

54976

T.C.
OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

VAZOAKTİF İNTESTİNAL PEPTİD (VIP) İN
SIÇANLARDA STRESLE OLUŞTURULMUŞ MİDE ÜLSERLERİ
ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Dr. Nilüfer Erkasap

Danışman : Prof.Dr. Neş'e Tunçel

Kasım-1997

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dr. Nilüfer ERKASAP'ın DOKTORA TEZİ olarak hazırladığı "**Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)'ün Sıçanlarda Stresle Oluşturulmuş Mide Ülserleri Üzerine Koruyucu Etkisi**" başlıklı çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

04 / 12 / 1997

ÜYE: Prof.Dr. Neş'e TUNÇEL



ÜYE: Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK



ÜYE: Prof.Dr. Ziya KAYGISIZ



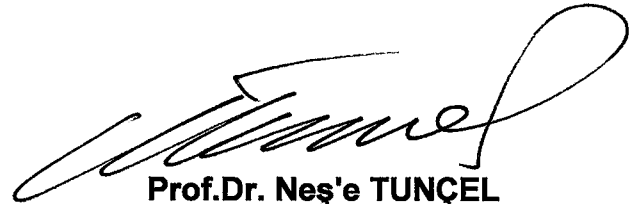
ÜYE: Doç.Dr. Hızır KURTEL



ÜYE: Doç.Dr. Tülay SARIÇAM



Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16.12.1997 tarih ve 406/954 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr. Neş'e TUNÇEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)' in sıçanlarda stresle oluşturulmuş mide ülserleri üzerine koruyucu etkisi

Soğukta-hareketsizlik stresine bağlı gelişen mide ülserlerinin patogenezinde pek çok faktör rol oynamakla birlikte tam mekanizma henüz açık değildir. Mast hücre degranülasyonunun, midede artmış düz kas kasılmasının, mukozal kan akımı azalmasının, çeşitli biyojenik aminlerin salınımının, PMNL (polimorfonükleer lökosit) aktivasyonu ve toksik oksijen moleküllerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunun soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mide ülserlerine neden olduğu ileri sürülmektedir. Son zamanlarda VIP' in doku hasarı üzerine koruyucu etkisinin olduğu bildirilmektedir. VIP mast hücre degranülasyonunu engelleyerek, mide ve damar düz kasını gevşeterek, antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstererek soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mide ülserlerini önleyebilir.

Çalışmamızda Sprague Dawley türünden 200-220 gr ağırlığında her iki cinse ait 52 adet sıçan kullanılmıştır. Deneyler 2 aşamada planlanmıştır. I. aşamada; 34 adet sıçan kullanılmıştır. GI : kontrol grubu (n:5+6), GII : soğukta-hareketsizlik stresi uygulanan ve stres öncesi 0.1 cc serum fizyolojik (i.p) verilen grup (n: 5+6) ve GIII : stres öncesi 25 ng kg⁻¹ VIP (i.p) verilen grup (n: 6+6). Stres uygulaması için sıçanlar hareketlerini engelleyen tel kafesler içinde 3 saat (08.30 ile 11.30 arası) süreyle 4°C' de muhafaza edilmişlerdir ve stres uygulamasından hemen sonra servikal dislokasyon ile öldürülüp mideleri çıkarılmıştır. I ve II. gruptan 5 ve III. grubdan 6 adet sıçan morfolojik ve histolojik değerlendirmeye alınmıştır. I, II ve III. grupların her birinden diğer 6 adet sıçanın midelerinin bir duvarı, doku lipid peroksidasyonu [Malondialdehit

(MDA)] ve antioksidan enzim (Süperoksit dismutaz ve katalaz) aktivitelerinin tayini için kullanılmıştır. Diğer duvar ise histamin ve metilhistamin tayini için kullanılmıştır. Süperoksit dismutaz ve malondialdehit spektrofotometrik, katalaz ise polarografik yöntemle tayin edilmiştir. Histamin ve metilhistamin ise yüksek basınçlı sıvı kromatografı (HPLC) ile tayin edilmiştir.

II. aşamada; G_A (n:6), G_B (n:6) ve G_C (n:6) olmak üzere toplam 18 adet sıçan kullanılmıştır. Bu gruplarda stres sonrası 25 ng kg⁻¹ VIP 1, 2 ve 3 gün üst üste verilmiştir. II. aşamaya ait sıçanların mide dokuları sadece morfolojik incelemeye alınmıştır.

Soğukta-hareketsizlik stresi, mide dokusunda lezyonlara, mast hücre degranülasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olmuştur. VIP, stresle oluşturulmuş mide ülserlerini ve mast hücre degranülasyonunu engellemiştir. VIP ayrıca mide dokusunu lipid peroksidasyonundan korumuştur. Stres ülserlerinin oluşumundan sonra VIP kullanımında ise, VIP' in ülseri etkin bir şekilde tedavi ettiği gözlenmiştir..

SUMMARY

The protective effect of Vasoactive intestinal peptide (VIP) against stress-induced gastric ulceration in rats.

The pathogenesis of cold-restraint stress ulcer involves various factors and is not completely understood. Mast cell degranulation, increased gastric muscular contractility, diminished mucosal blood flow, release of several biogenic amines, activated polymorphonuclear leukocytes and lipid peroxidation that results from toxic oxygen molecules were suggested to be related to production of gastric damage by cold-restraint stress. Recently, it has been reported that VIP protects tissues against injuries. VIP may protect cold-restraint stress induced gastric ulcer development by inhibiting mast cell degranulation, relaxing stomach and smooth muscle of the blood vessels, acting antioxidant and antiinflammatory agents in rats.

52 (Sprague Dawley) rats (200-220 g) of both sexes were used in two series of experiment. In first series ; 34 rats were used. GI : Controls (n:5+6), GII : Cold-restraint stress. Physiological serum was injected (i.p) to this group prior to stress (n:5+6), GIII : Prior to stress 25 ng kg⁻¹ VIP (i.p) was given (n:6+6). Stress procedure : The rats were exposed to cold-restraint stress (4 °C for 3 hr) in tight wire cages between 8³⁰-11³⁰ hours. The stomach of 5 rats from the groups I and II , the stomach of 6 rats from the group III were evaluated by morphologically and histologically. One of the symmetric part of the stomach of 6 rats from the groups I, II and III were used for the determination of tissue lipid peroxidation [Malondialdehyde (MDA)] and antioxidant enzyme (Superoxide dismutase and catalase) activities. The other symmetric part of stomach of rats from groups I, II and III were used for the determination of tissue histamine and methylhistamine levels. Catalase was determined polarographically, superoxide dismutase and malondialdehyde were measured spectrophotometrically in tissue

homogenates. Histamine and methylhistamine were measured in tissue homogenates by using high performance liquid chromatography (HPLC). In second series of experiments ;18 rats were used G_A (n:6), G_B : (n:6) and G_C (n:6), VIP was administered to the rats (i.p) after stress exposure for one day, two and three consecutive days respectively. The stomach of rats from group G_A, G_B and G_C were examined only macroscopically.

Cold-restraint stress induced gastric lesions, mast cell degranulation and also increased in lipid peroxidation in rat gastric tissue. VIP prevented stress-induced ulcer development, mast cell degranulation and it protected gastric tissue from lipid peroxidation. When VIP was used after induction of stress ulcer it has also therapeutically beneficial effect.

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.: VIP' in mide dokusu üzerine etki mekanizması

Şekil 2.: Mide dokusunun makroskopik görünümü;

- a) soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mide lezyonlarının görünümü
- b) soğukta-hareketsizlik stresi öncesi VIP uygulanan grupta midenin görünümü

Şekil 3.: Sıçanlarda soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mukozal lezyonların histolojik görünümü

- a) kanamalı mukozal hasar hematoksil-eozin (HE). Orjinal büyütme x 33
- b) PMNL infiltrasyonunun artışı hematoksil-eozin (HE) x 66

Şekil 4.: Sıçanlarda soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mide mukozasındaki lezyonlar üzerine VIP' in etkisinin ışık mikroskopik görünümü hematoksil-eozin (HE). Orjinal büyütme x 33

Şekil 5.: Sıçanlarda soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mide dokusu submukozal mast hücre degranülasyonu. Alcian blue-safranin. Orjinal büyütme x 330.

Şekil 6.: Sıçanlarda soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mide dokusu submukozal mast hücre degranülasyonunun VIP uygulaması ile inhibisyonu. Alcian blue-safranin. Orjinal büyütme x 132

Şekil 7.: Ortalama ülser indeksi.

Şekil 8.: Polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu.

Şekil 9.: SOD enzim aktivitesi

Şekil 10.: Katalaz enzim aktivitesi

Şekil 11.: Doku Malondialdehit (MDA) düzeyleri

Şekil 12.: Standart çözeltiye ait histamin, metilhistamin ve RMH[1-methyl-5-(β -amino-ethyl)-imidazole;pros-methylhistamine] düzeylerinin kromatogramı.

Şekil 13.: Doku histamin düzeyleri

Şekil 14.: Doku metilhistamin düzeyleri

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.: Total submukozal mast hücre sayısı

Tablo 2.: Submukozal mast hücrelerinin histokimyasal heterojenitesi

Tablo 3.: Stres sonrası VIP uygulamasının mide lezyonları üzerine etkisi.



ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Dinar' da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Isparta' da tamamladım. 1990 yılında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi' nden mezun olduktan sonra Eskişehir Devlet Hastanesi' nde Acil Servis hekimi olarak çalıştım. 1991 yılında Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimime başladım ve halen devam etmekteyim. Evliyim ve bir kızım var.



TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalıőmalarım sırasındaki değerli bilgi ve katkılarından dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. Neş'e Tunçel' e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarımda değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Baőkanı sayın Prof.Dr. Muzaffer Tunçel' e ve histokimyasal çalıőmalarımızın yapılmasında ve değerlendirilmesinde bize yardımcı olan Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Varol őahintürk' e ve manevi desteğinden dolayı sevgili eőime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
SUMMARY.....	III
ŞEKİL DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ.....	VII
ÖZGEÇMİŞ.....	VIII
TEŞEKKÜR.....	X
İÇİNDEKİLER.....	XI
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Stres ülserinin patogenezinin sorumlu faktörleri.....	3
2.1.1. Mukozal harabiyete neden olan faktörler.....	3
2.1.1.1. Asit sekresyonu.....	3
2.1.1.2. Artmış mast hücre degranülasyonu ve çeşitli biyojenik aminlerin salınımı.....	4
2.1.1.3. Reaktif oksijen ürünleri.....	5
2.1.1.4. Artmış vagal uyarım.....	7
2.1.1.5. Artmış mide düz kas kasılması.....	7
2.1.2. Savunma mekanizması yetersizlikleri.....	8
2.1.2.1. Mukozal bariyerin yıkılması.....	8
2.1.2.2. Mukus / bikarbonat salgısının azalması.....	8
2.1.2.3. Mide mukozal kan akımının azalması.....	9
2.1.2.4. Epitel yenilenmesinin azalması.....	9
2.1.2.5. Prostaglandin sentezinin azalması.....	10
2.2. Vazoaktif intestinal peptid.....	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	14
3.1. Deney hayvanları.....	14

3.2. Deneyin yapılışı.....	15
3.3. Dokudan antioksidan enzim tayini.....	16
3.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD) tayini.....	16
3.3.2. Katalaz tayini.....	16
3.3.3. Malondialdehit (MDA) tayini.....	16
3.3.4. Doku histamin ve metilhistamin tayini.....	17
3.4. Kromatografik şartlar.....	17
3.5. Morfolojik ve histolojik inceleme.....	18
3.6. İstatistiksel değerlendirme.....	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. Stres öncesi VIP uygulanan I. aşama deney grubuna ait bulgular.....	20
4.1.1. Morfolojik ve Histolojik bulgular.....	20
4.1.1.1. Sayısal değerler açısından mast hücresi bulguları...24	
4.1.1.2. Ülser indeksi ve PMNL infiltrasyon skoru sonuçları...26	
4.1.2. Antioksidan enzim (SOD ve Katalaz) ve MDA düzeyleri...27	
4.1.3. Histamin-Metilhistamin kromatogramı.....	30
4.1.4. Histamin-Metilhistamin düzeyleri.....	31
4.2. Stres sonrası VIP uygulanan II. aşama deney grubuna ait bulgular.....	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	34
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	39

1. GİRİŞ ve AMAÇ :

Her türlü stres koşulu, organizmanın homeostazisinin değişmesine ve vücutta birçok fizyolojik mekanizmanın bozulmasına neden olur. Mide mukozasında ortaya çıkan akut ülserasyonlar, stresin neden olduğu önemli patolojiler arasındadır. Strese bağlı ülserasyonların patogenezisinden sorumlu tutulan mekanizmalar tam aydınlatılmış olmamakla birlikte; mide mukozasına ait savunmadan sorumlu faktörlerin yetersizliği, mast hücrelerinin degranülasyonu sonucu salıverilen histamin, artan lökotrien sentezi, mukozal kan akımındaki azalmaya bağlı iskemi, mide düz kas kasılmasındaki artış, polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu lezyonların oluşmasındaki nedenler olarak kabul edilmektedir.

Vazoaktif intestinal peptid (VIP) yukarıda sözü edilen ve strese bağlı mide mukozasında ülser oluşmasından sorumlu tutulan bir çok faktörü ortadan kaldıracak etkilere sahip bir peptid olabilir. Çünkü çeşitli çalışmalar VIP' in mast hücrelerinin degranülasyonunu ve proliferasyonunu engellediğini, testis dokusun da histamin düzeyini azalttığını (59,60,63,64,66), damar ve fundus düz kaslarını gevşettiğini (49), çeşitli dokuları iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğunu (2,26,52,65,67,68), antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu bildirmektedir (40,50,65,67,68). Yapılan kaynak taramalarında da VIP' in mide ülserleri üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle, çalışmamızda soğukta hareketsizlik stresine maruz bırakılan sıçanlarda oluşturulan mide ülserleri üzerine VIP'in etkisi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda mide dokusunda morfolojik ve histolojik değerlendirmelere ilaveten, histamin, metilhistamin, antioksidan enzim (süperoksit dismutaz ve katalaz) ve lipid peroksidasyon düzeyleri tayin edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER :

Biyolojik bir duyu olarak stres teriminin ilk olarak 1946 yılında Hans Selye tarafından kullanıldığı ileri sürülmekle birlikte stresi ilk olarak 1935 yılında tanımlayan Canon olmuştur (33). Ancak stres tanımının yaygınlaşması, genel kabul görmesi ve strese neden olan etkenlerin stressör olarak tanımlanıp yaygınlaşması Hans Selye' nin çalışmaları ile gerçekleşmiştir. Her türlü stres koşulu organizmanın homeostazisini değiştirip visseral, endokrin ve davranış değişiklikleri gibi kompleks mekanizmaların bozulmasına neden olmaktadır. Stres sırasında kişilerin fiziksel ve emosyonel dayanma güçlerinin zorlandığı ve sağlıklarının olumsuz yönde etkilendiği söz konusu olmakla birlikte, stres organizmanın fizyolojik bir cevabı olarak kabul edilmektedir. Stressörlere verilen cevabı Selye "Genel uyum cevabı " olarak tanımlamış ve gelişmesini 3 döneme ayırmıştır (33) :

- 1) Alarm fazı; santral sinir sisteminin harekete geçmesi
- 2) Direnç veya adaptasyon fazı; "kaç veya savaş" durumu
- 3)Tükenme fazı; Stresin devamı sonucu, karşı koyan mekanizmaların ve homeostazisin işlemez hale gelmesidir (33).

Stresin neden olduğu hastalıklar, hemen hemen tüm sistemleri içerecek şekilde fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedir. Bunlardan biriside mide ve duodenumda gelişen kanamalı ülserler olup ilk önce Selye ile başlayan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak stres ülserleri hala önemli bir problem olup özellikle cerrahi kliniklerinde ve sonra yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda oldukça sıklıkla karşılaşılan önemli bir klinik tablodur. Böyle hastalarda akut mide ülserlerine bağlı üst gastrointestinal sistem kanamaları genellikle primer sorundan 3-7 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Başlangıçdaki klinik belirtileri gizli olan bu problemlerin ciddiyetini, yaklaşık %50'ye varan mortalite oranları göstermektedir (47).

Strese bağlı gelişen mide ülserleri, mide mukozasının dejenerasyonu ile gelişen mukozal enerji eksikliğinin bir sonucudur. Muscularis mukoza içine penetre olmayan bu lezyonlar yüzeysel olarak kalırlar ve mukozal bariyerin iyon diffüzyonunu engelleyip H⁺ iyonlarının mukozaya içine tekrar diffüzyonunu artırır (16,21,39). Stres ülseri gelişmesini kolaylaştıran bazı klinik durumlar vardır. İnsanlarda serebral travmalardan ve geniş yanıklardan sonra, şokta, büyük cerrahi girişimlerden hemen sonra, alkol ve aspirin alınmasını takiben stres ülserleri gelişebilir (47). Deneysel olarak çeşitli yöntemlerle strese maruz bırakılan sıçanların midelerinde de ülserasyonlar gözlenmiştir (3,12,13,22,24,36,37,39).

2.1. Stres ülserinin patogeneğinde sorumlu faktörler :

2.1.1. Mukozal harabiyete neden olan faktörler:

2.1.1.1. Asit sekresyonu:

Strese bağlı gelişen mide mukozaya hasarında biraz asit varlığının gerekli olabileceği bildirilmektedir (35). Stres ülserlerinin patogeneğinde mide lümenindeki hidrojen iyonlarının hücre içine geçerek intrasellüler asidoza neden olduğu ve azalmış mukozaya kan akımının da hücre içine sızmış hidrojen iyonlarını ortamdaki uzaklaştıramadığı ileri sürülmektedir (22). Mukozaya pH' sınırın 6,5' un altına indiği durumlarda stres ülserlerinin geliştiği bildirilmiştir (28). Ancak deney hayvanlarında yapılan son çalışmalarda soğukta-hareketsizlik stresine bağlı gelişen mide ülserinde hiperasiditenin koşul olmadığı gösterilmiştir (13,18) ve NaHCO₃ gibi mide asidini nötrale eden bir madde verildiğinde ülserasyonu engelleyemediği bildirilmiştir (9).

2.1.1.2. Artmış mast hücre degranülasyonu ve çeşitli biyojenik aminlerin salınımı :

Mast hücreleri; mukozal [MMC (atipik)] ve bağ dokusu [CTMC (tipik)] mast hücreleri olmak üzere iki grupta incelenebilirler (15,25,29,42,48). Her iki mast hücresi morfolojik, histokimyasal, biyokimyasal ve fonksiyonel olarak farklılık göstermektedir (25,29). Bu nedenle, inflamasyon ve immünolojik olaylardaki rolleride farklı olmaktadır (25,29). Her iki mast hücresi granül içeriklerindeki farklı proteoglikanlar nedeniyle histokimyasal olarak farklı boyanma özellikleri gösterirler. Hem mukozal mast hücreleri hem de bağ dokusu mast hücreleri alcian mavisini ile mavi boyanırken sadece bağ dokusu mast hücreleri yüksek heparin içeriğine bağlı olarak safranin ile kırmızıya boyanırlar (15,25,29). Bağ dokusu mast hücrelerinde histamin içeriği daha yüksek iken mukozal mast hücrelerinde daha düşüktür (25). Gastrointestinal sistem, mast hücrelerinin her iki tipini de bulundurmaktadır (48).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda stres sırasında mast hücrelerinin degranülasyonun ve proliferasyonunun arttığı bildirilmiştir (59,63,64). Soğukta-hareketsizlik stresi maruz bırakılan kobay trakeasında ve sıçan testis interstisyumundaki mast hücrelerinin sayısının arttığı ve degranüle oldukları saptanmıştır (59,62,64). Gastrointestinal sisteme ait mukozal mast hücreleri, mide bezlerinde ve çekumda mukoza tabakasında bulunurlar (48). Bağ dokusu mast hücreleri ise özofagus, nonglandüler mide, dil ve yanakda bulunurlar (48). Soğukta-hareketsizlik stresi sırasında, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünlerindeki artışın, sitoliz olmaksızın mast hücrelerinden histamin salınımını artırdığı bildirilmektedir (13). Strese bağlı ülser mekanizmasında mide mukoza tabakasındaki mast hücrelerinin önemli rol oynadığı ve mast hücre degranülasyonu ile salınan histaminin olaya katıldığı bildirilmektedir (9,10,12,13,20,27,58). Deneysel olarak soğukta-hareketsizlik stresiyle ilişkili gelişen mide lezyonlarının patogeneğinde de mide mukoza

tabakasındaki mast hücre degranülasyonunun önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (12,13). Çeşitli mast hücre stabilizatörü ajanlar kullanıldığında strese bağlı oluşan mide ülserlerinin önemli derecede engellendiği bildirilmektedir (20,27,58).

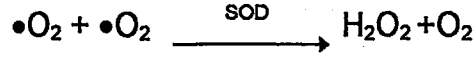
P.A.Brown'un öne sürdüğü histamin hipotezine göre de, histaminin salınımıyla mide ülserlerinin oluşumu ya asit sekresyonunu stimüle ederek ya da mikrodolaşım fonksiyonlarını değiştirerek olmaktadır (8). Soğukta-hareketsizlik stresi uygulanan sıçanların mide mukozasında histidin dekarboksilaz aktivitesinin arttığı dolayısıyla histamin salınımının olduğu bildirilmektedir (7). Histaminin H₁ reseptörünün aktivasyonu ile mide düz kasının kasılmalarında artış ve mukozal arteriyollerde dilatasyon, H₂ reseptörünün aktivasyonu ile da mukozal vazodilatasyon meydana gelmektedir (9). Metiyamid ve simetidin gibi H₂ reseptör antagonistleri ile tedavinin ülserasyonu engellediği gösterilmiştir (7,8).

2.1.1.3. Reaktif oksijen ürünleri :

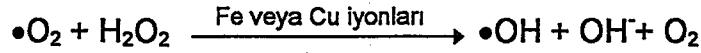
Reaktif oksijen ürünleri, son yıllarda üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir ve bunların doku hasarı ile sonuçlanan, ülser gibi pek çok klinik tablonun patogenezi üzerindeki rolü üzerinde durulmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri atomik yada moleküler yapılarında çiftleşmemiş, bir yada daha fazla sayıda elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen, oldukça reaktif özelliğe sahip zararlı bileşiklerdir (5,23,54,55).

Organizmadaki oluşan reaktif oksijen ürünlerinin büyük çoğunluğu oksijen ile ilgilidir ve ilk oluşan reaktif oksijen ürünü süperoksit anyonu ($\bullet\text{O}_2$) dur. Süperoksit anyonu, ortamdaki moleküler oksijene Hb, sitokrom, kinon, tiyol veya redoks metal gibi bir X donöründen serbest elektron transportu ile oluşur (54). Aerobik hücrelerde bulunan süperoksit dismutaz

(SOD) enzimi süperoksit anyonunu hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene (O₂) çevirmektedir.



Süperoksit anyonunun ikincil ürünü olan hidrojenperoksit (H₂O₂), katalaz enzimi ve glutatyon varlığında glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi ile suya dönüştürülmektedir (5,23,54). Süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit, geçiş metal iyonlarından olan Fe⁺² ve / veya Cu⁺² gibi iyonların varlığında Fenton reaksiyonu ile hidroksil ([•]OH) radikaline dönüşmektedir (5,23,54).



Organizmada reaktif oksijen ürünleri, belirli düzeye kadar savunma sisteminde görev alırlar, çoğunluğu endojen antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılırlar. Bu hassas oksidan-antioksidan dengenin bozulması patofizyolojik olaylara neden olur ve " oksidatif stres " olarak adlandırılırlar (55). Serbest oksijen ürünlerinin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızı arasındaki dengenin bozulması sonucu doku hasarı oluşturabildikleri başlıca organlar arasında ince barsaklar, mide, kalp, böbrek, karaciğer, pankreas, akciğer ve beyin sayılabilir (22).

Reaktif oksijen ürünlerinin sıklıkla oluştuğu durum postiskemik doku travmasıdır. Özellikle iskemik dokunun reperfüzyonu ile dokuya gelen bol miktardaki oksijen molekülü bir dizi reaksiyona girerek süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumuna ve böylece doku hasarına neden olmaktadır (5). Son yıllarda strese bağlı mide ülseri gelişiminde de reaktif oksijen ürünlerinin rol oynadığı bildirilmiştir (12,13,71). Soğukta-hareketsizlik stresine maruz bırakılmış sıçanların mide dokusunun koruyucu gastrik peroksidaz enzimi düzeyinde meydana gelen azalmaya bağlı olarak hidrojen peroksit düzeyinin yükseldiği, hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonuyla oluşan hidroksil

radikalinin de mide dokusunda lipid peroksidasyonunu başlattığı ileri sürülmektedir (13). Bunun sonucunda mide dokusu hücrelerinde membran akıcılığı ve geçirgenliği artmakta, membran bütünlüğü bozulmakta ve sonuçta mide dokusunda ülserasyon meydana gelmektedir (13).

2.1.1.4. Artmış vagal uyarım :

Stresde n. vagus uyarımı artmaktadır (9). Yapılan çalışmalarda stresle uyarılan mide mast hücre degranülasyonu ve histamin salınımında kolinerjik mediatör mekanizmanın da rol oynadığı bildirilmektedir (9,10). Stresle kolinerjik reseptör aktivasyonu sonucu, başlıca H₂ ve H₁ reseptörleri aracılığıyla ülser gelişimine katılan mide mast hücre kaynaklı histamininin salındığı kabul edilmektedir (9,10).

2.1.1.5. Artmış mide düz kas kasılması :

Aç bırakılmaksızın soğukta-hareketsizlik stresine maruz bırakılan sıçanlarda mide motilitesinin arttığı ancak mide lezyonlarının gözlenmediği, bunun yanısıra aç bırakılan hayvanlarda soğukta-hareketsizlik stresi sonrası hem motilite artışı hemde mide lezyonlarının meydana geldiği bildirilmektedir. Soğukta-hareketsizlik stresine maruz bırakılan sıçanlarda mide düz kas kasılmalarının hem frekansı hem de amplitüdünde artış meydana geldiği gözlenmektedir (18). Mide düz kas kasılmalarındaki artış damar düz kasında da kasılmaya neden olacağı için bir iskemi ortamı yaratmakta ve ülserasyonu kolaylaştırmaktadır.

2.1.2. Savunma mekanizması yetersizlikleri:

2.1.2.1. Mukozal Bariyerin Yıkılması:

Mide epitelinin lümen ve doku arasındaki H⁺ iyon gradientini devam ettirme yeteneği mide mukozal bariyeri olarak adlandırılır. Bu bariyerin

bazı ajanlar ve stres gibi çeşitli nedenlerle yıkılması sonucu H^+ iyonları mukozaya geriye doğru diffüze olurken, su, Na^+ , K^+ ve proteinler mide lümenine geçer, mukoza ve lümen arası normal elektrokimyasal gradient düzensizleşir. Bu değişiklikler mide mukozasında direkt hasara neden olmaktadır (21,35).

2.1.2.2. Mukus / Bikarbonat salgısının azalması :

Mide epiteli hem kendi salgıları ile hem de alınan yiyeceklerle hasar görme riski altındadır (21). Ancak mide epiteli koruyucu ince mukus jeli ile örtülüdür ve mukus, mide lümenindeki irritan maddeler için fiziksel ve kimyasal bir bariyer olarak kabul edilmektedir (35,47). Gastrointestinal içeriğin yapısı gözönüne alındığı zaman, mukozanın asit, pepsin, yiyecek partikülleri, mikroorganizmalar, diğer toksinler, safra asitleri, bazen alkol ve ilaçlar gibi içeriklerle sürekli temas halinde olmasına rağmen iltihap veya nekroz oluşmadığı gözlenmektedir (47). Mukozal korumanın sağlanması ve mide ülserlerinin önlenmesi açısından mukusun rolü çok önemlidir (21). Sıçanlarda açlık ve hareketsizlik ile oluşturulan stres sonucunda mukus salınımı azalır ve mukozayı koruyucu faktör ortadan kalkar (47). Heksozamin, mukus içeriğinin bir göstergesidir ve ülser oluşumunu durdurucu bir faktördür. Mide sıvısı ve mukoza içeriğindeki heksozamin miktarı ülser gelişen aç hayvanlarda çok düşük bulunmuştur (35,47)

2.1.2.3. Mide mukozal kan akımının azalması :

Strese maruz bırakılmış sıçanlarda, arteriollerin kontraksiyonu sonucu mide mukoza kan akımı azalmakta ve iskemik değişiklikler meydana gelmektedir (22,24), bunlar başlangıçta geneldir ama daha sonra sadece belirli bir bölgede bulunurlar. İskemi, dokunun harabiyetine, mukus bariyerin ve asid-pepsin içeriğinin değişimine neden olabilir. Mukozal kan akımı değişiklikleri sonucu gelişen iskemi ve doku hasarı stres ülserinin meydana gelmesi için tetiği çeken bir faktördür (24). Bir grup çalışmacı tarafından sıçanlarda mide

hasarının büyüklüğünün mukozal iskeminin şiddeti ile orantılı olduğu gösterilmiş ve iskeminin mide epitelindeki enerji yetersizliği ile birlikte ülserasyona neden olduğu bildirilmiştir (35). Stres altındaki sıçanlarda mide mukoza kan akımının normal sıçanlara oranla % 50 oranında azalması sonucu mide mukoza bariyeri yıkılır ve lümeninden mukoza hücreleri içine doğru H⁺ iyonu geri Emilimi, ülserasyona neden olacak derecede artmaktadır. Bunun sonucunda gelişen hücre içi asidoz ve azalmış mukoza kan akımının hidrojen iyonlarını ortamdaki uzaklaştıramaması ülserasyona yol açmaktadır (22) . Stres sırasında mide mukoza kan akımının azalması iskemi ortamı yaratmakta ve bu ortamda reaktif oksijen ürünleri oluşumu hızla artmaktadır (22). Deneysel olarak sıçanlarda soğukta-hareketsizlik stresine bağlı gelişen ülserlerde, mide mukozal kan akımının azaldığı ve serbest oksijen ürünlerinin oluştuğu bildirilmektedir (12,13,71).

2.1.2.4. Epitel yenilenmesinin azalması :

Epitel yenilenme hızı, mukoza direncini etkileyebilir. Stres sırasında mide mukozasında hücresel proliferasyonun, deoksiribonükleik ve ribonükleik asit sentezinin azaldığı deneysel olarak gösterilmiştir (35). Bu hipoteze göre yapılan çalışmalarda hücre bölünmesinin uyarılması, protein ve deoksiribonükleik asit sentezinin artışı, strese bağlı gelişen ülserleri önlemektedir (35). Epidermal büyüme faktörü ve büyüme hormonu gibi maddelerin, protein ve DNA sentezini uyararak ülserleri inhibe ettikleri bildirilmektedir (47).

2.1.2.5. Prostaglandin sentezinin azalması :

Prostaglandinlerden özellikle PGE' nin, insanlarda ve hayvanlarda mide asit salgısını inhibe ederek hücreyi koruyucu etkisinin olduğu bildirilmektedir (47). Mide mukozasındaki prostaglandinin, mukozayı koruyup ülseri engellediği gösterilmiştir (13). Aspirin ve indometazin gibi ilaçlar,

dokudaki prostaglandinlerin (PGE₂) biyosentezini bloke ederek, mide içeriğine karşı mukozal direnci azaltırlar sonuçta prostaglandinin koruma mekanizması azalır ve böylece midede hasar meydana gelmektedir (47). Stres ülserinin patogeneğinde endojen prostaglandinlerin rolünün olduğu kabul edilmektedir (4). Stres, prostaglandin sentetaz aktivitesinde önemli derecede azalmaya ve mide mukozası tarafından sentezlenen endojen PGE' nin inhibisyonuna neden olup ülser gelişimini kolaylaştırmaktadır (4,13,35). Soğukta-hareketsizlik stresinde PGE sentezinin inhibe olduğu ve ülserasyonların geliştiği gösterilmiştir (4). Deneysel olarak stresle mukozal hasar oluşturulduğunda dışarıdan prostoglandin verilmesinin hasarı engellediği gözlenmiştir (35).

Bu bilgilerin ışığında, birçok faktörün birlikte çalışarak stres ülserinin gelişmesine neden olduğu anlaşılmaktadır. Bu faktörlerin etkileri karşısında bazı savunma mekanizmalarının yetersiz kalması sonucu, mide dokusunda strese bağlı ülserler gelişmektedir. Bu bağlamda stres ülserlerini engellemek ve etkin bir şekilde tedavi edebilmek için deneysel araştırmalar yoğun bir şekilde yapılmaktadır.

Deneysel stres ülseri oluşturmak için sıklıkla kullanılan metod:

Soğukta-hareketsizlik stresi uygulaması : Deney hayvanları, +4°C de 2-4 saat süre ile hareketsiz bırakılmaktadır (3,9,10,12,37,44,45). Sadece soğuk stresi uygulanan, hareket kısıtlaması yapılmayan deneysel modellerde ülserasyon gözlenmemiştir. Ancak +4 °C soğukta-hareketsizlik stresinin bir arada uygulandığı deneysel modellerde ülserlerin olduğu gözlenmiştir (13,47). Bu ülserlerin, asit ve pepsin salgılayan midenin glandüler kısmı olan gastrik korpus üzerinde lokalize olduğu ve mukozal erozyonların muskularis mukozaya penetre olmadığı bildirilmektedir (47).

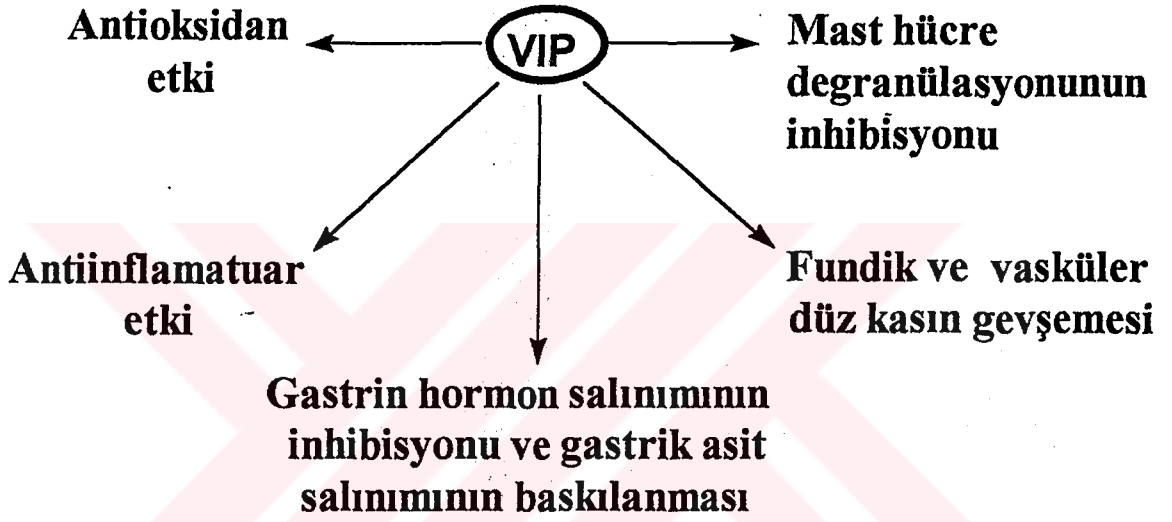
2.2. Vazoaktif intestinal peptid (VIP) :

Said ve Mutt tarafından ilk kez 1970 yılında domuz ince barsağından izole edilen vazoaktif intestinal peptid (VIP) 28 aminoasitli bir peptiddir (49,51). Bu peptid, gastrointestinal sistemde endokrin hücrelerdeki lokalizasyonu dışında, insan ve çeşitli hayvan tiplerinin santral ve periferik sinir sisteminde de bulunmaktadır. VIP beyin ve gastrointestinal sistem dışında, solunum sistemi, üriner sistem ve genital sistemde, bağı dokusu mast hücrelerinde, platelet ve nötrofil gibi hücreler içinde de bulunur . Dolaşımdaki VIP' in, klasik hormondan ziyade nörotransmitter veya nöromodülatör gibi görev yaptığı bildirilmektedir .

VIP' in mast hücrelerinin degranülasyonunu ve proliferasyonunu inhibe etme etkisine sahip olduğu bildirilmektedir (41,52,59,60,63,64). Deneysel hemorajik şok modellerinde , VIP uygulamasının mast hücre degranülasyonunu inhibe ettiği, böbrek dokusunu reperfüzyon hasarından koruduğu gözlenmiştir (59,60,64). VIP' in bir antioksidan gibi davranarak kalp, akciğer,böbrek ve retina dokusu ile iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği bildirilmektedir (40,50,65,67,68). Çeşitli deneysel modellerde, Adult Respiratory Distress Sendrom (ARDS) benzeri akut inflamatuvar akciğer hasarını doza bağımlı olarak önlediği gösterilmiştir. Bu koruyucu mekanizmanın, VIP tarafından inflamatuvar hücrelerin fonksiyonlarının modülasyonu ile sağlandığı kabul edilmektedir (40,49,50).

Antioksidan, antiinflamatuvar ve mast hücre degranülasyonunu inhibe edici etkilerinin yanısıra VIP' in vasküler ve nonvasküler düz kaslarda gevşemeye neden olduğu (11,51) ve mide dokusunda asit salgısının düzenlenmesinden sorumlu gastrin hormonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (49).

VIP' in mide dokusunda soğukta-hareketsizlik stresine bağlı olarak gelişebilecek ülserler üzerine engelleyici etkileri şematik olarak Şekil-1' de verilmiştir.



Şekil 1.: VIP' in stres ülser gelişmesini engelleyici olabilecek etkileri.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları :

Deney hayvanı olarak Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında standart besinle yetiştirilmiş, 200-220 gr ağırlığında Sprague-Dawley türünden her iki cinse ait 54 adet sıçan kullanılmıştır. Deneyler 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

I. Aşama: Bu aşamada 34 sıçan kullanılarak deneyler 3 grup altında yapılmıştır.

1. Grup (Kontrol grubu) : Bu grup sıçanlar, aç bırakılarak 24 saat oda ısısında tutulmuşlardır. 24 saati takiben hemen servikal dislokasyon ile öldürülüp mideleri çıkarılmıştır (n:5+6).

2. Grup (Stres grubu) : Bu grupta sıçanlar , 24 saat sadece su verilerek aç bırakılmışlardır. 24 saat sonra hareketlerini engelleyen tel kafeslere konularak +4 °C' de üç saat (08.30-11.30 arası) tutulmuşlardır. Bu grup hayvanlara stres öncesi 0.1 cc serum fizyolojik (i.p) olarak uygulanmıştır. Stresden çıkarılan hayvanlar hemen servikal dislokasyon ile öldürülüp mideleri çıkarılmıştır (n:5+6).

3. Grup : Bu gruba soğukta-hareketsizlik stresi uygulamasından hemen önce 25 ng kg⁻¹ VIP (i.p) uygulanmıştır. Stresden çıkarılan hayvanlar hemen servikal dislokasyon ile öldürülüp mideleri çıkarılmıştır (n:6+6).

II. Aşama: Bu aşamada deneyler 3 grup altında yapılmıştır. Soğukta-hareketsizlik stresi uygulandıktan sonra 25 ng kg⁻¹ VIP, 1, 2 ve 3 gün üst üste verilmiştir. Sıçanlar son VIP uygulamasından 24 saat sonra servikal dislokasyon ile öldürülüp mideleri çıkarılmıştır.

A. Grubu: Stres sonrası tek doz 25 ng kg^{-1} VIP (i.p) uygulanmıştır (n:6)

B. Grubu : Stres sonrası 1. doz ve bunu takip eden 24 saat sonra 2. doz 25 ng kg^{-1} VIP (i.p) uygulanmıştır. Birinci doz yapıldıktan sonra hayvanın normal beslenmesine izin verilmiştir (n:6). Sıçanlar 2. doz yapıldıktan 24 saat sonra servikal dislokasyon ile öldürölüp mideleri çıkarılmıştır.

C. Grubu : Stres sonrası 1. doz , bunu takip eden 24 saat sonra 2. doz ve 48 saat sonra da 3. doz 25 ng kg^{-1} VIP (i.p) uygulanmıştır. Birinci doz yapıldıktan sonra hayvanın normal beslenmesine izin verilmiştir (n:6). Sıçanlar 3. doz yapıldıktan 24 saat sonra servikal dislokasyon ile öldürölüp mideleri çıkarılmıştır.

3.2. Deneyin yapılışı :

Deneylerin sonunda, her iki aşamaya ait sıçanlar , servikal dislokasyon ile öldürölüdüler. Çıkarılan tüm mideler küçük kurvatür boyunca açılarak, ön ve arka duvar ayrılmaksızın morfolojik incelemeye tabi tutulmuşlardır, Deneylerimizin I. aşamasında GI ve II' den 5 adet ve III' ten 6 adet hayvanın mideleri ayrıca ışık mikroskopik olarak histolojik inceleme yapılmak üzere nötral formalinde tespit edilmiştir.

Antioksidan enzimler ve MDA, histamin ve metilhistamin tayini için GI, II ve III' e ait 6' şar hayvanın mide dokuları küçük kurvatür doğrultusunda açılarak ön ve arka duvarına ayrılmıştır. Mide duvarının bir parçası antioksidan enzimler ve MDA tayini için diğer bir parçası ise histamin ve metilhistamin [π MH ; (1-methyl-4 [β -aminoethyl] imidazole] tayini için kullanılmıştır.

3.3. Dokudan Antioksidan Enzim (Süperoksit dismutaz ve katalaz) ve Malondialdehit (MDA) Tayini :

Dokular, pH: 7.4 olan 10 volüm 50 mM potasyum fosfat tamponunda homojenize edilmiştir ve daha sonra 15 sn ultrasonikasyona tabi tutulmuş ve 20.000 g' de +4°C' da 20 dakika santrifüje edilmiştir. SOD, Katalaz enzim aktivitesi, protein ve malodialdehit (MDA) düzeyi tayinleri süpernatantlardan yapılmıştır.

3.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini :

Süperoksit dismutaz, modifiye spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir (30). Yöntem, pH:9.2' de quersetinin oksidasyonu esasına dayanmaktadır. Quersetin oksidasyonunun inhibisyonu, Shimadzu 160 A spektrofotometre ile 406 nm' de ölçülmüştür ve mg /protein başına düşen SOD aktivitesi olarak ifade edilmiştir.

3.3.2. Katalaz Tayini :

Katalaz aktivitesi, modifiye polografik yöntemle ölçülmüştür (19). Doku örnekleriyle hazırlanan karbon-paste elektrodu, polarografın (Tacussel PRG-5) çalışma elektrodu olarak kullanılmış ve hidrojenperoksit' in enzimatik yıkımı sonucu oluşan oksijen ölçülmüştür (69). Katalaz enziminin aktivitesi, dakikada mgr protein tarafından tüketilen μ mol hidrojen peroksit miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.3.3. Malondialdehit (MDA) Tayini :

Malondialdehitin asidik ortamda tiobarbitürik asit ile oluşturduğu rengin, 535 nm' de optik dansitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi

esasına dayanılarak tayin edilmiştir (46). MDA düzeyleri dokuda nmol / mg doku olarak ifade edilmiştir. Protein Lowry yöntemine göre tayin edilmiştir (32)

3.3.4. Doku Histamin ve Metilhistamin Tayini :

Dokudan Histamin ve metilhistamin ekstraksiyonu Shore' un n-butanol yöntemine uygun olarak yapıldı (56). Ekstraksiyon sonucu histamin ve metilhistamin içeren numuneden 2 ml. polietilen tüplere alındı ve bu aşamadan sonraki işlemler Steinman ve arkadaşlarının yöntemlerine göre yapıldı (57). Polietilen tüp içine alınan 2 ml.lik örnekler, liyofilizasyon işlemine kadar -70°C ' da derin dondurucuda saklandı. Liyofilizasyon sonrası örnekler, %50 metanol / %50 distile su karışımından alınan 2.5 ml. içerisinde çözündürüldü. Bu çözümden 1 ml alıp, %50 metanol / %50 distile su çözeltisi ile 10 ml' ye tamamlandı ve böylece numune 1 / 100 oranında seyreltilmiş oldu. Buradan da 250 μl alıp üzerine internal standart olarak kullandığımız $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ RMH [1-methyl-5-(β -amino-ethyl)-imidazole;pros-methylhistamine]' den 250 μl ekledikten sonra, Tsurata ve arkadaşlarının tanımladığı reaksiyon tampon çözeltisinden 200 μl karışıma ilave edildi (61). Son olarak, o-fital-aldehid (OPA) çözeltisinden 30 μl katılarak oda sıcaklığında 3 dk. inkübe edildikten sonra,reaksiyon 1 N HCl çözeltisinden 20 μl eklenerek durduruldu ve 20 μl örnek hemen yüksek basınçlı sıvı kromatografı (HPLC) kolonuna enjekte edildi.

3.4. Kromatografik şartlar :

Kolon-Phenomenex, Hypersil ODS (C18) 3 μm , 100mm uzunluk, 4.6 mm ID.

Dedektör - Shimadzu RF-10AXL

Pompa - Shimadzu LC-10AT

Mobil faz - Metanol + 0.07 M Na_2HPO_4 (pH:9.45) (52:48 v / v)

Akım hızı -1 ml/dk

Eksitasyon - 335 nm, Emisyon - 445 nm

İnternal standart - 5×10^{-7} M RMH

Kolon sıcaklığı - Oda sıcaklığı

Yapılan ekstraksiyon yöntemi sonucunda elde edilen histamin ve metilhistaminin, verimliliği 1×10^{-6} M histamin ve 5×10^{-7} M metilhistaminin aynı koşullarda ekstrakte edilmesi ile hesaplanmıştır.

3.5. Morfolojik ve Histolojik inceleme :

Stres öncesi ve sonrası VIP uygulanan grupların mide dokularının tamamının morfolojik incelemesi için soğuk serum fizyolojik ile yıkandı ve sert bir zemine (karton üzerine) tespit edildi. Büyüteç aracılığı ile morfolojik değerlendirme ve stres öncesi VIP uygulanan deney grubunda ülser skorlaması yapıldı. Ülser skorlaması için , her bir lezyon alanı, bir cetvel aracılığı ile mm. olarak ölçüldü. Beş adet peteşial lezyon 1 mm. lik ülsere karşılık olacak şekilde değerlendirildi. Her grupta farklı sayılardaki skorların toplamı hayvan sayısına bölündü, ortalama ülser indeksi olarak değerlendirildi. Morfolojik değerlendirmesi ve ülser skorlaması yapıldıktan sonra, mide dokuları mikroskopik inceleme için % 10' luk nötral formalin içinde tespit edildi. Hazırlanan parafin bloklardan 6 μm incelikte ve 30 μm ' lik aralarla seri kesitler alındı ve histopatolojik inceleme amacıyla hematoksilin-eozin ile, mast hücrelerinin değerlendirilmesi için ise Alcian mavisi-safranin ile boyandı.

Mast hücrelerinin, granül içerikleri sadece Alcian mavisi ile boyananlar mavi, alcian mavisi ve safranin ile boyananlar mikst ve sadece safranin ile boyananlar kırmızı boyalı olarak değerlendirilmiştir. Mast hücreleri hücre sayım kamarası (OC-M) (x 40,3960 μm^2) ile sayılmıştır.

Her bir hayvanın hematoksilin-eozin ile boyalı 6 seri kesitinde polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu skorlandı. Hafif infiltrasyon gösterenler "+" :1 olarak ve daha ağır infiltrasyon gösterenler "+ +" :2 olarak değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme :

Doku örneklerinden ölçülen SOD, katalaz, MDA ve histamin ile metilhistamin düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Farklı bulunan sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

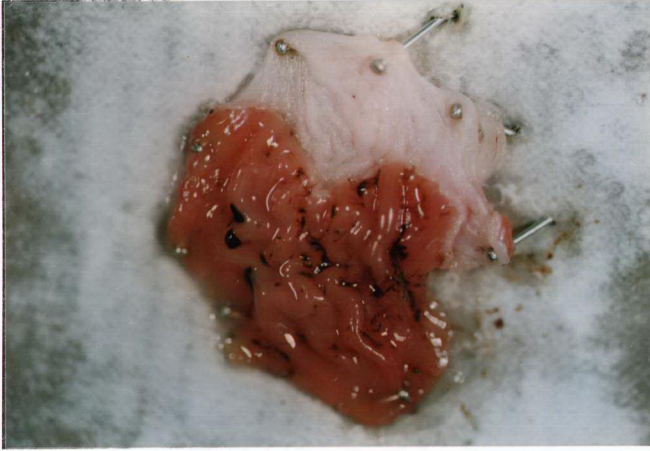
Mide dokusunun makroskopik incelemesiyle elde edilen ülser indeksi iki grup arasında Student-t testi ile analize edilmiştir. Histopatolojik inceleme için boyama yapılan dokulardaki polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu, gruplar arasında Mann-Whitney U testi ile analize edilmiştir. Total (kırmızı ve mavi boyalı) submukozal mast hücrelerinin sayımı sonucu elde edilen verilerin ve submukozal mast hücrelerinin histokimyasal heterojenitesi açısından yapılan sayım sonucu elde edilen verilerin gruplar arası istatistiksel karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Farklı bulunan sonuçlara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

4. BULGULAR :

4.1. Stres öncesi VIP uygulanan I. aşama deney grubuna ait bulgular :

4.1.1. Morfolojik ve Histolojik Bulgular :

Morfolojik inceleme sonunda, 3 saat soğukta-hareketsizlik stresi uygulanan grupta mide mukozasında kanamalı ülserasyonlar gözlenirken, stres öncesi VIP uygulanan grupta strese bağlı lezyonların gelişmesi önlenmiştir (Şekil 2 a,b) Işık mikroskopisi ile yapılan histolojik incelemelerde de stres grubunda kanamalı mukozal hasar ve PMNL infiltrasyon artışı gözlenmektedir (Şekil 3 a,b). VIP uygulanan grupta ise mukozal hasarların tamamen ortadan kalktığı ve PMNL infiltrasyonun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4). Stres Alcian mavisi-safranin boyama tekniği ile gerek kırmızı gerekse mavi boyanan submukozal mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olmuştur (Şekil 5). VIP ise mast hücrelerinin degranülasyonu engellemiştir (Şekil 6).



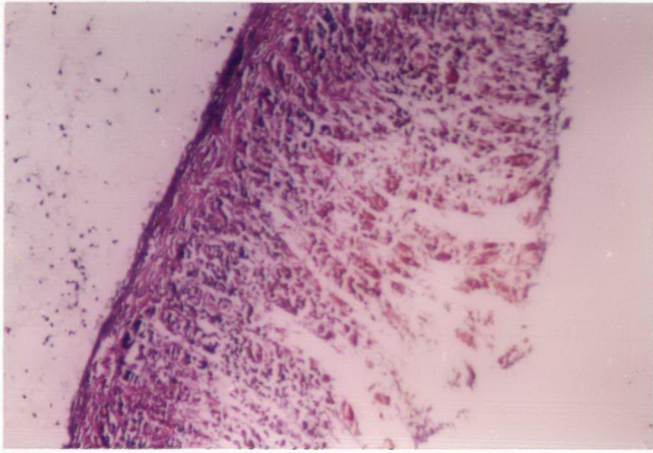
a



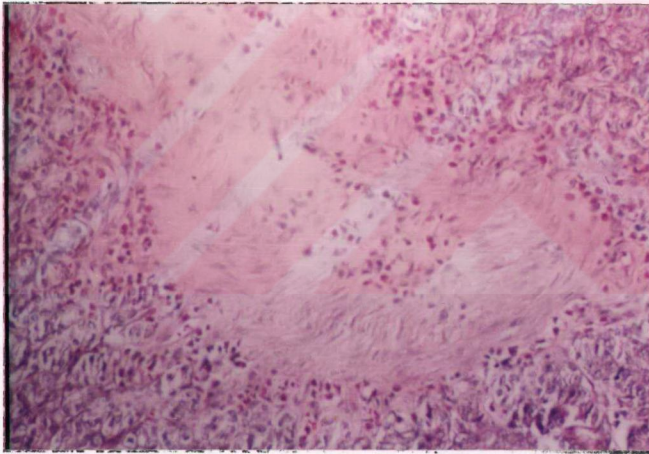
b

Şekil 2.: Mide dokusunun makroskopik görünümü

- a) soğukta-hareketsizlik stresi uygulanan grupta kanamalı ülserasyonlar
b) soğukta-hareketsizlik stresi öncesi VIP uygulanan grupta normal doku görünümü



a

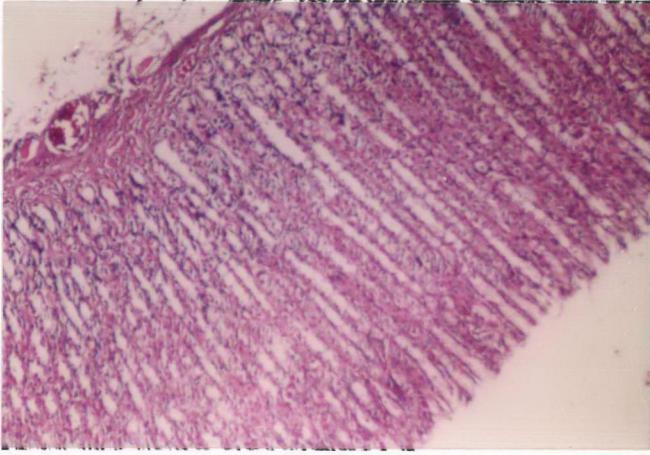


b

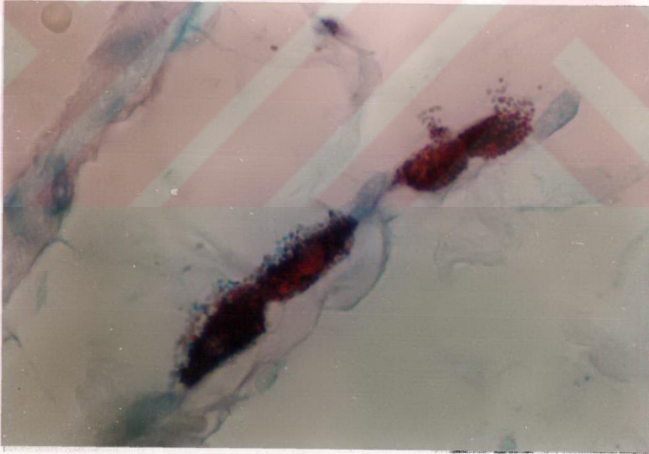
Şekil 3.: Sıçanlarda soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulan mukozal lezyonların histolojik görünümü

a) stres grubunda kanamalı mukozal hasar H&E. Orjinal büyütme x33

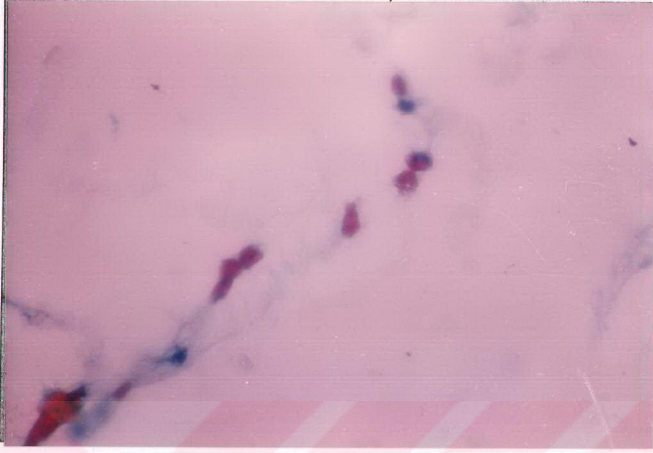
b) stres grubunda PMNL infiltrasyonunun artışı HE x 66



Şekil 4.: Sıçanlarda soğukta-hareketsizlik stresi öncesi VIP uygulaması ile mukozal hasarların tamamen ortadan kalktığı ve PMNL infiltrasyonun azaldığı gözlenmiştir. H&E. Orjinal büyütme x33



Şekil 5.: Stres kırmızı ve mavi boyalı submukozal mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olur. Alcian mavisi-safranin. Orjinal büyütme x 330



Şekil 6.: Soğukta-hareketsizlik stresi öncesi VIP uygulaması mast hücre degranülasyonunun inhibisyonu. Alcian mavisi -safranin. Orjinal büyütm x132

4.1.1.1. Sayısal değerler açısından mast hücresi bulguları :

Tablo 1.: Alcian mavisi-safranin boyama tekniği ile kırmızı ve mavi boyanan mast hücrelerinin toplam sayısını göstermektedir. Tablo da görüldüğü gibi stres degranüle mast hücresi sayısını artırırken VIP bu artışı engellemiştir.

Tablo 2.: Kırmızı ve mavi boyanan submukozal mast hücrelerinin ayrı ayrı sayısal değerlerini göstermektedir. Stres hem mavi hemde kırmızı boyanan mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olmaktadır. VIP kırmızı boyalı mast hücreler üzerine inhibitör etki gösterirken mavi boyalı hücreler üzerine aynı şiddetde etki göstermemektedir.

Tablo 1.: Total submukozal mast hücre sayısı.

GRUPLAR	Granüle	Degranüle
Kontrol (n:5)	8,2 ± 1,0#	0,4 ± 0,2*
Stres (n:5)	3,4 ± 0,9	4,4 ± 0,9
VIP uygulanan (n:6)	5,6 ± 1,2	2,1 ± 0,4**

* ; p < 0,05 Kontrol grubu, stresli ve VIP uygulanan grupla kıyaslandığında

** ; p < 0,05 VIP uygulanan grup, stres grubuyla kıyaslandığında

; p < 0,05 Kontrol grubu, stresli grupla kıyaslandığında

Tablo 2.: Submukozal mast hücrelerinin histokimyasal heterojenitesi

GRUPLAR	Kırmızı boyalı mast hücreleri		Mavi boyalı mast hücreleri	
	Degranüle	Granüle	Degranüle	Granüle
Kontrol (n:5)	0,4 ± 0,2	4,4 ± 0,9**	—	3,8 ± 0,2****
Stresli (n:5)	2,6 ± 0,5*	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,8***	1,2 ± 0,5
VIP uygulanan (n:6)	1,1 ± 0,4	3,8 ± 0,5	1,5 ± 0,4	2,1 ± 0,7

* ; p < 0,05 Stres grubu, kontrol ve VIP uygulanan grupla kıyaslandığında

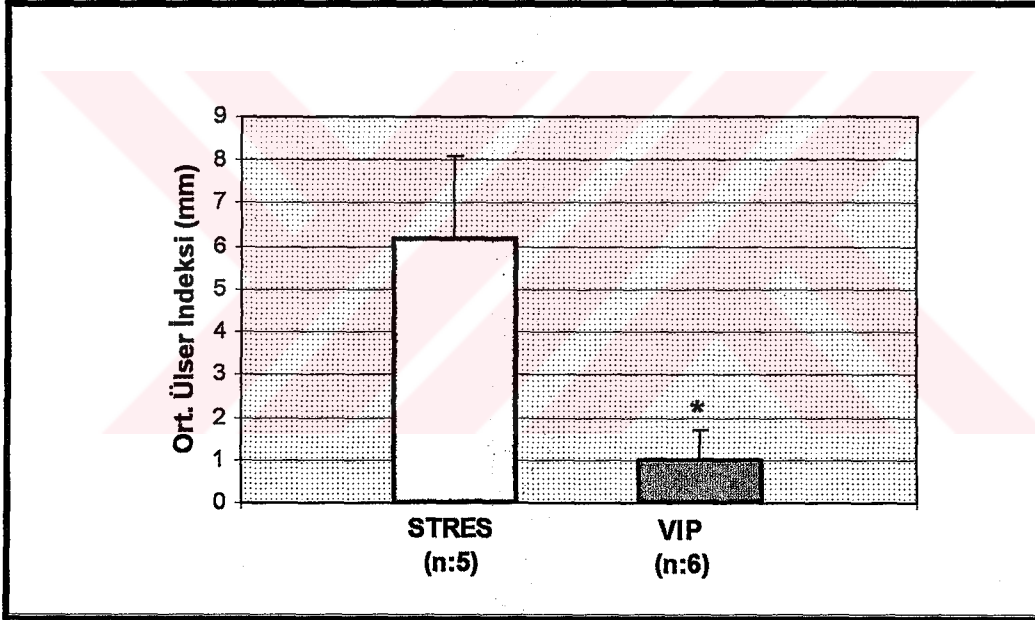
** ; p < 0,05 Kontrol grubu, stres grubuyla kıyaslandığında

*** ; p < 0,05 Stres grubu ,kontrol grubuyla kıyaslandığında

****; p < 0,05 Kontrol grubu, stres grubuyla kıyaslandığında

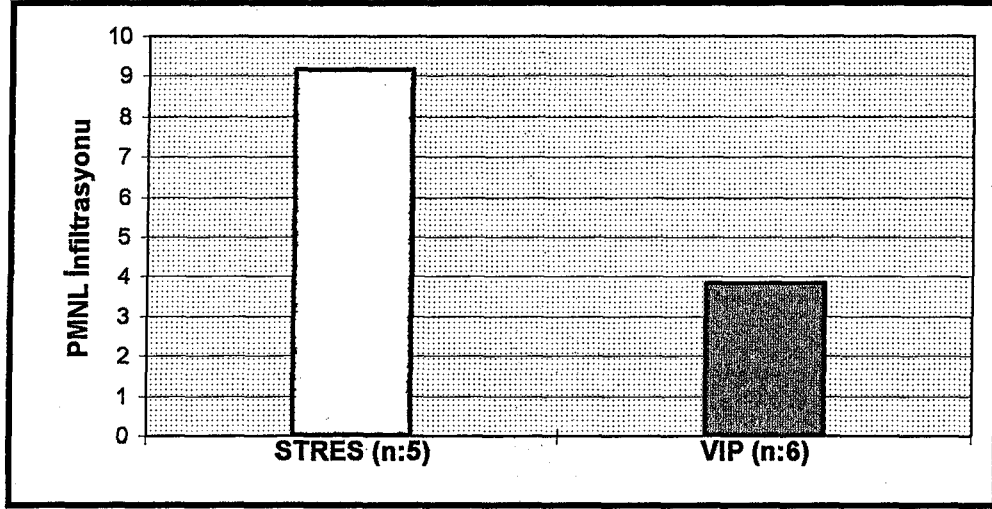
4.1.1.2. Ülser indeksi ve PMNL infiltrasyon skoru sonuçları:

Soğukta-hareketsizlik stresi sonrası mide dokusunda ortalama ülser indeksi (Şekil 7) ve PMNL infiltrasyonu (Şekil 8) artmıştır ancak stres öncesi VIP uygulaması ile bu değerler anlamlı ölçüde azalmıştır.



Şekil 7.: Ortalama Ülser İndeksi :

* ; $p < 0,05$, VIP uygulanan grup, stresli grupta kıyaslandığında.



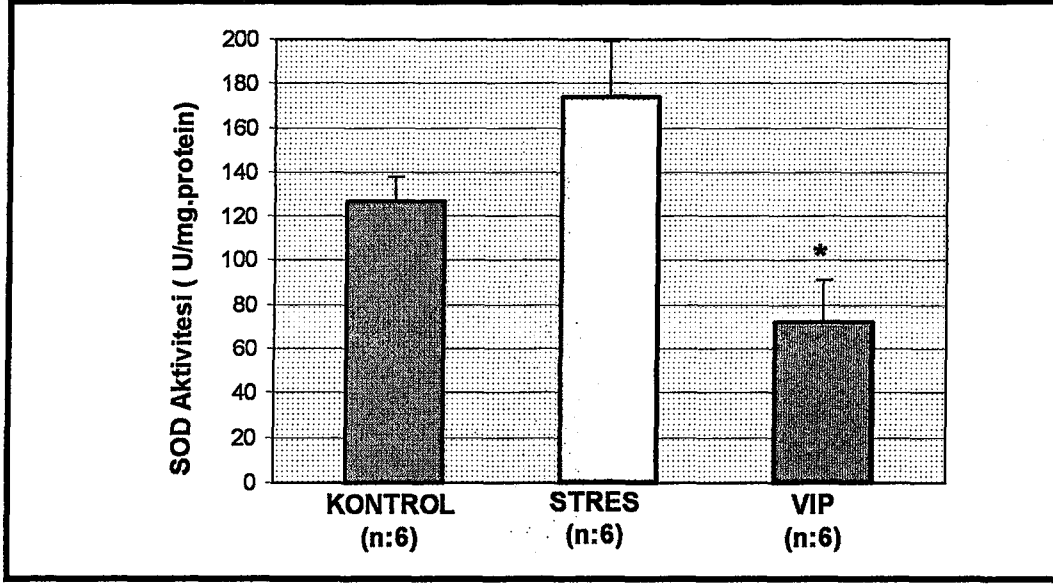
PMNL İNFİLTRASYONU	
U : 2,0	P=0,0087*

Şekil 8.: Polimorfonükleer (PMNL) lökosit infiltrasyonu skoru

* ; $p < 0,001$, VIP uygulanan grup, stresli grupla kıyaslandığında.

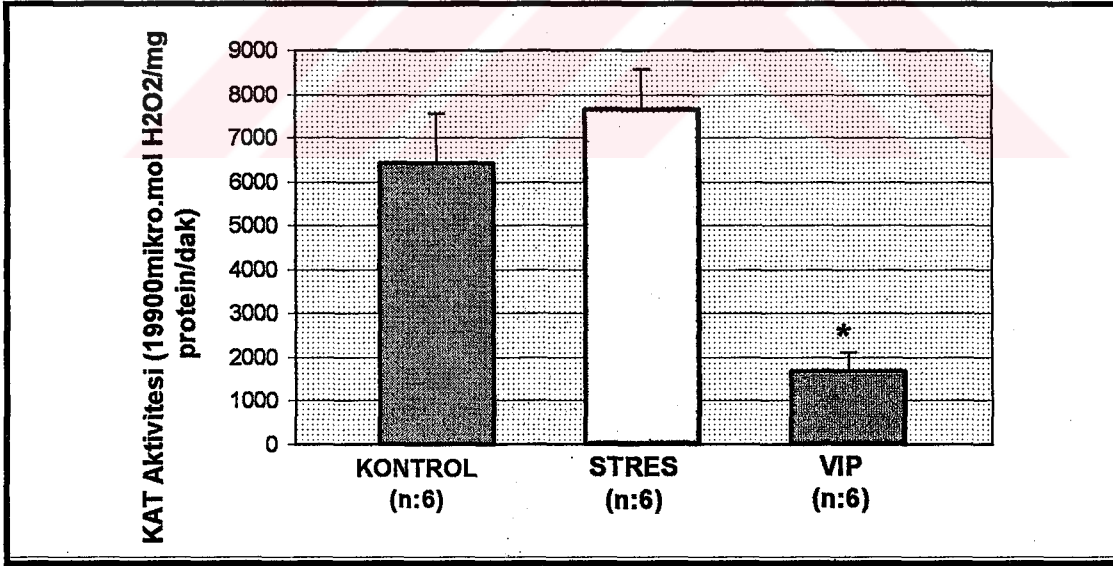
4.1.2. Antioksidan Enzim (SOD ve Katalaz) ve MDA Düzeyleri :

Stres grubunda antioksidan enzim (SOD ve Katalaz) aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe uğramazken stres öncesi VIP uygulaması ile anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 9,10). Mide dokusu MDA düzeyi ise stres grubunda; kontrol ve stres öncesi VIP uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 11).



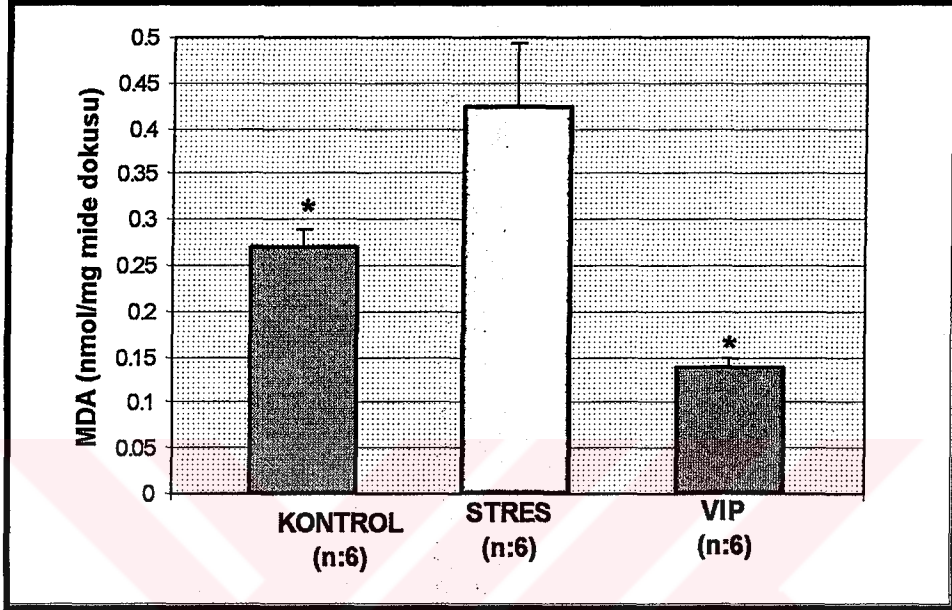
Şekil 9.: Mide Dokusunun SOD Enzim Aktivitesi : (IU / mg protein)

*; $p < 0,05$, VIP uygulanan grup, stresli grupla kıyaslandığında.



Şekil 10 .: Mide Dokusunun Katalaz Enzim Aktivitesi (19900 μ mol H₂O₂ / mg protein /doku) :

*; $p < 0,05$, VIP uygulanan grup, stresli grupla kıyaslandığında



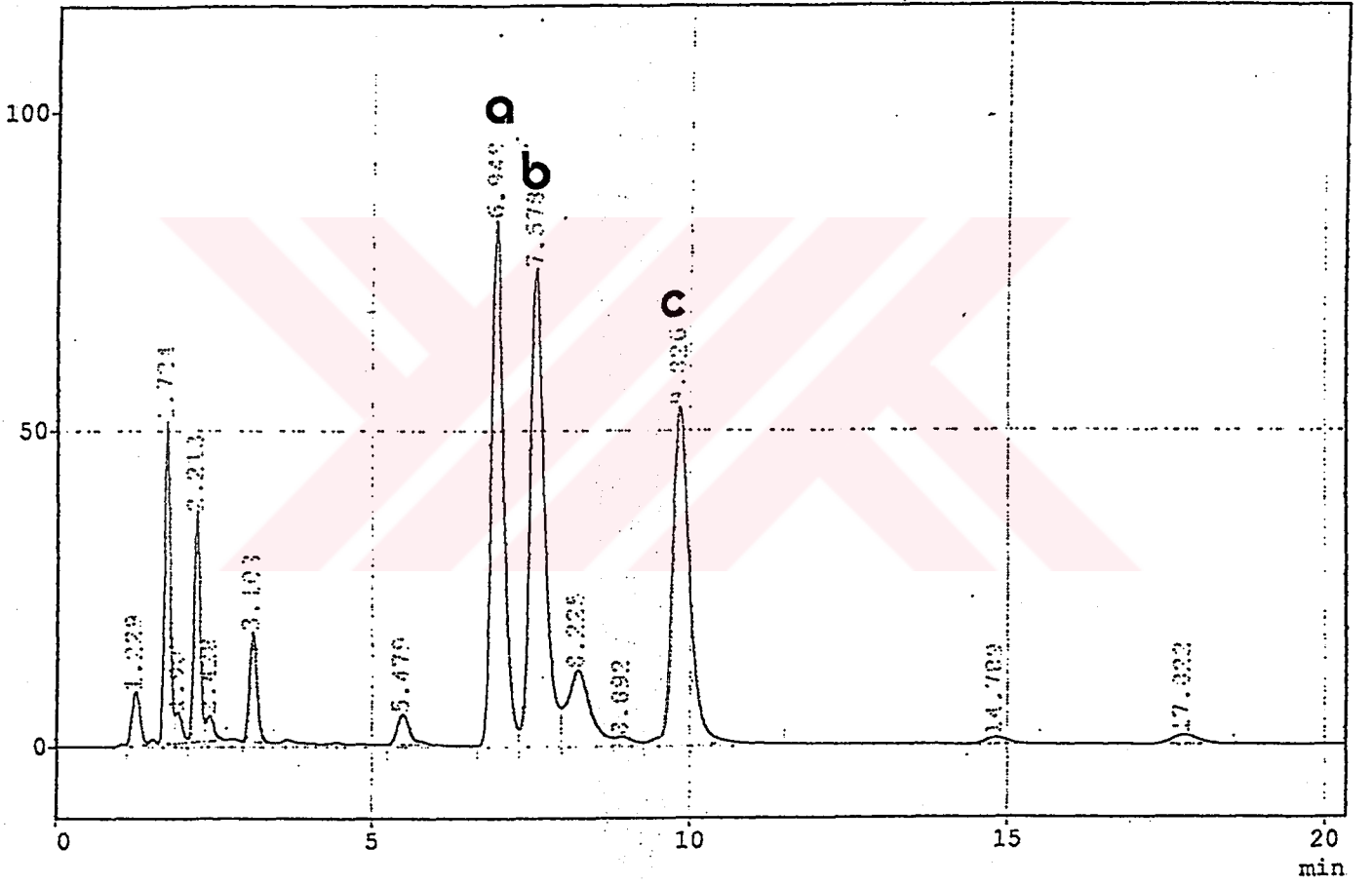
Şekil 11.: Mide Dokusu Malondialdehit (MDA) Düzeyleri : (nmol / mg doku)

* ; $p < 0,05$, VIP uygulanan grup ve kontrol grubu, stresli grupla kıyaslandığında.

4.1.4. Histamin-Metilhistamin Kromatogramı :

Histamin, metilhistamin ve RMH standartlarının metanol : tampon çözeltisi (52:48 v / v) hareketli fazı kullanılarak florimetrik ex : 335 nm, em : 445 nm' de 1 ml akış hızında kaydedilen kromatogramları Şekil 12' de verilmektedir.

Chromatogram *** Filename:HİS1.C80

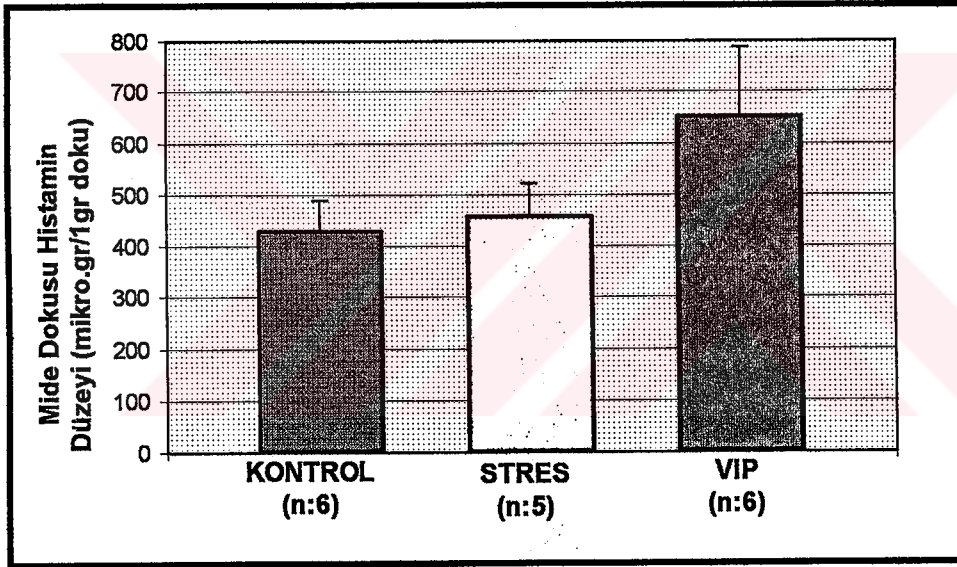


Şekil 12.: Histamin, metilhistamin ve RMH standartlarına ait HPLC kromatogramı

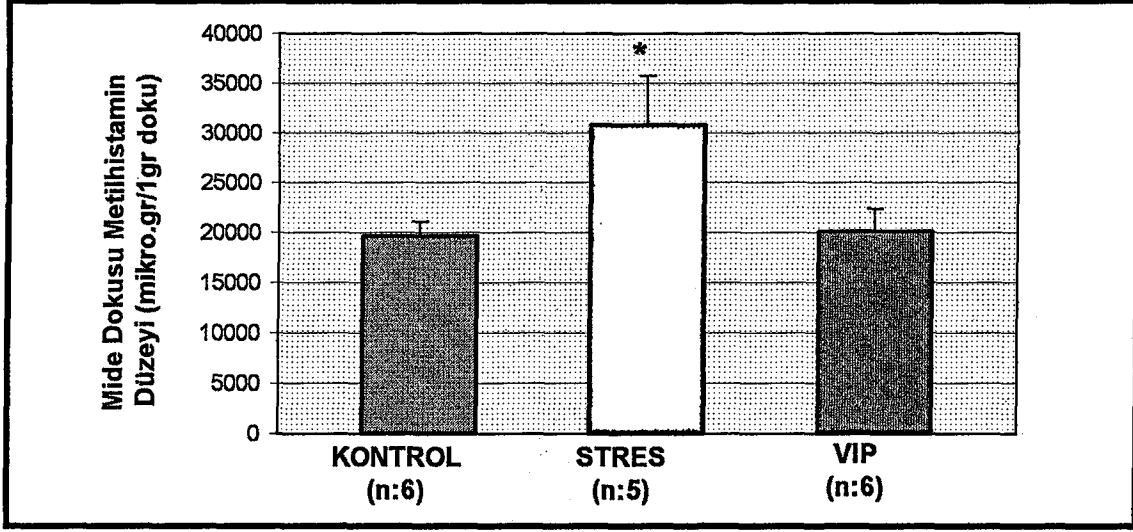
a : histamin, b : RMH (internal standart) c : metilhistamin

4.1.5. Histamin-Metilhistamin Düzeyleri

Mide dokusu histamin düzeyleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermezken (Şekil 13), mide dokusunda metilhistamin konsantrasyonu stres uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede yükselmiştir. VIP verilen grupta ise metilhistamin konsantrasyonu kontrol değerlerine yakın bulunmuştur (Şekil 14).



Şekil 13.: Doku Histamin Düzeyleri : (μg / g doku)



Şekil 14.: Doku Metilhistamin Düzeyleri : ($\mu\text{g} / \text{g}$ doku)

*; $p < 0,05$, stresli grup, kontrol ve VIP uygulanan grupla kıyaslandığında.

4.2. Stres sonrası VIP uygulanan II. aşama deney grubuna ait bulgular :

Stres sonrası 25 ng kg^{-1} VIP (i.p), G_A için 1gün tek doz, G_B için 2 gün üst üste 2 doz, G_B için 3 gün üst üste 3 doz verilmiştir. Bir gün tek doz ve 2 gün üst üste 2 doz VIP uygulanan gruplarda sıçanların sadece bir tanesinde 1 mm' lik lezyon gözlenirken, 3 gün üst üste 3 doz VIP uygulanan grupta hiç lezyon gözlenmemiştir (Tablo 3).

Tablo 3.: Stres sonrası VIP uygulamasının mide lezyonları üzerine etkisi.

Grup A	Grup B	Grup C
1. 1 mm lezyon	1. Lezyon yok	1. Lezyon yok
2. Lezyon yok	2. Lezyon yok	2. Lezyon yok
3. Lezyon yok	3. Lezyon yok	3. Lezyon yok
4. Lezyon yok	4. Lezyon yok	4. Lezyon yok
5. Lezyon yok	5. Lezyon yok	5. Lezyon yok
6. Lezyon yok	6. 1 mm lezyon	6. Lezyon yok

G_A: Stres sonrası 1 gün 25 ng kg⁻¹ VIP (i.p) verilen grup

G_B: Stres sonrası 2 gün üst üste 25 ng kg⁻¹ VIP (i.p) verilen grup

G_C: Stres sonrası 3 gün üst üste 25 ng kg⁻¹ VIP (i.p) verilen grup

5. TARTIŞMA ve SONUÇ:

Çalışmamızın histolojik ve morfolojik sonuçlarına göre, sıçanlarda deneysel olarak soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulmuş mide ülserinin gelişmesi VIP tedavisi ile önemli ölçüde önlenmiştir. Bu sonuçlarımıza ilaveten mide dokusu MDA değerleri incelendiğinde, soğukta-hareketsizlik stresinin dokuda önemli düzeyde lipid peroksidasyona neden olduğu ve VIP tedavisi ile, doku hasarına neden olan lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilen, MDA düzeyinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. Antioksidan enzim (SOD ve katalaz) düzeyleri ise stresle pek fazla değişmezken, VIP uygulanan grupta anlamlı düzeyde azalmış hatta kontrol değerlerinin altına inmiştir.

Soğukta-hareketsizlik stresine maruz bırakılan sıçanların mide mukozasında yaygın, kanamalı ülserasyonlar gözlenmiştir (3,4,7,12,13,18,44) ve bu lezyonların gelişme nedenlerinin birçok faktörle ilişkili olduğu bildirilmektedir (3,12,13). Mast hücre degranülasyonu ve mide düz kas kasılmasının artışı (12,13), azalmış prostaglandin düzeyi (4,13), çeşitli biyojenik aminlerin salınımı ve mukozal kan akımının azalması (3,8,9,12,13,27,58), aktif lökositler (12) ve reaktif oksijen ürünlerinin oluşumundan kaynaklanan lipid peroksidasyonu (12,13) gibi faktörlerin soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulmuş mide ülserlerinin patogenezinde rol oynadıkları bildirilmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda , toksik oksijen moleküllerinin soğukta-hareketsizlik stresi sırasında meydana gelen mide mukozasındaki hasara yol açan önemli faktörlerden biri olabileceği bildirilmektedir (12,13,71). Reaktif oksijen ürünlerinin sorumlu tutulduğu lipid peroksidasyonunun, soğukta-hareketsizlik stresi ile oluşturulmuş mide hasarı ile yakından ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmamızda, soğukta-hareketsizlik stresine maruz bırakılmış sıçanlarda mide dokusunda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyinin arttığı gösterilmiştir. VIP

uygulanmış grubun mide dokusundaki MDA ve antioksidan enzim düzeylerinin azalması VIP' in antioksidan aktivitesi ile açıklanabilir. VIP' in ksantin / ksantinoksidaz tarafından başlatılan hasara karşı potent bir koruyucu olduğu, inflamatuvar hücrelerden süperoksit anyonunun salınımını inhibe ettiği ve bunun yanısıra hidroksil radikalini ve singlet oksijeni temizleme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (6,31,34,40,53). Bizim çalışmamızda da VIP olasılıkla, hem reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu inhibe ederek hem de oluşmuş ürünleri ortamdaki temizleyerek mide dokusu antioksidan enzim aktivitesi ve MDA düzeyini azaltmış olabilir. Pek çok çalışmada ileri sürüldüğü gibi süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri, ortamdaki süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır (46,70). Bu nedenle, bizim sonuçlarımızda VIP verilen gruplarda gerek MDA düzeyi ve gerekse antioksidan enzim aktivitelerinin azaltılmış olması bize mide dokusunda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumunun azalmış olduğu izlenimini vermektedir.

PMNL infiltrasyonunun, soğukta-hareketsizlik stresine bağlı gelişen mide ülserlerinin önemli bir nedeni olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (12). Ksantin / ksantinoksidaz sistemine ilaveten, uyarılmış PMNL' nin sitotoksik moleküllerin salınımı ve reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu yoluyla doku hasarını uyardığı belirtilmektedir (12). Bu ürünler, hücre yapısını ve fonksiyonunu bozabilirler ve inflamatuvar reaksiyonlarda bir mediatör gibi davranırlar. Çalışmamızda VIP, olasılıkla antiinflamatuvar bir etki göstererek PMNL infiltrasyonunu önemli ölçüde engellemiştir. VIP' in antiinflamatuvar aktivitesini gösteren çeşitli çalışmalarda bulunmaktadır (40).

Stresle oluşturulmuş mide ülserlerinin patogenezinde önemli faktörlerden birisinin de mast hücre degranülasyonu olduğu bildirilmektedir (9,17,27,36,37,58). Çeşitli mast hücre membran stabilizatörlerinin, hayvanlarda

stresle oluşturulmuş mide ülserlerini engellediği bildirilmektedir (20,27,58). Daha önce yapılan tüm çalışmalarda mast hücrelerinin değerlendirilmesi için genellikle, toluidin mavisi ile boyama yapılmıştır. Toluidin mavisi ile boyamada mast hücrelerinin histokimyasal heterojenitesini tespit etmek oldukça zordur. Biz çalışmamızda, soğukta-hareketsizlik stresine maruz bırakılan sıçanların mide dokularında mast hücrelerinin histokimyasal heterojenitelerinin değerlendirilmesi için Alcian mavisi-safranin boyama tekniğini kullandık.

Mast hücreleri, yerleşimleri, yapıları, boyanma karakteristikleri ve fonksiyonları açısından değişkenlik gösteren hücrelerdir. Değişkenliklerine göre, mast hücreleri mukozal (MMC) ve bağ dokusu (CTMC) mast hücreleri olarak, diğer bir deyişle atipik ve tipik mast hücreleri olarak iki gruba ayrılmaktadır (15,42). Mast hücrelerinin proteoglikan matriks dağılımındaki değişiklikleri, Alcian mavisi-safranin boyama ile açıklanabilmektedir. Bağ dokusu mast hücrelerinin, heparin içeriğine bağlı olarak Alcian mavisi-safranin ile maviden kırmızıya doğru boyandığı bildirilmektedir (15,42). Heparin içeriği arttığı zaman, safranin ile (kırmızı boyalı) ve heparin içeriği azaldığında ise Alcian mavisi ile (mavi boyalı) boyanmaktadır. Mukozal mast hücreleri ise çok az yada hiç heparin içermezler ve bu nedenle sadece Alcian mavisi ile (mavi boyalı) boyanırlar. Bizim çalışmamızda uygulanan histokimyasal yöntem ile strese bağlı olarak hem mavi hemde kırmızı boyalı mast hücrelerinin degranülasyona uğradığı ve VIP' in ise etkin bir şekilde sadece kırmızı boyalı mast hücre degranülasyonunu engellediği gözlenmiştir. Bu bize mide lezyonu oluşumunun bağ dokusu mast hücresi aktivasyonu ile ilişkili olduğu izlenimini vermektedir. Bu da stresle oluşturulmuş mide ülserlerinin patogeneğinde histamine ilaveten, bağ dokusu mast hücresi kaynaklı heparinin de önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bağ dokusu mast hücresi kaynaklı heparin, akut kanamalı mide lezyonlarının oluşumundan sorumlu tutulabilir. Sonuçlarımız ayrıca bağ dokusu mast hücrelerinde bulunan ve mediatör

salınımı üzerine modölatör etkisinin olduğu ileri sürölen, VIP ile ilgili diğer çalışmaları da bir ölçüde doğrulamaktadır (1,11,14).

Mast hücreleri kaynaklı histamin, mide ülserlerinin oluşumunda sorumlu tutulan bir mediatör olarak bildirilmektedir (8,38,43). Histaminin, mide dokusu asit salınımı üzerine uyarıcı etkisinin olduğu ve artan histamin salınımının, paryetal hücreler üzerindeki H₂ reseptörü aracılığıyla bu hücreyi uyarıp asit salgısının artışına neden olduğu bildirilmektedir (38,43). Brown' un histamin hipotezine göre artmış histamin salınımıyla mide ülserlerinin oluşumu ya asit salınımını uyararak ya da mikrosirküler fonksiyonları değiştirerek olmaktadır (8). Stresin mast hücre degranölasyonuna ve histamin salınımına neden olduğu, salınan bu histaminin H₂ reseptörü aracılığıyla paryetal hücreleri uyarıp asit salınımına ve böylece mide ülserlerine neden olduğu bildirilmektedir (9,13,38). H₂ reseptör blokerleri kullanılarak yapılan çalışmalarda mide ülserlerinin önlendiği gösterilmiştir (7,9,10,45). Histaminin mide asit salgısı ve stres ülserleri ile olan ilişkisi genellikle H₂ reseptör antagonistleri kullanılarak yapılan çalışmalarla ispatlanmaya çalışılmıştır (3,7,9,27). Buna karşın yaptığımız kaynak taramalarında, stres ülseri gelişmesi sırasında mide dokusundaki histamin düzeyi hakkında bilgi veren yalnızca 2 çalışmaya rastlanmıştır . Çalışmaların birinin de midede stres ile histamin artışının gözlenmediği bildirilirken (7), Das ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada artış olduğu bildirilmektedir (13).

Bizim çalışmamızda soğukta-hareketsizlik stresinin, mide dokusu histamin düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı ve stres öncesi VIP uygulamasının histamin düzeyinde azalma yapmaksızın ülseri engellediği gözlenmiştir. Bouclier ve arkadaşlarının çalışmaları da mide ülserlerinin gelişmesinde histamin artışının şart olmadığını göstermektedir (7). Bu çalışmada soğukta-hareketsizlik stresinin, mide dokusu histamin düzeyinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı ve Cimetidine gibi H₂ reseptör blokeri

kullanıldığında ise , mide dokusu histamin düzeyinde bir azalma olmaksızın ülserlerin gerilediği gözlenmiştir (7). Bizim çalışmamızın ilginç yönü; histaminin metilasyon ürünü olan metilhistamin düzeyinin ölçülmesi ve stres grubunda metilhistamin düzeylerinin anlamlı şekilde artmış olup VIP uygulaması ile bunun azaldığının gözlenmesidir. Bu nedenle çalışmamız, strese bağlı gelişen ülserlerde metilhistaminin olaya iştirakinin olabileceğini ileri süren ilk çalışmadır. Strese bağlı olarak mide dokusunda histamin artışını kabul eden araştırmacıların, ölçümde kullandıkları spektrofotometrik yöntem, histamin ve metilhistaminin kolayca ayırt edilemeyeceği bir yöntem olması nedeni ile olasılıkla sonuçtaki artmış histamin (histamin+metilhistaminin) göstergesi olabilir (13).

Bu çalışmadaki bir diğer önemli bulguda, lezyonların oluşumundan sonra VIP uygulamasının bu lezyonları önlemiş olmasıdır. Sonuçlarımız VIP'in etkin bir şekilde soğukta-hareketsizlik stresine bağlı gelişen ülserleri tedavi edebileceğini göstermektedir.

VIP' in yukarıda belirtilen ve çalışmamızın bulguları olarak sunulabilen mast hücreleri degranülasyonunu inhibe eden, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerine ilaveten ayrıca gastrin hormon salgısını inhibe edici, mide fundus kasını gevşetici ve mide kan akımını artırıcı etkileride bulunmaktadır (49).

Tüm bunlar dikkate alındığında VIP' in tek bir yol veya mekanizma üzerinden değil çok yönlü bir etki mekanizması ile soğukta-hareketsizlik stresine bağlı ülserlerin gelişmesini engelleyebileceği düşünülmektedir. Bu durumun VIP' e ülser tedavisinde kullanılan diğer maddelere kıyasla büyük bir üstünlük getirdiği kanısındayız.

Bu alışma, 17-20 Eylöl, 1997 tarihleri arasında Almanya-Freiburg' da dölzenlenen " 3 rd International Syposium on VIP, PACAP, and Related Peptides" kongresinde sözlöl bildiri olarak sunulmuştur. Çalışmanın özet formu " Regulatory Peptides (vol; 71, number; 2, 15 August 1997)" de yayınlanmıştır ve tam metin formu ise " Annals of New York Academy Of Sciences" ' da yayınlanmak üzere kabul edilmiştir.



6. KAYNAKLAR DİZİNİ :

- 1)** Aiuti, F., Carini, C. and Paganelli, R.: Report on the XIII ICACI Montreux, Switzerland on 17-23 October 1988 Immunol Today., 10, 71-73, (1989).
- 2)** Akin, M. Z., Tunçel, N., Gürer, F., Kural, N. and S. Uslu.: Effect of Vasoactive intestinal peptide and Naloxone Combination on Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Level and Kidney Histology of Rats Exposed to Severe Hemorrhage, Pharmacology., 47, 194-199, (1993).
- 3)** Al-Mashhadani, W. M., Karim, K. H., Al - Taie R. I. and Al-Zahawi H. M.: Nifedipine versus cimetidine in prevention of stress - induced gastric ulcers in rats, European Journal of Pharmacology., 192, 117-121, (1991).
- 4)** Basso, N., Materia, A. and Jaffe, B. M.: Prostaglandin generation in the gastric mucosa of rats with stress ulcer, Surgery., 94(1), 104-108, (1983).
- 5)** Bast, A., Guido, R. M. M. Haenen. and Doelman, J. A. Cees.: Oxidants and Antioxidants: State of the Art, The American Journal of Medicine., 91(suppl 3C), 2S-13S, (1991).
- 6)** Berisha, H., Foda, H. D., Sakakibara, H., Trotz, M., Pakbaz, H., & Said, S. I.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents lung injury due to xanthine/xanthine oxidase, American Journal of Physiology., 259, L151-L155, (1990).
- 7)** Bouclier, M., Jung, M. J. and Gerhart, F.: Histamine receptor blockade (H_2) versus inhibition of histamine synthesis in stress ulceration in rats, European Journal of Pharmacology., 90, 129-132, (1983).
- 8)** Brown, P. A., Brown, T. H., and Vernikos-Danellis, J.: Histamine H_2 Receptor: Involvement in Gastric Ulceration , Life Sciences., 18, 339-344, (1976).

- 9)** Cho, C. H., and Ogle, C. W.: Cholinergic-Mediated Gastric Mast Cell Degranulation With Subsequent Histamine H₁ -and H₂ - Receptor Activation in Stress Ulceration in Rats, *European Journal of Pharmacology* ,55, 23-33, (1979).
- 10)** Cho,C.H. and Ogle,C.W.: Paracetamol potentiates stress-induced gastric ulceration in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, 42, 505-507, (1989).
- 11)** Cutz, E., Chan, W., Track, N.S. and Said, S.I.: Release of Vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberator, *Nature.*, 275, 661-662, (1978).
- 12)** Çoşkun, T., Alican, İ., Yegen, B. Ç., San, T., Cetnel, S. and Kurtel, H.: Cyclosporin A Reduced the Severity of Cold-Restraint Induced Gastric Lesions Role of Leukocytes, *Digestion.*, 336 , 1-10, (1994).
- 13)** Das, D., and Banerjee, R.K. : Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration, *Molecular and Cellular Biochemistry.*, 125, 115-125, (1993).
- 14)** Derek, M.McKay and J. Bienenstock.: The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract, *Immunology Today.*, 10, 71-73, (1994).
- 15)** Galli,S.: *Biology of Disease, Laboratory Investigation.*, 62, 5-25,(1990).
- 16)** Ganong, W.F.: Peptic ulcer in "Review of Medical Physiology" 16. Edition, Appleton&Lange, Connecticut, 451, (1995)
- 17)** Garg,G.P.,Cho,C.H. and Ogle C. W.: Etachrinic Acid and Sulphasalazine Inhibit the Generation of Leukotriene C₄ in Rat Stomachs : A Possible Gastric Anti-Ulcer mechanism in Cold-Restraint Stressed Rats, *Pharmacology.*, 44, 177-189, (1992).

- 18)** Garrick, Buack, S. and Bass, P.: Gastric motility is a factor in cold restraint-induced lesion formation in rats, *American Journal Society*., 250 (Gastrointest. Liver Physiol.13), G191-G199, (1986).
- 19)** Glick, D.: Methods of biochemical analysis, in "Adaptation of Polarographic Oxygen Sensors for Biochemical Assays" , (Lessler, M. A.) Vol 28,175-199, Wiley -Interscience, New York, (1982).
- 20)** Goossens,J., Reempts,J.V & Van Waume, J. P.: Cytoprotective effects of disodium cromoglycate on rat stomach mucosa, *Br.J.Pharmac.*, 91, 165-169, (1987).
- 21)** Guigan, J. E.: Peptic ulcer and Gastritis in "Harrison's Principles of Internal Medicine" (Wilson, J.D.), twelfth edition, vol.2, 1229-1232, (1991).
- 22)** Gürsoy, M.A., Kayabalı, M., Hazar, H. ve Kotiloğlu, E.: Sıçanlarda oluşturulan Stress Ülserinde Serbest Oksijen Radikallerinin ve Radikal Temizleyicilerinin Rolü, *Ulusal Cerrahi Dergisi.*, 8(1), 22-28, (1992).
- 23)** Halliwell, B.: Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease, *The American Journal of Medicine.*, 91(suppl 3C), 14S-22S, (1991).
- 24)** Hase, T. and Moss, B. J.: Microvasculer changes of gastric mucosa in the development of stress ulcer in rats, *Gastroenterology.*, 65, 224-234, (1973).
- 25)** Irani,A.M.A. and Schwartz,L.B.: Mast Cell Heterogeneity, *Clinical and-Experimental Allergy*, 1, 143-1 55, (1989).
- 26)** Kalfin, R., Maulik, N., Engelman, R.M., Cordis, G.A., Milenov, K., Kasadov, L. and Das, D.K.: Protective role of intracoronary vasoactive intestinal peptide in ischemic and reperfused myocardium, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutica.*, 39, 308-318, (1986)

- 27)** Karmeli, F., R. Eliakim., E. Okon. and D. Rachmilewitz.: Gastric Mucosal Damage by Ethanol Is Mediated by Substance P and Prevented by Ketotifen, a Mast Cell Stabilizer. *The American Gastroenterological Association.*, 100, 1206-1216, (1991).
- 28)** Klamut, M.J., Keshavarzian, A.: Stress Ulcer, *J. of the Ass. for Academic Minority Physicians.*, 3 (3), 89-94, (1994).
- 29)** Kitamura, Y.: Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations, *Ann. R. Immunology.*, 7, 59-76, (1989).
- 30)** Kostyuk, A. V. & Potapovich, A.I.: Superoxide-driven oxidation of quercetine and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase, *Biochem. Int.*, 19, 1117-1134, (1989).
- 31)** Kurosawa, M., & Ishizuka, T.: Inhibitory effects of Vasoactive intestinal peptide on superoxide anion formation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalaline-activated inflammatory cells in vitro, *Journal of the Association for Academic Minority Physicians.*, 100, 28-34, (1993).
- 32)** Lowry, O. H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. & Randal, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, (1951).
- 33)** Mc Cance, K. L., Shelby, J.: Stress and Disease in " *Physiopathology*", (Sally, Schrefer.), Chapter 9, 301-310, (1994).
- 34)** Misra, R. B. & P. H. Misra.. Vasoactive intestinal peptide (VIP), a singlet oxygen quencher, *J. Biol. Chem.*, 265, 15371-15374, (1990).
- 35)** Miller, T.A.: Mechanisms of Stress-Related Mucosal Damage, *The American Journal of Medicine.*, vol. 83(suppl 6A), 8-13, (1987).

- 36)** Ogle, C. W and Cho, C. H.: The protective mechanism of FPL55712 against stress-induced gastric ulceration in rats, *Agents and Actions.*, 26, 3-4, (1989).
- 37)** Ogle, C. W. and Hui,S.-C.G.: The influence of peripheral or central administration of ondansetron on stress-induced gastric ulceration in rats, *Experienta.*, 51, 786 - 789, (1995).
- 38)** Öbrink, K.J.: Histamine and gastric acid secretion, *Scand. Journal of Gastroenterology.*, 26 (suppl 180), 4-8, (1991).
- 39)** Özlük, K., İşbil, N., Özyener, F. and Noyan, S.: The effect of Concentrated Apyrase Derived from Potato on Experimental-Induced Stress Ulcer in Rats, *Tr. of Medical Sciences.*, 23, 269-273, (1995).
- 40)** Pakbaz, H., Berisha,H., Foda,H.D., Absood,A & Said,S.I.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) and related peptides : A new class of anti - inflammatory agents ?, *Int. Symp. on Vasoactive Intestinal Peptide Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide and Related Regulatory Peptide*, Gabriel Rosselin, Ed.: 597-605, World Scientific, Singapore, (1995).
- 41)** Paolo, M.I.L., Gravelle, F.P.C., Celener, D., Gonzalez, E., Rosembeck, G., Bandi, J.C and Fernandez, L.B.: Influence of VIP on the number of enterochromaffin and mucosal mast cells in the colon of the rat, *Regulatory Peptides.*, 39, 191-200, (1992).
- 42)** Pearce,F.L.: On the Heterogeneity of Mast Cells, *Pharmacology.*, 32, 61-71,(1986).
- 43)** Prinz,C., Kajimura,M., Scott, D. and Sachs, G.: Histamine Secretion From Rat Enterochromaffinlike Cells, *Gastroenterology.*, 105, 449-461, (1993).

- 44)** Ray, A., Henke, P.G. and Sullivan, R.M.: Noradrenergic mechanisms in the central amygdalar nucleus and gastric stress ulcer formation in rats. *Neuroscience letters.*, 110, 31-336, (1990).
- 45)** Ray, A., Puri, S., Chakravarty, A. K., & Sen, P.: Central Histaminergic involvement during stress in rats, *Indian Journal of Experimental Biology.*, 30, 724-728, (1992).
- 46)** Rao, N. A.: Role of oxygen free radicals in retinal damage associated with experimental uveitis, *Trans. Am. Ophthalmol., Soc.* 88, 797-850, (1990).
- 47)** Robert, A. and Kauffman, G.L.: Pathogenesis of Stress Ulcers in "Gastrointestinal Disease " (Fordtran, S.) 4th ed, 785, W. B. Saunders Company. Philadelphia, (1989).
- 48)** Saavedra-Delgado, A.M.P., Turpin, S. and Metcalfe, D.D.: Typical and atypical mast cells of the rat gastrointestinal system: distribution and correlation with tissue histamine, *Agents and Actions.*, 14, 1-7, (1984).
- 49)** Said, S. I.: Vasoactive intestinal peptide. *Journal of Endocrinol Invest.*, 9, 191-200, (1986).
- 50)** Said, S. I.: VIP and Nitric oxide : Physiological Co-Transmitters with antagonistic roles in Inflammation, *Biomedical Research.*, 15, Supplement 2, 79-84, (1994).
- 51)** Said, S. I.: Vasoactive Intestinal Peptide . Airway Smooth Muscle, Peptide Receptors, Ion Channels and Signal Transduction ed by Roseburn and M. A. Giembyez, Birkhuser Verlag, Basel / Switzerland, (1995).
- 52)** Said, S.I.: Vasoactive intestinal peptide and Nitric Oxide Divergent Roles in Relation to Tissue Injury : VIP, PACAP, AND, related Peptides, Second

International Symposium, Annals New York Academy Of Sciences., 805, 379-38, (1996).

53) Sakakibara, H., Takamatsu, J., & Said, S.I.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits superoxide anion release from rat alveolar macrophages, Am. Rev. Respir. Dis., 141, A645, (1990).

54) Saltman, P.: Oxidative Stress: A Radical View, Sem. in Hematology., 26 (4),249-258, (1989)

55) Sies, H.: Oxidative Stress : From Basic Research to Clinical Application., The American Journal of Medicine., 91(suppl 3C), 31S-37S, (1991).

56) Shore,P.A., Burkhalter, A. and Chon, V.H.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues, Journal of Parmacology Expererimental Therapeutica., 127, 182-184, (1959).

57) Steinman, U., Estler, C.J. and Dann, O.: Plasma histamine levels in rats treated with trypanocidal diamidines, Pharmacology., 36, 204-209, (1988).

58) Tabuchi, Y., and Kurebayashi,Y.: Effect of DS-4574, a Novel Peptidoleukotriene Antagonist with Mast Cell Stabilizing Action, on Gastric Lesions and Gastric Secretion in Rats, Japan. J. Pharmacol., 60, 335-340, (1992).

59) Tıkız, H., Tunçel, N., Gürer, F. and Bayçu, C.: Mast Cell Degranulation in Hemorrhagic Shock in Rats and the Effects of Vasoactive Intestinal Peptide, Aprotinin and H₁ and H₂ -Reseptor Blockers on Degranulation, Pharmacology., 43, 47-52, (1991).

60) Tıkız, H., Tunçel,N., Akın,M. Z., Gürer,F.: The Effect of Vasoactive intestinal peptide (VIP) and Naloxone Combination on Survival Rates Exposed to Severe Hemorrhage, Peptides., 13 (1), 83-89, (1992).

- 61)** Tsurata, Y., Kohaski, K., and Ohkura, Y.: Simultaneous determination of histamine and N-methylhistamine in human urine and rat brain by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J.Chromatogr.*, 224,105-110, (1981).
- 62)** Tunçel, N., Cingi, İ., Uzuner, K., Gürer, F. and Fidan, M.: The effect of Denuded Epithelium on Responsiveness of Stress-Induced Guinea-Pig Isolated Trachea To (VIP) and Salbutamol, *Turk. J. Resc. Med. Sci.*, 9, 71-76, (1991).
- 63)** Tunçel, N.: Mast cells, Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), and the hemorrhagic shock : A possible Relationship?, *Biomedical Reviews.*, 2, 37-46, (1993).
- 64)** Tunçel, N., Gürer, F., Aral, E., Uzuner, K., Aydın, Y. and Bayçu, C.: The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on Mast Cell Invasion / Degranulation in Testicular Interstitium of Immobilized+Cold Stressed and β -Endorphin-Treated Rats, *Peptides.*, 17 (5), 817-824, (1995).
- 65)** Tunçel, N., Başmak,H., Uzuner,K., Tunçel,M., Altıkokka,G., Zaimoğlu,V., Özer,A. and Gürer,F.: Protection of Rat Retina from Ischemia-Reperfusion Injury by Vasoactive Intestinal Peptide (VIP): The Effect of VIP on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activity of Retina and Choroid, *Annals New York Academy Of Sciences.*, 805, 489-497, (1996).
- 66)** Tunçel, N., Aydın,Y., Koşar,M. and Tunçel, M.: The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on The Testicular Tissue Histamine Level of Immobilized + Cold Stressed Rats, *Peptides.*, 18 : 913, (1997).
- 67)** Tunçel, N., Erden,S., Uzuner,K., Altıokka,G. and Tunçel,M.: Ischemic-Reperused Rat Skeletal Muscle: The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on Contractile Force, Oxygenation and Antioxidant Enzyme Systems, *Peptides.*,18(2), 269-275, (1997).

- 68)** Uzuner, K., Tunçel,N., Aydın,Y., Tunçel,M., Gürer,F., Benli,P. and D. Ak.: The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Renal Tissues of Rats Exposed to Hemorrhagic Ischemia-Reperfusion, *Peptides.*, 16 (5), 911-915, (1995).
- 69)** Wang, J. & Lin,S.M.: Mixed plant tissue-carbon paste bioelectrode, *Anal. Chem.*, 60 ,1545-1548, (1988).
- 70)** Whiteside, C., & Hassan, M. H.:Induction and inactivation of catalase and superoxide dismutase of *Escherichia coli* by ozone, *Arch. Biochem. Biophys.*, 257, 464-471, (1987).
- 71)** Zhang, Li. T. X. J.: Role of oxygen-derived free radicals in stres-induced gastric ulceration, *Sheng Li Hsueh Pao-Acta Physiologica Sinica .*,45, 286-291, (1993).