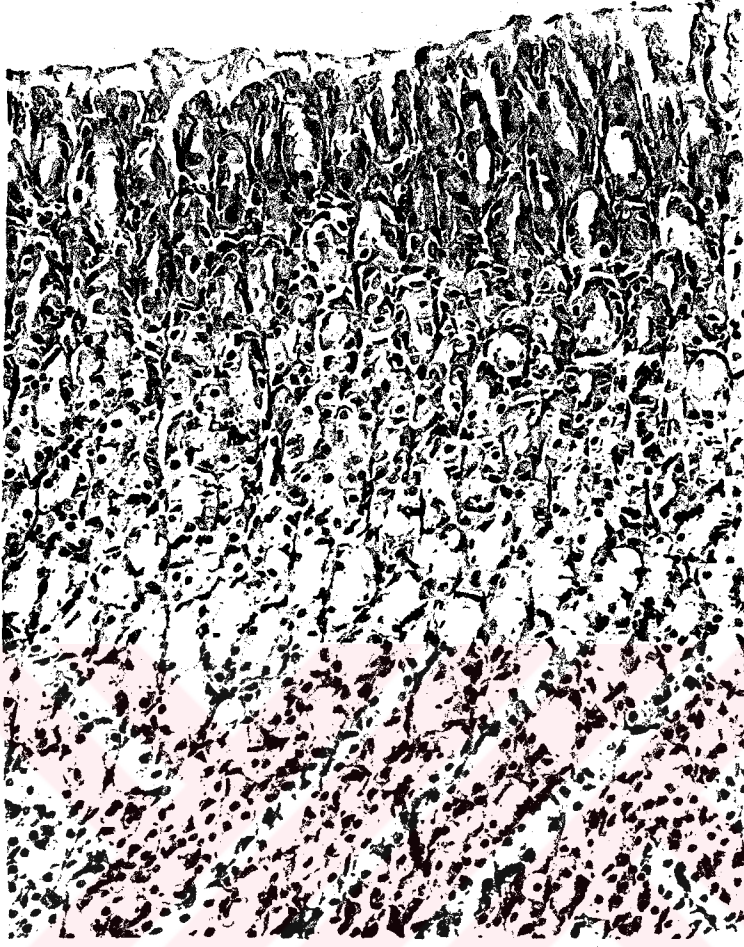
b) KALSİYUM KANAL BLOKERLERİ VE CA-GLUKONAT İLE ÖN TEDAVİ UYGULANAN GRUPLAR:

Ülser indeksi ve ülser gelişme yüzdesi:

Kalsiyum kanal blokerlerinden verapamil tüm dozlarda (0.01, 0.1 ve 1 mg/kg) doza bağımlı şekilde ülser indeksi (sırası ile 2.1 ± 0.9 mm, 2.0 ± 0.8 mm, 0.5 ± 0.3 mm) ve ülser gelişme yüzdesini (sırası ile %47, %47, %20) stres grubuna oranla azalttı ($p < 0.001$) (Tablo I). Devapamil ve gallopamil ülser indeksi ve ülser oluşma yüzdesini anlamlı şekilde azaltırlarken ($p < 0.05$ ve $p < 0.005$), her üç ilaç içinde en potent olanı gallopamil (0.01, 0.1 ve 1 mg/kg dozlarında ülser gelişme yüzdeleri sırası ile %13, %11, %14) olarak bulundu. Gallopamil (1 mg/kg) uygulanan mide dokusunun ışık mikroskobu düzeyindeki görüntüsü gösterilmiştir (Şekil 6). Ca-glukonat ise ülser indeksini stres grubuna oranla anlamlı şekilde azaltırken (2.4 ± 0.8 mm; $p < 0.05$), ülser gelişme yüzdesi %70 olarak bulundu (Tablo I; Şekil 1 ve 2).

Gastrik lipid peroksidasyon düzeyi:

Verapamil her üç dozunda da gastrik lipid peroksidasyon düzeyini stres grubuna oranla anlamlı şekilde azalttı ($p < 0.001$) (Tablo I). Bu etkide doza bağımlılık gözlenmedi. Devapamil ve gallopamil tüm dozlarda gastrik lipid peroksidasyonu stres grubundan anlamlı şekilde artırırlarken, devapamil 1 mg/kg ve gallopamil 0.1 ve 1 mg/kg dozlarında gastrik lipid peroksidasyonu kontrol düzeyinden de daha yüksek değerlere artırdılar ($p < 0.001-0.05$) Ca-glukonat'a bağlı gastrik lipid peroksidasyon ise stres grubundan farklı bulunmazken, kontrol grubundan anlamlı şekilde düşük bulundu ($p < 0.05$) (Tablo I; Şekil 4).



Şekil 6. Gallopamil (1 mg/kg) ön tedavisi uygulanan sıçan mide mukozasının ışık mikroskopu düzeyinde görüntüsü. Kontrol grubuna benzer morfolojiyi yansıtan yüzey epitelinde, yer yer düzensizlik ve dar kanama alanları görülmektedir. Bez epitel hücreleri stres grubuna oranla daha az harabiyeti yansıtırken, bez epitel lümenlerinde yer yer genişlemeler izlenmektedir (Hematoksilen Eozin, x 294 büyütme ile).

Gastrik glutasyon düzeyi:

Verapamil 0.01 mg/kg dozunda en fazla olmak üzere ($p < 0.001$) tüm dozlarda gastrik glutasyon düzeyini stres grubuna göre daha da azalttı ($p < 0.05$). Devapamil ve gallopamil ise gastrik glutasyon düzeyini doza bağımlı şekilde azalttılar ($p < 0.001-0.05$). Ca-glukonat ön tedavisi uygulanan grupta da, glutasyon hem kontrol hem de stres gruplarından anlamlı şekilde düşük olarak bulundu ($p < 0.001$) (Tablo I, Şekil 5).

Verapamil ile ön tedavi yapılan gruplarda gastrik lipid peroksidasyon ve gastrik glutasyon düzeyleri arasında pozitif korelasyon gözlenirken ($r = 0.736$; $p < 0.001$), devapamil ve gallopamil ön tedavisi yapılan gruplarda iki parametre arasında negatif korelasyon gözlemlendi ($r = -0.901$; $p < 0.05$).

IV. STRES SONRASI İYİLEŞME GRUPLARI:

a) TEDAVİSİZ GRUPLAR:

Ülser indeksi ve ülser gelişme yüzdesi:

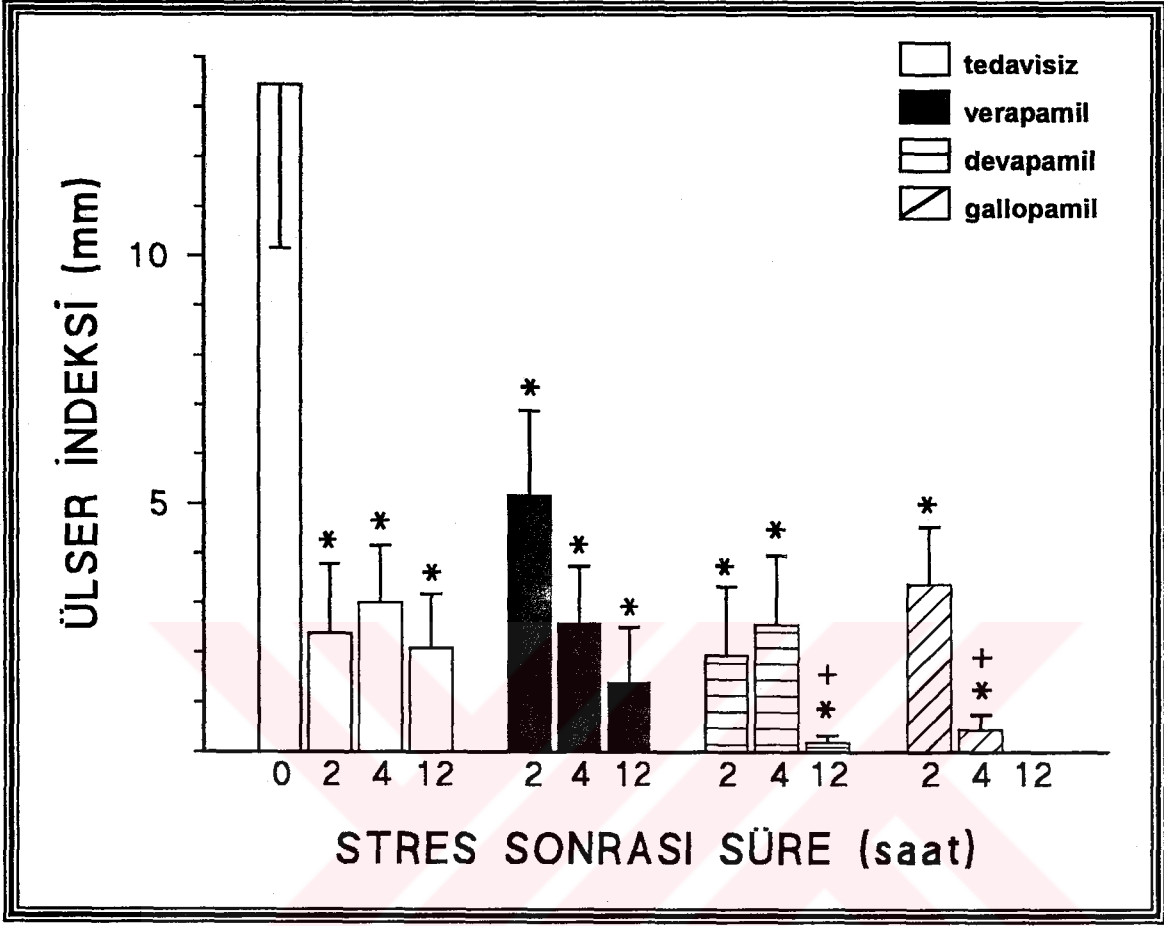
Stres sonrası kafeslerine alınarak kendi kendine iyileşmeye bırakılan gruplarda, 2, 4, 12 saatlerde ülser indekslerinde azalma olduğu (sırası ile 2.4 ± 1.4 mm, 3.0 ± 1.2 mm, 2.1 ± 1.1 mm) ve ülserlerin 24 saatte hemen tamamen iyileştiği (0.4 ± 0.3 mm) gözlemlendi. Ülser gelişme yüzdesi de zamana bağlı olarak azalma gösterdi. (Tablo II; Şekil 7 ve 8). Kendiliğinden iyileşmeye bırakılan gruplarda 48 saat sonra makroskopik olarak ülser görülmezken, mikroskopik incelemede hafif derecede epitel hasarı, epitel, lamina propria ve muskularis mukozada hipertrofik hücreler ve piknotik çekirdekli genişlemiş bezler gözlemlendi. Makroskopik olarak ülsere rastlanmayan 72 saatlik iyileşme grubunda da az miktarda mikroskopik değişikliğin devam ettiği gözlemlendi.

Tablo II: Tedavisiz gruplarda ve kalsiyum kanal blokerleri ile tedavi uygulanan gruplarda iyileşme sürecinde ülser indeksleri, ülseri gelişme yüzdeleri, gastrik lipid peroksidasyon (LP) ve glutatyon düzeyleri.

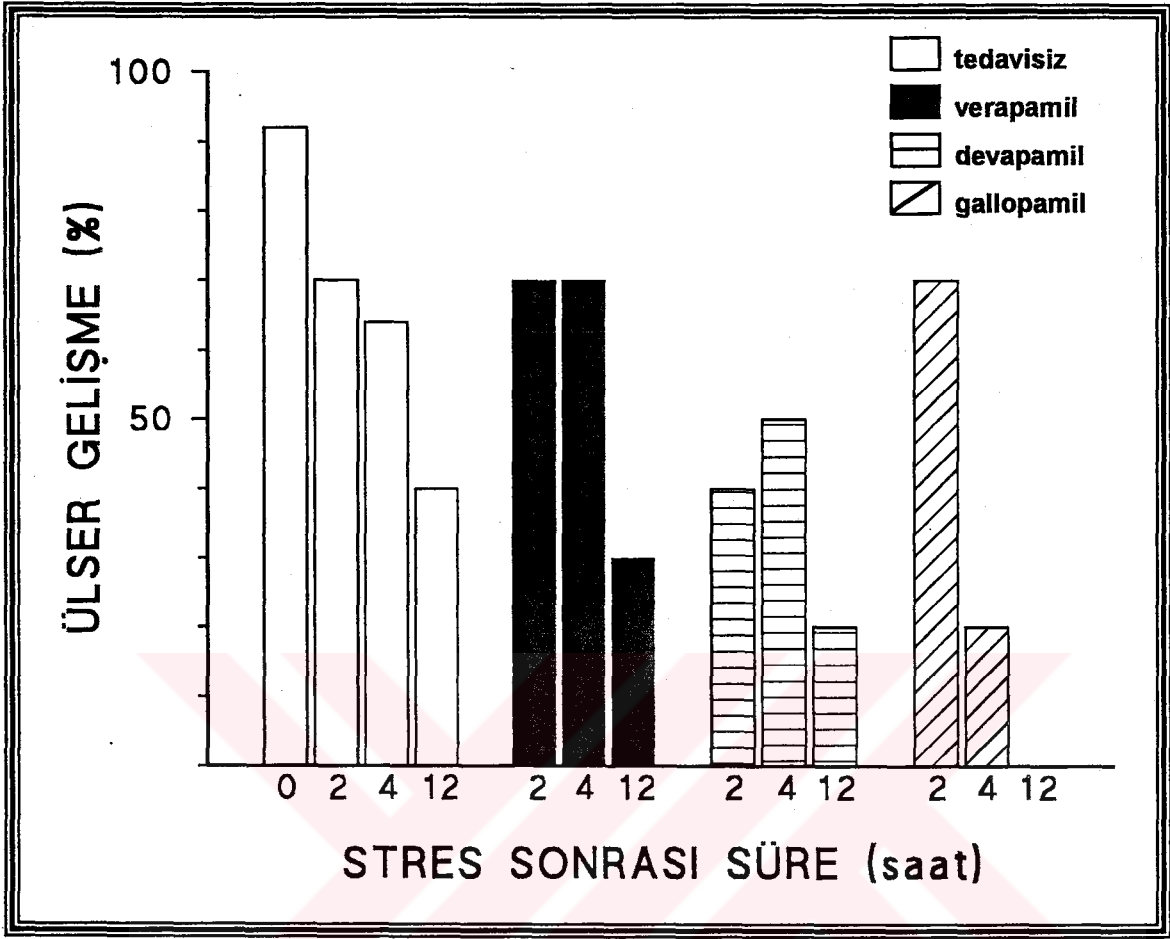
		ÜLSER İNDEKSİ (mm)	ÜLSER GELİŞME YÜZDESİ (%)	LP (nmol MDA/g)	GLUTATYON (μ mol/g)
I. KONTROL		0	0	24.7 \pm 4.1	2.58 \pm 0.23*
II. AÇLIK		0	0	8.7 \pm 1.6*	1.20 \pm 0.11
III. TEDAVİSİZ GRUP	İyileşme (saat)				
	0	13.5 \pm 3.3	92	19.5 \pm 2.1	1.42 \pm 0.11
	2	2.4 \pm 1.4*	70	24.2 \pm 1.8	0.79 \pm 0.07*
	4	3.0 \pm 1.2*	64	6.1 \pm 1.1*	1.08 \pm 0.10
	12	2.1 \pm 1.1*	40	7.8 \pm 0.6*	1.84 \pm 0.30
	24	0.4 \pm 0.3*	20	7.3 \pm 1.3*	1.58 \pm 0.40
	48	0	0	10.0 \pm 1.1*	1.50 \pm 0.30
	72	0	0	37.1 \pm 5.6*	0.66 \pm 0.10*
Verapamil (1 mg/kg)	2	5.2 \pm 1.7*	70	20.7 \pm 2.5	0.75 \pm 0.06*
	4	2.6 \pm 1.1*	70	12.1 \pm 0.9*+	2.70 \pm 0.15*+
	12	1.4 \pm 1.1*	30	10.7 \pm 0.4*+	2.43 \pm 0.10+
Devapamil (1 mg/kg)	2	1.9 \pm 1.4*	40	20.4 \pm 2.4	0.81 \pm 0.05*
	4	2.6 \pm 1.4*	50	24.5 \pm 2.9+	0.29 \pm 0.08*+
	12	0.2 \pm 0.1*+	20	27.7 \pm 5.1+	0.50 \pm 0.07*+
Gallopamil (1 mg/kg)	2	3.4 \pm 1.2*	70	26.9 \pm 2.3*	0.85 \pm 0.06*
	4	0.5 \pm 0.3*+	20	36.4 \pm 4.8*+	0.72 \pm 0.07*+
	12	0	0	33.6 \pm 5.9*+	0.57 \pm 0.06*+

* Stres (0. saatlik iyileşme) grubundan anlamlı farklılık (p< 0.001-0.05).

+ Tedavisiz aynı gruptan anlamlı farklılık (p< 0.001-0.05).



Şekil 7. Tedavisiz grupta ve verapamil, devapamil, gallopamil (1 mg/kg) tedavisi uygulanan gruplarda iyileşme sürecinde ülser indeksi. * Stres sonrası 0. saatlik gruptan anlamlı farklılık ($p < 0.001-0.05$); + İlaçsız aynı gruptan anlamlı farklılık ($p < 0.05$).



Şekil 8. Tedavisiz grupta ve verapamil, devapamil, gallopamil (1 mg/kg) tedavisi uygulanan gruplarda iyileşme sürecinde ülser gelişme yüzdesi.

Gastrik lipid peroksidasyon düzeyi (Tablo II; Şekil 9):

4 saatlik kendiliğinden iyileşme grubunda gastrik lipid peroksidasyon düzeyinin stres grubuna oranla düştüğü görüldü (6.1 ± 1.1 nmol MDA/g; $p < 0.001$). Bu değer artarak 48 saatte açlık grubundaki değerlere ulaştı. Gastrik lipid peroksidasyon değeri 48 saatten sonra da artmaya devam ederek 72 saat sonra 37.1 ± 5.6 nmol MDA/g gibi çok yüksek bir değere ulaştı.

Gastrik glutasyon düzeyi (Tablo II; Şekil 10):

Stres sonrası 2 saatlik dönemde gastrik glutasyon düzeyinde stres grubuna kıyasla anlamlı derecede azalma gözlemlendi (0.79 ± 0.07 μ mol/g). Daha sonra gastrik glutasyon düzeyi giderek artma göstermekle birlikte 72 saatlik iyileşme grubunda tekrar düştüğü görüldü (0.66 ± 0.10 μ mol/g).

b) KALSİYUM KANAL BLOKERLERİ İLE TEDAVİ UYGULANAN GRUPLAR:

Ülser indeksi ve ülser gelişme yüzdesi:

Verapamil ve devapamil'in 4 ve 12 saatlik iyileşme gruplarında ülser indeksi ve ülser oluşma yüzdesini tedavisiz gruplara kıyasla azalttığı bulundu (Verapamil 4 ve 12 saatlik gruplar sırası ile 2.6 ± 1.1 mm, 1.4 ± 1.1 mm; devapamil 4 ve 12 saatlik gruplar sırası ile 2.6 ± 1.4 mm, 0.2 ± 0.1 mm). Gallopamil ile tedavi edilen gruplarda daha hızlı bir iyileşme gözlemlendi ve 4 saat içinde ülserlerin hemen tamamen iyileşmiş olduğu görüldü (0.5 ± 0.3 mm) (Tablo II; Şekil 7 ve 8). Gerek ilaç tedavisi uygulanan gerekse tedavisiz kendi kendine iyileşen gruplarda, ülser indeksleri ile ülser oluşma yüzdeleri arasında pozitif korelasyon bulundu ($r = 0.783$; $p < 0.05$).

Histolojik inceleme de bu bulguları destekler nitelikte idi.

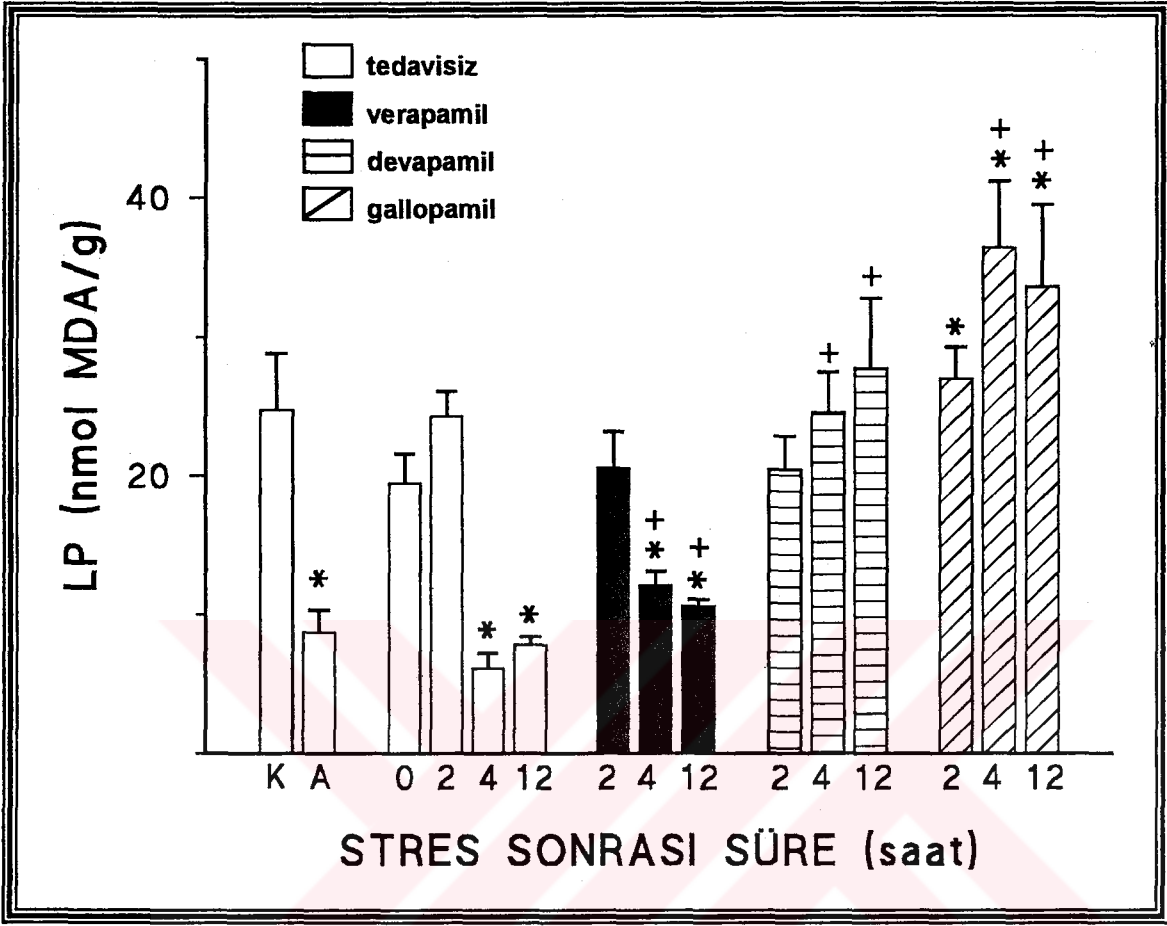
Gastrik lipid peroksidasyon düzeyi:

Verapamil tedavisi uygulanan 4 ve 12 saatlik gruplarda, tedavisiz gruplardaki gastrik lipid peroksidasyonda görülen azalma ortadan kalktı. Diğer taraftan, devapamil ve gallopamil uygulanan gruplarda gastrik lipid peroksidasyonun daha da yüksek seviyelere çıktığı gözlemlendi (Tablo II; Şekil 9).

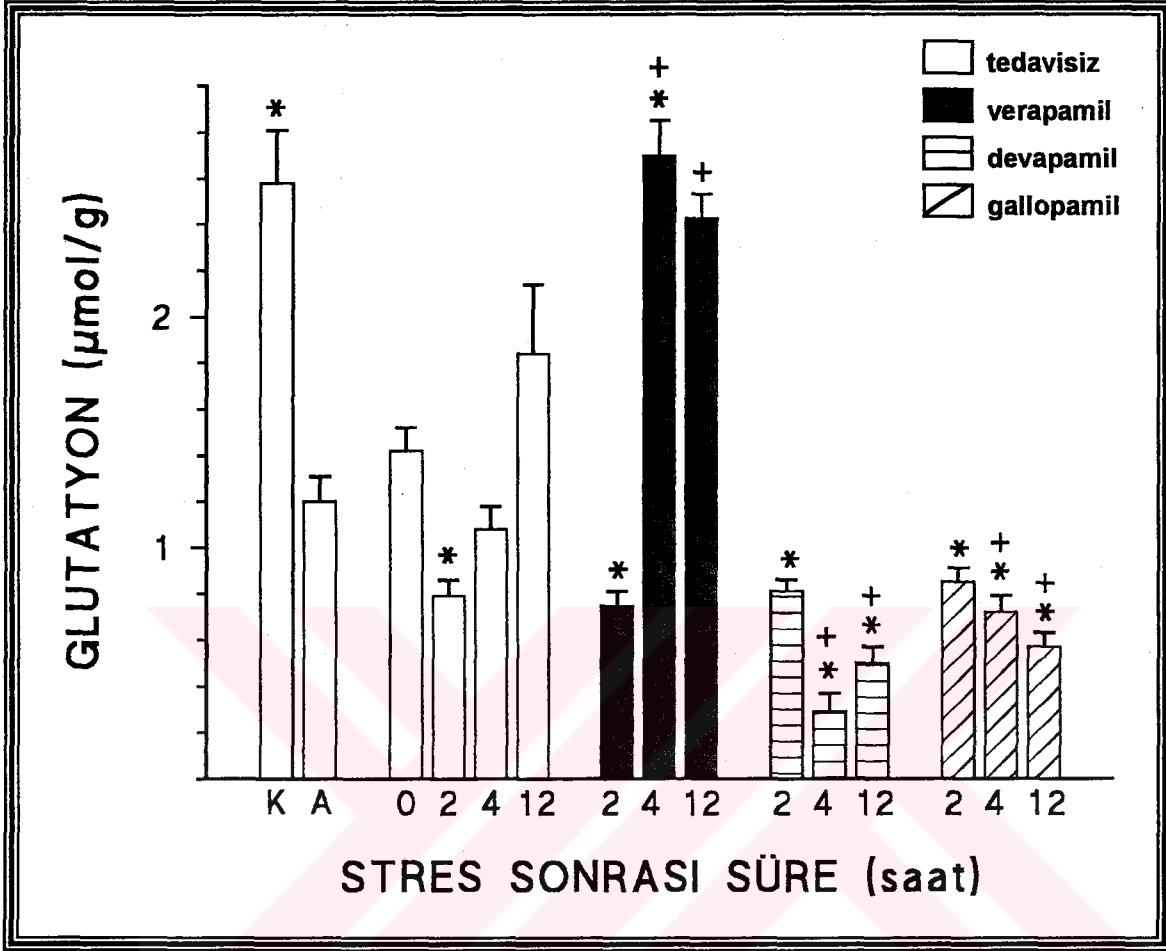
Gastrik glutatyon düzeyi:

Verapamil uygulanan gruplarda, gastrik glutatyon düzeyi artarak 4 saatte kontrol düzeyine ulaştı ($2.70 \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$). Ancak devapamil ve gallopamil tedavisi uygulanan 4 ve 12 saatlik gruplarda gastrik glutatyon düzeyi tedavisiz gruplara göre anlamlı şekilde azalma gösterdi (Tablo II; Şekil 10).

Tedavili ve tedavisiz gruplarda gastrik lipid peroksidasyon ve gastrik glutatyon düzeyleri arasında negatif korelasyon bulundu ($r = -0.704$; $p < 0.05$). Tedavisiz gruplar ve verapamil uygulanan gruplarda gastrik lipid peroksidasyon ve gastrik glutatyon düzeyleri ile ülser indeksleri arasında korelasyon bulunamadı. Ancak, devapamil ve gallopamil alan gruplarda gastrik lipid peroksidasyon düzeyleri ile ülser indeksleri arasında negatif bir korelasyon bulunurken ($r = -0.89$; $p < 0.05$), gastrik glutatyon ile ülser indeksleri arasında korelasyon bulunmadı.



Şekil 9. Tedavisiz grupta ve verapamil, devapamil, gallopamil (1 mg/kg) tedavisi uygulanan gruplarda iyileşme sürecinde gastrik lipid peroksidasyon düzeyleri. * Stres sonrası 0. saatlik gruptan anlamlı farklılık ($p < 0.001-0.05$); + İlaçsız aynı gruptan anlamlı farklılık ($p < 0.001$).



Şekil 10. Tedavisiz grupta ve verapamil, devapamil, gallopamil (1 mg/kg) tedavisi uygulanan gruplarda iyileşme sürecinde gastrik glutatyon düzeyleri. * Stres sonrası 0. saatlik gruptan anlamlı farklılık ($p < 0.001-0.05$); + İlaçsız aynı gruptan anlamlı farklılık ($p < 0.001- 0.05$).

TARTIŞMA

Bu bulguların ışığı altında, kullanılan her üç kalsiyum kanal blokleri (verapamil, devapamil, gallopamil) sıçanda soğuk-immobilizasyon stresine bağlı ülser gelişimini anlamlı şekilde azaltmakta ve ülser iyileşme hızını artırmaktadırlar.

Sıçanların belirli bir süre açlığı takiben, hareketsiz olarak belirli bir süre soğuk bir ortamda tutulması şeklinde gerçekleştirilen soğuk-immobilizasyon stresi, hayvanlarda belirgin derecede mide ülserlerine yol açan bir deney modelidir (4). Stres ülserinin gelişiminden pek çok faktör sorumlu tutulmaktadır. Bunlar arasında stres sırasında, mide düz kas kontraktilitesinde artma (16), mide mukozal kan akımında azalma (18) ve daha az oranda da mide asit salınımında artma (42, 43, 44) başta gelen faktörlerdir. Stres ülseri gelişiminde rol oynadığı öne sürülen diğer bir faktör ise serbest oksijen radikalleridir (45, 46). Serbest radikallerin iskemi/reperfüzyon, soğuk-immobilizasyon, etanol ve non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlara bağlı oluşan ülserlerdeki rolleri kesinleşmiştir (47, 48, 49). Mide mukozasında hasar oluşturma mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, doymamış yağ asitlerine, sülfürlü aminoasitler içeren proteinlere ve nükleik asitlere saldırarak hücre membranlarının vitalitesini bozdukları ve bu yolla hücre bariyerini etkiledikleri düşünülmektedir.

Kalsiyumun gastrointestinal sistemde pek çok olayda rol oynadığının ortaya çıkarılışını takiben kalsiyum kanal blokerlerinin bu fonksiyonlar ve mide ülseri dahil bazı patolojik olaylar üzerindeki etkisi dikkat çekmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, kimyasal yapıları birbirinden farklı üç kalsiyum kanal blokleri nitrendipin, diltiazem ve verapamil'in strese bağlı ülser gelişimini azalttıkları gösterilmiştir (26).

Kalsiyum kanal blokerlerinin ülsere karşı koruyucu etkilerinde olası mekanizmalar arasında mide asit salınımını engellemeleri (27), mide motilite ve kontraktilitesini azaltmaları (27, 29) mide kan akımını artırmaları (31) sayılmaktadır. Ayrıca lipoksijenaz yolağını inhibe ettikleri ve araziidonik asid metabolizmasını prostaglandinlere yönelttiklerine dair bulgular mevcuttur (27, 32). Tüm bu etkilerinin yanısıra, kalsiyum kanal blokerlerinin in vitro antioksidan özellikleri

olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (32, 33). Bazı araştırmacılara göre, serbest oksijen radikalleri sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu artırarak da etkili olmaktadır. Son yıllarda, perfüze sıçan kalbinde ve böbrek mitokondriumunda hasar oluşturmada serbest oksijen radikalleri ile sitozolik kalsiyumun aynı yönde etki gösterdikleri ortaya konulmuştur (21). Dolayısı ile, hücre hasarı serbest radikaller ve/veya kalsiyum artışına bağlı ise, kalsiyum kanal blokerlerinin serbest radikallere bağlı doku toksisitesini engelleyebilecekleri öne sürülebilir. Gerçekten de, bu çalışmada potensleri birbirlerinden farklı üç kalsiyum blokeri de strese bağlı ülser gelişimini önemli ölçüde engellediler. Ayrıca, strese bağlı artmış olarak bulunan gastrik lipid peroksidasyon (LP) verapamil tarafından engellenirken, devapamil ve gallopamil tarafından kontrol düzeylerine kadar artırıldı. 48 saat açlığa bağlı gastrik LP'deki düşüş, ekzojen doymamış yağ asitlerinin alınamayışına bağlanabilir. Devapamil ve gallopamil'in iyileşme sürecinde LP'yi artırmaları ise, stresin sona ermesini takiben reperfüzyon gelişmesi ile açıklanabilir.

Mide lezyonlarının gastrik glutatyonda azalma ile birlikte gittiğine dair bulgular vardır (50, 51). Bu çalışmada da verapamil özellikle iyileşme sürecinde strese bağlı azalmış glutasyon düzeylerini kontrole yakın artırdı; ancak, devapamil ve gallopamil'in doza bağımlı bir şekilde glutasyonu azaltmaya devam ettikleri gözlemlendi.

Bunların yanısıra, bu çalışmada stres ülserlerinin iyileşme hızları izlendiğinde, stres sonrası 24 saat içinde lezyonların tamamen kaybolduğu görüldü. Diğer taraftan, streste ve stres sonrası artan LP, stresten 4 saat sonra açlık düzeylerine düştü ve 72 saat sonra kontrolden de yüksek seviyelere çıktı. 72 saat sonra LP'de görülen bu artış, strese bağlı oluşan mukozal iskemiden sonra gelişebilecek mukozal kan akımındaki olası artışa bağlanabilir.

Kalsiyum kanal blokerlerinin her üçünün de ülser iyileşmesini hızlandırdıkları gözlemlendi. Gerek ön tedavi gruplarında gerekse iyileşme gruplarında gallopamil en potent olarak bulundu. İyileşme gruplarında verapamil tedavisi uygulananlarda gastrik LP ile glutasyon aynı şekilde artma eğilimi gösterirken, devapamil ve gallopamil tedavisi uygulananlarda aralarında ters bir ilişkinin bulunması, devapamil ve gallopamil'in ülser iyileştirici etkilerinde antioksidan etkilerinin rolü olmadığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, ön tedavi gruplarında da verapamil'in gastrik

LP ve glutatyona etkisi aynı şekilde azaltıcı yönde iken diğerlerinin etkisi ters yönlere bulundu. Devapamil ve gallopamil'in iyileşme sürecinde gastrik LP'de ileri derecede artışa yol açmaları nedeniyle, etkilerinde vazodilatasyon yapma özelliklerinin rolü olabileceği öne sürülebilir.

Kalsiyumun rolünün daha iyi açıklanabilmesi amacıyla ön tedavi olarak kalsiyum kanal blokerlerinin yerine Ca-glukonat verildiğinde ülser indeksinin stres grubuna göre azalmasına karşın, gastrik LP'nin stresten farklı olmayışı ve glutatyonun ise stresten düşük bulunması ilacın iyileştirici etkisinde antioksidan bir etkinin rolü olmadığını düşündürmektedir. Ca-glukonat ile yapılan çalışmalarda, ilacın serum kalsiyum miktarını artırırken, mide glandüler kas tabakasında kalsiyum düzeyini azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle, Ca-glukonat'ın ülser üzerindeki iyileştirici etkisi, stres ülseri patogenezinde yer alan gastrik glandüler kasta intraselüler kalsiyum artışını engellemesiyle açıklanabilir (38). Dolayısı ile, kasta intraselüler kalsiyum azalması, streste gelişen parasempatik sistem aracılı mide kontraktilitesindeki artışı önleyerek, ülser gelişimini engellemektedir.

Bu verilerin ışığı altında, kalsiyumun stres ülseri gelişiminde çok önemli bir rolü olduğu ve kalsiyum kanal blokerlerinin ülser gelişimini engellediği ortaya konmuştur. Ancak, kalsiyumun stres ülserleri üzerine olan bu etkisinin mekanizmalarını aydınlatılabilmek amacı ile, stres ülseri oluşturulan sıçanlarda mide boşalma hızının ya da mide mukozal kan akımının ölçümüne dayanan çalışmaların yapılmasına gerek vardır.

Stres ülserlerinin etiopatogenezi hakkında bilgi edinmek amacı ile deneysel olarak sıçanlar üzerinde geliştirilen modeller arasında soğuk-immobilizasyon stresi en etkin deney modelidir. Yapılan araştırmaların ışığı altında stres ülserine yol açan faktörler arasında mide asit salınımında artma, mide kontraktilesinde artma, mide mukozal kan akımında azalma, mide bikarbonat düzeyinde azalma ve serbest oksijen radikalleri bulunmaktadır. Bazı araştırmacılara göre, serbest radikaller sitozolik kalsiyum düzeyini artırmak yolu ile etkili olmaktadır.

Bu bulgulardan yola çıkılarak yapılan bu çalışmada da kalsiyumun stres ülserleri üzerindeki rolünün araştırmak amacı ile aynı gruptan (L-tipi) ancak potensleri birbirlerinden farklı olan üç ayrı kalsiyum kanal blokeri (verapamil, devapamil ve gallopamil) ve ayrıca Ca-glukonat kullanılarak bu ilaçların strese bağlı ülser oluşumuna, gastrik lipid peroksidasyon ve gastrik glutatyon düzeyleri üzerine etkilerine bakıldı. Kalsiyum kanal blokerleri ve Ca-glukonat stres ülserlerini anlamlı şekilde engellerken, verapamil tedavisi yapılan gruplarda gastrik LP ile glutatyon düzeyleri arasında pozitif korelasyon gözlemlendi. Devapamil ve gallopamil tedavisi uygulanan gruplarda iki parametre arasında negatif korelasyon gözlenirken, Ca-glukonat verilen gruplarda gastrik LP stresten farklı bulunmadı, glutatyon strese göre düşük bulundu.

Bunların yanısıra, tedavisiz ve kalsiyum kanal blokerleri ile tedavi edilen gruplarda ülserlerin iyileşme süreçlerine bakıldı. Tedavisiz gruplarda ülserler 24 saatte hemen tamamen iyileştiler. Kalsiyum kanal blokerlerinin ülser iyileşme hızını artırdıkları gözlemlendi. Verapamil uygulanan gruplarda gastrik LP ile glutatyon aynı yönde artma eğilimi gösterirken, devapamil ve gallopamil uygulanan gruplarda iki parametre arasında ters ilişki gözlemlendi.

Sonuç olarak, devapamil, gallopamil ve Ca-glukonat'ın iyileştirici etkilerinde antioksidan etkilerinin rolü olmadığı düşünülmektedir. Kalsiyumun rolünün açıklanabilmesi için, mide mukozal kan akımı ölçümleri, mide boşalma hızı ölçümleri gibi çalışmaların yapılmasına gerek vardır.

SUMMARY

SUMMARY

There are several experimental models in rats which have been used to evaluate the pathogenesis of stress ulcers. One of the most effective is the cold-restraint ulcer model. Among the factors which are thought to cause such ulcers are an increase in gastric acid secretion, an increase in gastric contractility, a decrease in gastric mucosal blood flow and the role of free oxygen radicals. It has been suggested that one of the effects of the free oxygen radicals is to raise the cytosolic calcium concentration.

In this study, I aimed to investigate the role of calcium in stress ulcers and used L-type calcium channel blockers (verapamil, devapamil and gallopamil) which are different in their potencies and Ca-gluconate. Their effects on ulcer formation, gastric lipid peroxidation and glutathione levels were observed. The calcium channel blockers and Ca-gluconate prevented ulcer formation. In verapamil treated groups, there was a positive correlation between gastric LP and glutathione levels while in devapamil and gallopamil treated groups there was a negative correlation between them. In Ca-gluconate treated animals, gastric LP was not different than stress group and glutathione level was lower than the same group.

On the other hand, we investigated the healing both in untreated and treated groups with calcium channel blockers. In untreated recovery groups, almost all of the ulcers disappeared within 24 hours. The calcium channel blockers increased the healing rate of the ulcers. In verapamil treated animals, gastric LP and glutathione levels were both increased while in devapamil and gallopamil treated rats gastric LP was increased and glutathione was decreased.

As a result, it is suggested that the protective effects of devapamil, gallopamil and Ca-gluconate are not due to their antioxidant actions. Further studies such as the determination of gastric mucosal blood flow and the rate of gastric emptying would provide additional data about the role of calcium in stress ulcers.

KAYNAKLAR

1. Hernandez DE. Neuroendocrine mechanisms of stress ulceration: focus on thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Life Sci.* 39: 279-296, 1986.
2. Sen RN, Anand BK. Effect of electrical stimulation of the hypothalamus on gastric secretion activity and ulceration. *Ind. J. Med. Res.* 45: 515-521, 1957.
3. Henke PG. The hypothalamus-amygdala axis and experimental gastric ulcers. *Neuroscience Biobehav. Rev.* 3: 75-82, 1979.
4. Boyd SC, Caul WF, Bowen BC. Use of cold-restraint to examine psychological factors in gastric ulcers. *Physiol. Behav.* 18: 865-870, 1977.
5. Lau HK, Ogle CW. The protective role of the adrenal medulla against reserpine-induced gastric ulcers in rats. *Pharmacol. Res. Commun.* 11: 869-879, 1979.
6. Szabo S. Dopamine disorder in duodenal ulceration. *Lancet* 27: 880-882, 1979.
7. Nobrega JN, Wiener NI. Effects of catecholamine agonist and antagonist drugs on acute stomach ulceration induced by medial hypothalamic lesions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19: 831-838, 1983.
8. Hernandez DE, Adcock JW, Orlando RC, Patrick KS, Nemeroff CB, Prange AJ. Prevention of stress induced gastric ulcers by dopamine agonists in the rat. *Life Sci.* 35: 2453-2458, 1984.

9. Innis DL, Tansy MF. Gastric mucosal ulceration associated with electrochemical stimulation of the limbic brain. *Brain Res. Bull.* 5: 33-36, 1980.
10. Ferri S, Arrigo-Reina R, Candeletti S, Costa G, Murari G, Speroni E, Gato G. Central and peripheral sites of action for the protective effect of opioids of the rat stomach. *Pharmacol. Res. Comm.* 15: 409-418, 1983.
11. Glavin GB. Effects of morphine and naloxone on restraint-stress ulcers in rats. *Pharmacol.* 31: 57-60, 1985.
12. Guillemin R, Vargo T, Rossier J, Minick S, Lung S, Rivier C, Vale W, Bloom F. Beta-endorphin and adrenocorticotropin are selected concomitantly by the pituitary gland. *Science* 197: 1367-1369, 1977.
13. Hernandez DE. The role of brain peptides in the pathogenesis of experimental stress gastric ulcers. *Ann. NY. Acad. Sci.* 597: 28-35, 1990.
14. Puri S, Ray A, Chakravarty AK, Sen P. Role of histaminergic mechanisms in the regulation of some stress responses in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39: 847-850, 1991.
15. Hernandez DE, Salaiz AB, Morin P, Moreira MA. Administration of thyrotropin-releasing hormone into the central nucleus of amygdala induces gastric lesions in rats. *Brain Res. Bull.* 24: 697-699, 1990.
16. Weiner H. From simplicity to complexity (1950-1990): The case of peptic ulceration- II. Animal studies. *Psychosom. Med.* 53: 491-516, 1991.

17. Stein TA, Keegan LM, Auguste LJ, Bailey B, Wise L. Stress-induced gastric lesions and the synthesis of prostaglandins and leukotrienes. *J. Surg. Res.* 51, 386-371, 1991.
18. Dubois A. Stress ulceration-clinical relevance of animal and human studies. *Chronobiol. Int.* 4: 69-73, 1987.
19. Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 30: 293-298, 1989.
20. Esterbauer H. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF eds. *Free radicals in liver injury*. IRL Press Limited, Oxford, England 1985: 29-47.
21. Jacinto SM, Jandhyala BS. Evaluation of the effects of felodipine, verapamil and hydralazine on the survival rate of rats subjected to lethal effects of oxygen free radicals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 346: 457-461, 1992.
22. Schramm M, Towart R. Modulation of calcium channel function by drugs. *Life Sci.* 37: 1843-1860, 1985.
23. Pascoe GA, Reed DJ. Cell calcium, vitamin E and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Radical Biol. Med.* 6: 209-224, 1989.
24. Alps BJ. Drugs acting on calcium channels: potential treatment for ischaemic stroke. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34: 199-2006, 1992.

25. Aadland E, Berstad A. Effect of verapamil on gastric secretion in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 18: 969-971, 1983.
26. Glavin GB. Calcium channel modulators: effects on gastric function. *Eur. J. Pharmacol.* 160, 323-330, 1989.
27. Ghanayem BI, Matthews HB, Maronpot RR. Calcium channel blockers protect against ethanol- and indomethacin- induced gastric lesions in rats. *Gastroenterology* 92: 106-111, 1987.
28. Sewing KF, Hannemann H. Calcium channel antagonists verapamil and gallopamil are powerful inhibitors of acid secretion in isolated and enriched guinea pig parietal cells. *Pharmacology* 27: 9-14, 1983.
29. Nielsen ST, Sulkowski TS. Protection by the calcium antagonist Wy-47,037 against stress ulceration in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29: 129-132, 1988.
30. Ogle CW, Cho CH, Tong MC, Koo MW. The influence of verapamil on the gastric effects of stress in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 399-404, 1985.
31. Fleckenstein A, Frey M, Fleckenstein-Grum G. Myocardial and vascular damage by intracellular calcium overload. Preventive actions of calcium antagonists. In: Gogfraid T, Vanhoutte PM, Govoni S, Paoletti R, eds.. *Calcium entry blockers and tissue protection*. New York: Raven, 1985: 91-105.
32. Levine L. Inhibition of the A-23187-stimulated leukotriene and prostaglandin biosynthesis of rat basophil leukemia (RBL-1) cells by non-steroidal anti-inflammatory drugs, antioxidants, and calcium channel blockers. *Biochem. Pharmacol.* 32: 3023-3026, 1983.

33. Mak IT, Weglicki WB. Comparative antioxidant activities of propranolol, nifedipine, verapamil, and diltiazem against sarcolemmal membrane lipid peroxidation. *Circ. Res.* 66: 1449-1452, 1990.
34. Mak IT, Boehme P, Weglicki WB. Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells. *Circ. Res.* 70: 1099-1103, 1992.
35. Gonçalves T, Carvalho AP, Oliveira CR. Antioxidant effect of calcium antagonists on microsomal membranes isolated from different brain areas. *Eur. J. Pharmacol.* 204: 315-322, 1991.
36. Ondrias K, Misik V, Gergel D, Stasko A. Lipid peroxidation of phosphatidylcholine liposomes depressed by the calcium channel blockers nifedipine and verapamil and by the antiarrhythmic-antihypoxic drug stobadine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1003: 238-245, 1989.
37. Koo MWL, Cho CH, Ogle CW. Verapamil worsens ethanol-induced gastric ulcers in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 120: 355-358, 1986.
38. Koo MWL, Cho CH, Ogle CW. The antiulcer effect of verapamil in relation to gastric calcium levels in stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 34: 73-76, 1989.
39. Senay EC, Levine RJ. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124: 1221-1223, 1967.
40. Casini A, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am. J. Pathol.* 123: 520-531, 1986.

41. Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 36: 71-76, 1985.
42. Garrick T, Buack S, Bass P. Gastric motility is a major factor in cold restraint-induced lesion formation in rats. *Am J Physiol* 250: G192-199, 1986.
43. Cho CH, Ogle CW. Cholinergic-mediated gastric mast cell degranulation with subsequent histamine H1- and H2-receptor activation in stress ulceration in rats. *Eur J Pharmacol* 55: 23-33, 1979.
44. Cho CH, Hung KM, Ogle CW. The aetiology of gastric ulceration induced by electrical vagal stimulation in rats. *Eur J Pharmacol* 110: 211-217, 1985.
45. Stein HJ, Esplugues J, Whittle BJR, Bauerfeind P, Hinder RA, Blum AL. Direct cytotoxic effect of oxygen radicals on the gastric mucosa. *Surgery* 106: 318-324, 1989.
46. Esplugues JV, Whittle BJR. Gastric damage following local intra-arterial administration of reactive oxygen metabolites in the rat. *Br J Pharmacol* 97: 1085-1092, 1989.
47. Szelenyi I, Brune K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 33: 865-871, 1988.
48. Del Soldato P, Forschi D, Benoni G, Scarpigno C. Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury. *Agents Actions* 17: 484-488, 1985.

49. Mizuni T, Doteuchi M. Lipid peroxidation: A possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci* 38: 2163-2167, 1986.
50. Boyd CS, Sesame HA, Boyd MR. Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by diethylmaleate given subcutaneously to rats. *Life Sci* 28: 2987-2992, 1981.
51. Ghanayem BI, Boor JP, Ahmed AE. Acrylonitrile-induced gastric mucosal necrosis:role of gastric glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 570-577, 1985.



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ