

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**APELİN'İN İSKEMİ REPERFÜZONA BAĞLI MİDE
ÜLSERİ OLUŞUMUNDA VE İYİLEŞMESİNDEKİ ROLÜ**

Burcu GEMİCİ

Doktora Tezi

Antalya, 2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**APELİN'İN İSKEMİ REPERFÜZONA BAĞLI MİDE
ÜLSERİ OLUŞUMUNDA VE İYİLEŞMESİNDEKİ ROLÜ**

Burcu GEMİCİ

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. V. Nimet UYSAL**

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2010.03.0122.005)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 27/06/2013

Tez danışmanı: Prof. Dr. V. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



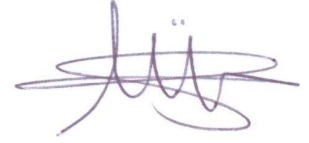
Üye: Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. İnci SÜLEYMANLAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Abdurrahman ŞERMET
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2013 tarih ve /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için doktora bilim alanında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşığıdadır (orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. **Gemici B**, Tan R, Ongüt G, Izgüt-Uysal VN. Expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric ischemia-reperfusion: role of angiotensin II. J Surg Res. 2010 Jun 1;161(1):126-33.

ÖZET

Çalışmamız, apelinin iskemi-reperfüzyon (I/R)'a bağlı mide hasarı oluşumu ve iyileşme mekanizmalarındaki rolünü göstermek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 1. Kontrol grubu, 2. Sham grubu, 3. I/R grupları (3a. I/R'dan hemen sonra, 3b. I/R'dan 24 saat sonra, 3c. I/R'dan 72 saat sonra, 3d. I/R'dan 120 saat sonra, 3e. I/R'dan 240 saat sonra feda edilen grup) 4. F13A (150µg/kg/gün) + I/R grubu, 5. I/R+F13A grupları (5a. I/R'dan 24 saat sonra, 5b. I/R'dan 72 saat sonra, 5c. I/R'dan 120 saat sonra, 5d. I/R'dan 240. saat sonra feda edilen grup) oluşturulmuştur. Tüm gruplarda mide mukozal kan akımı ve lezyon indeksi, MPO ve HO aktivitesi, 4-HNE-MDA, NOx, PGE₂, TNF- α miktarı, apelin, VEGF, HO-1 protein ekspresyonları ile Nrf2, HIF-1 α ve VEGF immünreaktivitesi ölçülmüştür. I/R uygulanan deneklerin midesinde lezyon oluşumu gözlenmiş, I/R'dan önce uygulanan F13A'nın mukozal tahribatı arttırdığı gözlenmiştir. I/R'u takiben F13A uygulanması, iyileşmenin gecikmesine neden olmuştur. Mukozal kan akımı I/R gruplarında azalmış, iyileşme sürecinde kontrol değerine ulaşmıştır. F13A uygulanan tüm gruplarda mukozal kan akımlarının düşük olduğu gözlenmiştir. I/R'a bağlı olarak MPO aktivitesindeki artış iyileşme sürecinin 24. saatinde belirginleşmiş, 72. saatinde ise azalmaya başlamıştır. F13A uygulanan I/R gruplarının iyileşme sürecinde MPO aktivitesi yüksek bulunmuştur. I/R etkisi ile 4-HNE-MDA artışı olmuş, iyileşme sürecinde kontrol seviyesine düşmüştür. I/R'u takiben F13A uygulanan gruplarda fark tespit edilmemiştir. I/R'a bağlı olarak artan doku NOx miktarı iyileşme sürecinde kontrol seviyesine düşmüş, ancak F13A uygulanan grupların iyileşme sürecinde NOx miktarı yüksek tespit edilmiştir. I/R'a bağlı olarak azalan PGE₂ miktarının iyileşme sürecinde artarak kontrol seviyesine ulaştığı, ancak F13A uygulanan iyileşme gruplarında bu artışın daha geç olduğu gözlenmiştir. Doku TNF- α düzeyi I/R'a bağlı olarak artmış, iyileşme sürecinde azalmıştır. F13A uygulanan gruplarda TNF- α düzeyinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Nrf2 immünreaktivitesinin I/R sonrasında midenin kas ve stroma bölgelerinde bir miktar azaldığı, diğer bölgelerde değişmediği tespit edilmiştir. I/R ve iyileşmenin 24. saatinde yüksek olan HO aktivitesi, iyileşmenin 120. saatinden itibaren azalmış, F13A uygulanan iyileşme gruplarında fark tespit edilememiştir. Aktivite ile benzer şekilde HO-1 protein ekspresyonunun I/R ile arttığı ve iyileşme sürecinde kontrol seviyesine düştüğü tespit edilirken, F13A uygulaması HO-1 ekspresyonuna etki etmemiştir. I/R uygulamasına bağlı olarak artan HIF-1 α immün reaktivitesi iyileşme sürecinde azalmış, F13A uygulanan gruplarda azalmanın daha belirgin olduğu gözlenmiştir. I/R apelin ekspresyonunda artışa neden olmuştur. VEGF ekspresyonu I/R sonunda değişmemiş, I/R'u takiben 120. ve 240. saatte artış tespit edilmiştir. F13A iyileşme sürecindeki VEGF ekspresyonundaki artışı baskılamıştır.

Sonuç olarak; Apelin, I/R'a bağlı lezyon oluşumunu engelleyici ve iyileşmeyi hızlandırıcı etkiye sahiptir. Apelin'in mide mukozası üzerine olan olumlu etkileri mukozal kan akımını artırıcı özelliğine, TNF- α yapımını azaltıcı, PGE₂ yapımını ve VEGF ekspresyonunu artırıcı etkisine bağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Apelin, F13A, İskemi Reperfüzyon, Ülser İyileşmesi, Mide Mukozal Bariyeri

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the possible role of apelin on formation and healing mechanisms of ischemia reperfusion (I/R) induced mucosal lesions. For this purpose, 1. Control group, 2. Sham group, 3. I/R groups (for this group, the animals were sacrificed at five different time points following the I/R. 3a. immediately, 3b. 24 hours later, 3c. 72 hours later, 3d. 120 hours later, 3e. 240 hours later I/R.) 4. F13A (150µg/kg/day) + I/R group, 5. I/R + F13A groups (for this group, the animals were exposed to the I/R and taken apelin antagonist then were sacrificed at four different time points following the I/R. 5a. 24 hours later, 5b. 72 hours later, 5c. 120 hours later, 5d. 240 hours later.). Gastric mucosal blood flow, lesion index, MPO, 4-HNE-MDA, NO_x, PGE₂, TNF-α, HO activity apelin, VEGF, HO-1 protein expressions and immunoreactivities of Nrf2, HIF-1α and VEGF were measured. Mucosal lesion formation was observed in animals, which are exposed to I/R. It was observed that F13A application before I/R increased mucosal injury. The application of F13A following I/R caused a delay in healing process. Mucosal blood flow decreased in I/R groups, and reached into control levels in healing groups but lower blood flow was observed in all F13A applied groups. Increased gastric MPO activity due to I/R was greater in 24 hours later I/R and started to decrease in 72 hours later I/R. High MPO activity was determined in healing process of F13A applied I/R groups. I/R application caused to increase in 4HNE-MDA levels but 4-HNE-MDA levels reached into control levels in healing groups. No significant difference was detected between F13A applied and non applied healing groups. NO_x levels increased due to I/R and decreased even reached into control levels during healing process. However high NO_x levels were established in all F13A applied healing groups. It was observed that decreasing PGE₂ levels due to I/R, reached into control levels in healing groups but this increase delayed in F13A applied healing groups. TNF-α levels in gastric tissue increased due to I/R and decreased gradually in healing groups. Higher TNF-α levels were determined in F13A applied healing groups compared to non F13A applied healing groups. Nrf2 immunoreactivity decreased due to I/R in muscle and stroma areas of the stomach, no alteration was detected in the other areas. High levels of HO activity and HO-1 protein expression levels were determined in I/R group and 24th hour of healing process, and levels started to decrease at 120th hour of healing process. No significant difference was detected in HO activities and HO-1 protein levels between F13A applied and non applied healing groups. The increased levels of HIF-1α immunoreactivity due to I/R, decreased in healing process. Greater decrease was established in F13A applied groups. I/R application caused to increase in Apelin protein expression. VEGF protein expression did not change due to I/R but an increase was detected at 120th and 240th hours following I/R. F13A depressed the increase of VEGF expression in healing groups.

In conclusion Apelin has a preventing effect on mucosal lesion formation and accelerating effect on healing process. Positive effects of Apelin on gastric mucosa can be explained by the feature of increasing gastric mucosal blood flow, PGE₂ production and VEGF expression and also decreasing TNF-α levels.

Key words: Apelin, F13A, Ischemia Reperfusion, Gastric Healing, Gastric Mucosal Barrier

TEŞEKKÜR

Doktora tezi çalışmamın tasarı aşamasından yazım aşamasına kadar tım aşamalarında bana yol gsteren, bilgisini, tecrübelerini sabrını ve desteğini esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Nimet UYSAL'a,

Deneysel ve laboratuvar çalışmalardaki yardımları ve manevi desteği için sevgili çalışma arkadaşım Arş. Gör. İlknur BİRSEN'e

Laboratuvar alışmalarında "Hemoksijenaz Aktivitesinin Ölçüm Metodu" konusunda tecrübelerini, bilgisini, teknik olanaklarını ve vaktini benimle paylaşan değerli hocam Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mutay ASLAN'a,

Cerrahi işlemlerdeki yardımları için Sayın Erol NİZAMOĞLU'na,

Teknik konulardaki desteği için Sayın Akın BÜYÜKAKAR'a

ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA	
ÖZET	v	
ABSTRACT	vi	
TEŞEKKÜR	vii	
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii	
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi	
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii	
TABLolar DİZİNİ	xiv	
GİRİŞ	1	
GENEL BİLGİLER	4	
2.1.	Mide Mukoza Bariyeri ve Ülser Yapıcı Faktörlerin Tetiklediği Hasara Karşı Savunma Mekanizmaları	5
2.1.1.	Mukus-Bikarbonat Bariyeri	6
2.1.2.	Epitel Bariyeri	7
2.1.3.	Endotel Hücre Bariyeri	7
2.1.4.	Midede Mikrovasküler Kan Akımının Regülasyonu Haraplayıcı Faktörlere Karşı Kan Akımı Yanıtı	10
2.1.5.	Nörohormonal Koruma Mekanizmalarının Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi	10
2.1.6.	PG'lerin Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi	11
2.1.7.	Endojen NO'in Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi	12
2.1.8.	Endojen H₂S'in Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi	13
2.1.9.	Endojen CO'in Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi	14
2.1.9.1.	Hemoksijenaz Sistemi	14
2.1.9.2.	Hem Katabolizmasının Ürünleri	17
2.1.10.	HO/CO ve NOS/NO Yolakları Arasındaki Karşılıklı Etkileşim	19
2.2.	İskemi Reperfüzyon	20
2.2.1.	İskemi-Reperfüzyon ve İmmün Aktivasyon	21
2.2.1.1.	İskemi-Reperfüzyon ve Doğal İmmün Yanıt Oluşumu	21
2.2.1.2.	İskemi-Reperfüzyon ve Adaptif İmmün Yanıt Oluşumu	22
2.2.2.	İskemi-Reperfüzyon ve Hücre Ölümü	23
2.2.3.	İskemi-Reperfüzyon ve Mikrovasküler Fonksiyon Bozukluğu	24
2.2.4.	İskemi Toleransını Artırmaya Yönelik Metabolik Stratejiler	24

2.2.5.	İskemi Reperfüzyon ve Sindirim Sistemi	25
2.2.5.1.	Midede I/R'a Bağlı Mukozal Hasar Oluşumu ve İyileşme Süreci	25
2.3.	Apelinerjik Sistem	28
2.3.1.	APJ Reseptörü	28
2.3.2.	Apelinerjik Peptidler	29
2.3.3.	Apelinerjik Sistemin Patofizyolojik Roller	30
2.3.3.1.	Apelinerjik Sistem ve Kardiyovasküler Sistem	30
2.3.3.2.	Apelinerjik Sistem, Vasküler Yapı, Anjiyogenez ve Neoanjiyogenez	31
2.3.3.3.	Apelinerjik Sistem ve İskemi-Reperfüzyon	32
2.3.3.4.	Apelinerjik Sistem ve Böbrek	33
2.3.3.5.	Apelinerjik Sistem, Diyabet, Obezite ve Besin Alımı	33
2.3.3.6.	Apelinerjik Sistem, Merkezi Sinir Sistemi ve Vücut Sıvı Homeostazisi	34
2.3.3.7.	Apelinerjik Sistem ve İmmün Sistem	34
2.3.3.8.	Apelinerjik Sistem ve Gastrointestinal Sistem	34
2.4.	Hipotez	36

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1.	Gruplandırma ve Deney Protokolü	37
3.1.1.	Deney Grupları	37
3.2.	Parametrelerin Tayini	38
3.2.1.	Mide Mukozal Kan Akımı Ölçümü	38
3.2.2.	Lezyon İndeksinin Tayini	39
3.2.3.	Mide lezyonlarının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi	39
3.2.4.	Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini	40
3.2.5.	4-Hidroksinonenal-Malondialdehit Miktarının Tayini	41
3.2.6.	Nitrit/Nitrat Tayini	41
3.2.7.	Prostaglandin E ₂ Miktarının Tayini	42
3.2.8.	Tümör Nekrozis Faktör- α Miktarının Tayini	43
3.2.9.	Mide dokusundaki Nükleer Faktör Eritroid-2 ile ilişkili Faktör 2 ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü immünoaktivitesinin immunohistokimya ile Tayini	43
3.2.10.	Hemoksijenaz Enzim Aktivitesinin Tayini	45
3.2.11.	Mide dokusundaki Apelin, VEGF, HO-1 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Tayini	46
3.2.12.	Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1alfa İmmünreaktivitesinin Belirlenmesi	47
3.3.	İstatistiksel Analiz	47

BULGULAR

4.1.	Lezyon İndeksi	48
4.2.	Mide Lezyonlarının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi	49
4.3.	Mide Mukozal Kan Akımı	52
4.4.	Miyeloperoksidaz Aktivitesi	53
4.5.	4-Hidroksinonenal- Malondialdehit Miktarı	54
4.6.	Nitrit/Nitrat Miktarı	55
4.7.	Prostaglandin E ₂ Miktarı	56
4.8.	Tümör Nekrozis Faktör- α Miktarı	57
4.9.	Mide dokusundaki Nükleer Faktör Eritroid-2 ile ilişkili Faktör-2 İmmünreaktivitesi	58
4.10.	Hemoksijenaz Aktivitesi	60
4.11.	Hemoksijenaz-1 Protein Ekspresyonu	61
4.12.	Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 α İmmünreaktivitesi	62
4.13.	Apelin Protein Ekspresyonu	64
4.14.	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Protein Ekspresyonu	65
4.15.	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü İmmünreaktivitesi	66

TARTIŞMA	68
-----------------	-----------

SONUÇLAR	73
-----------------	-----------

KAYNAKLAR	74
------------------	-----------

ÖZGEÇMİŞ	100
-----------------	------------

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

[Pyr1]-Apelin 13	: Piroglutaminlenmiş Apelin-13
4-HNE	: 4-hidroksinonenol
ALDH₂	: Aldehit Dehidrogenaz-2
AMPK	: AMP- İle Aktive Olan Protein Kinaz
AP-1	: Aktivatör Protein-1
ARE	: Antioksidan Yanıt Elementi
AT-1	: Anjiyotensin II Tip1 Reseptörü
ATF-2	: Aktive Transkripsiyon Faktörü-2
AVP	: Arjinin Vazopressin
bFGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BR	: Bilirubin
BV	: Biliverdin
CCK	: Kolesistokinin
CGRP	: Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptid
CO	: Karbonmonoksit
CO₂	: Karbondioksit
CORM	: Karbon Monoksit Salgılatıcı Molekül
COX	: Siklooksijenaz
CREB	: cAMP Yanıt Elementini Bağlayan Protein
CRF	: Kortikotropin Salgılatıcı Faktör
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGF-R	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
EPO	: Eritropoietin
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK	: Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
GSK-3b	: Glikojen Sentaz Kinaz-3b
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₂S	: Hidrojen Sülfür
HCl	: Hidroklorik Asit
HCO₃⁻	: Bikarbonat
HO	: Hemoksijenaz
HSP	: Isı Şok Proteinleri
IFN-β	: İnterferon-1Beta
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IKK	: İnhibitör Kappa Kinaz
IL-17	: İnterlökin-17
IL-1α	: İnterlökin-1 Alfa
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta
IL-8	: İnterlökin-8
JNK	: c-Jun N-terminal Kinaz
KO	: Knock Out
LPS	: Lipopolisakkarit
LTB	: Lökotrien B
MDA	: Malondialdehit

MIF	: Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör
NFK_B	: Nükleer Faktör Kapa B
Nrf2	: Nükleer Faktör E İle İlişkili Faktör 2
NSAID	: Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar
PAI	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PARP	: Poli-ADP-Riboz-Polimeraz
PDGF-CC	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü-CC
PG	: Prostaglandin
PGI₂	: Prostoglandin I ₂
PHD	: Prolilhidroksilaz
PI3K	: Fosfotidilinositol 3 Kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
SDF-1	: Stromal Hücre Kökenli Faktör -1
sGC	: Solubl Guanilat Siklaz
TFF	: Trefoil Faktör Ailesi
TFF2	: Trefoil Faktör 2
TGF-A	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-A
THBS-1	: Trombospondin 1
TLR	: Toll Benzeri Reseptörler
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-A
tPA	: Doku Plazminojen Aktivatörü
TRF	: Tropicin Salgılatıcı Faktör
TRPV-1	: Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Mide Mukozal Savunma Mekanizmaları	8
2.2. Deneysel I/R ile Oluşturulan Mukozal Lezyonların Olası İyileşme Mekanizmaları	28
3.1. Lazer Doppler akımölçer Sistemi, Optik Prob ile Mide Mukozal Kan Akımı kaydının alınması	40
4.1. Lezyon İndeksi	49
4.2. Mide Lezyonlarının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi	51
4.3. Mide Mukozal Kan Akımı	53
4.4. Miyeloperoksidaz Aktivitesi	54
4.5. 4HNE-MDA Miktarı	55
4.6. NOx Miktarı	56
4.7. PGE2 Miktarı	57
4.8. TNF- α Miktarı	58
4.9. Nrf2 İmmünreaktivitesi Fotoğrafları	60
4.10. Hemoksijenaz Aktivitesi	61
4.11. Hemoksijenaz-1 Protein Ekspresyonu	62
4.12.1. Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 α İmmünreaktivitesi	63
4.12.2. Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 α İmmünreaktivitesi Fotoğrafları	64
4.13. Apelin Protein Ekspresyonu	65
4.14. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Protein Ekspresyonu	66
4.15. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü İmmünreaktivitesi Fotoğrafları	67

TABLULAR DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Tablo 4.1.	Nrf2 İmmünreaktivitesinin Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi	58
Tablo 4.2.	VEGF İmmünreaktivitesinin Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi	66

GİRİŞ

Mide lümenindeki zararlı etkilere karşı mukozayı koruyan çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Zararlı faktörler ile savunma mekanizmaları arasındaki denge mukoza bütünlüğünün kalıcılığı için gereklidir. Kronik hastalıklar, şok, travma ve stres gibi durumlarda mide mukozasında tahribat gelişebilmektedir. Lezyon oluşumundaki temel sebep, mukozada mikrodolaşımın bozulması olarak belirtilmiştir. Mide mukozasının tahribatı, mukoza iskemisine bağlı olarak besin ve oksijen ulaşımının kesintiye uğraması ya da tamamen engellenmesi sonucu oluşan doku nekrozu ve bölgede serbest radikal veya zararlı atıkların birikimi ile gelişen patolojik bir durumdur [1].

Mide mukozal kan akımının, otonom sinir sistemi, vazoaaktif ajanlar, kapsaisine duyarlı afferent nöronlar gibi pek çok faktör tarafından düzenlendiği ve zararlı etkilere karşı mukozanın korunması ile ilişkili olduğu bilinmektedir [2].

Günümüzde mide mukozasında lezyon oluşumunun temellerini anlamaya yönelik çalışmalarda, iskemi reperfüzyon (I/R) [3-6] asetik asit [7] hidroklorik asit [2], etanol [8] ve yüksek doz nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçların uygulanması [9] gibi deneysel lezyon modelleri kullanılmaktadır. Mide lezyonlarının oluşumu ile ilgili mekanizmalar; mukoza kan akımının azalması [10-11], mide asit sekresyonunun artması [10], asit moleküllerinin mide mukozasına geri difüzyonu [12], mukozada prostaglandin yapımının azalması [13], mukus ve bikarbonat iyonu salgısının azalması [14], oksidatif strese bağlı olarak lipid peroksidasyon ürünlerinin artması [15] ve mukozaya nötrofil göçü [16] olarak özetlenebilir.

Arteriyel kan desteğinin emboli, vs sebebi ile tamamen durması ya da kesintiye uğraması, buna bağlı olarak organın metabolik kan ihtiyacı ile gelen kan arasında ciddi dengesizlik sonucu doku hipoksisi oluşmaktadır. Kan akımının kesinti sonrası yeniden sağlanması (yeniden oksijenlenme), çoğunlukla doku hasarının daha da kötüleşmesine ve derin inflamatuvar yanıt oluşumuna sebep olmaktadır (reperfüzyon hasarı). İskemi reperfüzyonun sebep olduğu lezyon alanında gelişen derin inflamatuvar yanıt, mukozaya nötrofil göçünden sorumlu olduğu bilinen proinflamatuvar sitokinlerin artışı ile karakterizedir. Mide mukozal lezyonlarında nekrozlu dokudan salınan lökotrien B, makrofaj ve lökositleri uyararak inflamatuvar yanıtı başlatmaktadır. İnflamatuvar hücrelerin uyarılması TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımına sebep olmaktadır [1]. İnflamasyonun göstergesi olan bu peptidler, iyileşme sürecinde görevli vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve apelin, gibi proteinlerin ekspresyonlarından sorumlu olduğu bilinen transkripsiyon faktörü hipoksi ile indüklenen faktör 1 α (HIF-1 α)'nın da uyarandır.

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu, mide mukozasındaki tahribatın oluşumunda önemli rol oynamaktadır. I/R'a bağlı

inflamatuvar yanıt sırasında, mukozaya göç eden nötrofillerin ürettikleri süperoksit anyonları hücrel lipidleri yıkıma uğratarak malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenol (4-HNE) gibi reaktif kısa zincirli aldehytlerin oluşumuna sebep olur.

Mide ülserinin oluşumu ve iyileşme süreçleri birbirleri ile ilişkilidir. Fizyolojik şartlarda düşük konsantrasyonda 4-HNE'nin, oksidatif stres koşullarında birikerek lezyon oluşumunu tetiklediği bilinmektedir. 4-HNE'nin sublethal konsantrasyonlarda ise, hemoksijenaz-1 (HO-1), gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını uyararak adaptif yanıt oluşmasını sağlayan, iyileşme sürecini tetikleyen bir sinyal molekülü olarak görev yaptığı gösterilmiştir [2]. 4-HNE, bu stimülasyonu antioksidan genlerin ekspresyonlarından sorumlu *nükleer faktör eritroit 2 ile ilişkili faktör-2* (Nrf-2) isimli transkripsiyon faktörünün nükleusa translokasyonunu uyararak yapmaktadır. Nrf-2 aracılı savunma yanıtı adı verilen bu yolda, Nrf-2 uyarıcı olmadığında sitoplazmada Keap-1 isimli proteine bağlı olarak bulunur. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) birikimine bağlı olarak artan oksidatif stres durumunda Nrf-2, Keap-1 den ayrılarak nükleusa translokasyonunda ve nükleusta antioksidatif yanıt elementi (ARE) bölgesine bağlanarak antioksidatif enzimlerin ekspresyonlarını uyarır. [2, 17-18].

HO-1, hemin karbon monoksit (CO), biliverdin ve serbest demire dönüşümünde görevli, ayrıca adaptif yanıt oluşumundan sorumlu önemli bir antioksidatif enzimdir. HO-1'in transkripsiyonal seviyede primer regülasyonu Nrf-2 aracılığı ile olmaktadır.

Mide mukozal lezyonlarının iyileşme süreci, çok sayıda büyüme faktörü tarafından modüle edilen karmaşık bir süreç olup, anjiyogenez, bu karmaşık sürecin en kritik bileşeni olarak bilinmektedir. Mide mukozası iyi kanlanan bir dokudur. Kanlanmayı artıran faktörler, hasarlı bölgeye besin ve oksijen sağlanması açısından iyileşme sürecini olumlu yönde uyarır [19]. İnflamasyonda arttığı bilinen proinflamatuar sitokinlerden TNF- α 'nın, HIF-1 α aktivitesini indüklediği, HIF-1 α 'nın hedef genleri arasında Apelin'e ek olarak anjiyogenik faktörlerin bulunduğu bilinmektedir [20]. Bu faktörler arasında endotel hücrelerinde proliferasyonu, migrasyonu ve tüp oluşumunu uyarıcı VEGF'de bulunmaktadır. VEGF iyileşmenin en temel basamağı kabul edilen anjiyogenezde rol almaktadır [1]. Son yıllarda yapılan çalışmalar Apelin'in de anjiyogenik peptidler arasında olduğunu göstermektedir [21].

Mide ülserlerinin iyileşme mekanizmalarını açıklamaya yönelik yollar, TNF- α 'nın indüklediği proinflamatuar yolağı, VEGF ve Apelin'in dahil olduğu anjiyogenik peptidler aracılı yolağı, prostaglandinler (PG), nitrik oksit (NO), kalsiyum geni ile ilişkili peptid (CGRP) gibi vazodilatör etkili moleküllerin görev aldığı vazodilatör yolağı gibi ayrı ayrı isimlendirilmiş olsalar da bu yollar birbirleri ile ilişkilidir. Vazodilatör yolağın ürünü olan ve Apelin tarafından yapımı indüklenen NO'nun, vazodilatör etkisine ek olarak, Nrf-2/Keap-1 yolağını aktive ederek Nrf-2'nin nükleusa translokasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini uyardığı bilinmektedir [19]. Hipoksik şartlarda ya da aktivitesi artan HIF-1'in, mide mukozanın bütünlüğünün sağlanmasından ve korunmasından sorumlu olduğu, ayrıca

vazodilatatör etkili olan PGE₂ tarafından, stabilizasyonunun, nükleer translokasyonunun uyarıldığı ve aktivitesinin modüle edildiği gösterilmiştir [22].

Apelin ilk kez 1998 yılında sığır midesinde elde edilmiş bir peptid olup, G proteini ile eşleşen Apelin reseptörü (APJ)'ne bağlanarak etki göstermektedir. 36 aminoasitlik bir peptid olan Apelin, 77 aminoasitlik prekürsör molekül olan preproapelin'den oluşmaktadır. Preproapelin'den oluşan diğer ürünler, Apelin 13'ün proglutamillenmiş formu ([Pyr1]-Apelin-13) ve Apelin 17 sıçanda daha çok bulunan ve APJ'e afinitesi çok fazla olan ürünlerdir [23]. Sindirim sistemi, de dahil olmak üzere pek çok dokuda bulunduğu gösterilen Apelin-APJ kompleksinin, kan basıncı, iştah, susama mekanizmalarını regüle ettiği, bağışıklık yanıtının oluşumu, mide asit sekresyonu, hücre motilitesi ve proliferasyonu, apoptozis gibi olaylarda rolü olduğu gösterilmiştir. [24].

Apelin ve APJ ekspresyonunun sindirim sistemide hipoksi ve inflamasyon ile indüklendiği gösterilmiştir [24-25]. Cox ve arkadaşları Apelin peptidinin, bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1'in hedef geni olduğunu, hipoksik koşullarda HIF-1α'nın, Apelin geninin ilk intronuna bağlanarak Apelin ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. HIF-1α aktivitesinin, hipoksi dışında normoksik koşullarda IFN-1β ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından da artırıldığı bilinmektedir. Han ve arkadaşlarının çalışmasında ise proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve IFN-γ'nın enterik apelin ekspresyonunu aktive ettiği, bu aktivasyonun Jak/Stat sinyal yolu aracılı Apelin'in promoter aktivitesinin artışı ile gerçekleştiği gösterilmiştir [24]. Daviaud ve arkadaşlarının çalışması ise TNF-α'nın adipoz dokuda apelin ekspresyonunu artırdığını göstermektedir [26]. Bu veriler, hipoksi ile birlikte inflamatuvar uyarıların etkisi ile de apelin ekspresyonunun arttığının kanıtıdır.

Apelin ve reseptörünün ekspresyonlarının gastrointestinal sistemde hipoksi ve inflamasyon ile indüklendiği gösterilmiştir. Hipoksi ve IFN-1β, TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinler HIF-1α aktivitesini, HIF-1α da Apelin yapımını artırmaktadır. HIF-1α'nın aktivasyonuna bağlı olarak ekspresyonu artan Apelin bir yandan vazodilatatör etkili NO yapımını artırırken, bir yandan da vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonunu artırarak anjiyogeneze yol açmaktadır. Hipoksik koşullarda veya proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile aktivitesi artan HIF-1α'nın mide mukoza bütünlüğünün sağlanmasından ve korunmasından sorumlu ve vazodilatatör etkiye sahip PGE₂ tarafından stabilizasyonunun, nükleer translokasyonunun uyarıldığı, aktivitesinin artırıldığı gösterilmiştir.

Apelin'in, mukozal lezyon iyileşme sürecinin en kritik bileşeni kabul edilen anjiyogenezi hem *invivo* hem *invitro* şartlarda olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir [20]. Hipoksi veya hipoksiden bağımsız yol olarak tanımlanan inflamatuvar uyarıların etkisi ile ekspresyonu indüklenen Apelin peptidinin endotel hücresinin proliferasyonunu uyardığı ve rejeneratif anjiyogeneze rolü olduğu bilinmesine rağmen, literatürde Apelin'in I/R ile indüklenen mide mukozal lezyonlarının oluşum ve iyileşmesindeki rolü ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır.

Çalışmamız, Apelin'in I/R'a bağlı mide hasarı oluşumu ve iyileşme mekanizmalarındaki rolünü göstermek amacıyla yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Mide Mukoza Bariyeri ve Ülser Yapıcı Faktörlerin Tetiklediği Hasara Karşı Savunma Mekanizmaları

Mide, hidrojen iyonu, pepsinojen, mukus, intrinsik faktör ve bunun yanı sıra mukozal büyüme ve bütünlüğün korunması ile ilişkili çeşitli endojen mediyatörlerin yapımından sorumlu önemli bir organdır. Tüm bu önemine rağmen, mide yaşam boyu vazgeçilemez bir organ değildir. Midenin alınması durumunda yerine konulması gereken tek madde, eritropoezin sürdürülebilirliği için gerekli olan B12 vitamininin bağırsaktan emilimini sağlayan intrinsik faktördür [27-29].

Mide sadece alınan besinleri depolayıp kısmen sindirmekle kalmaz, aynı zamanda besinlerle birlikte alınan bakteriler, bakteri toksinleri, ilaçlar etanol gibi pek çok iritanın sebep olabileceği hasara karşı mukoza bütünlüğünü koruyarak, zararlı ajanlar için bariyer oluşturmaktadır [30].

Mide mukozası hidroklorik asit (HCl), pepsin, duodenumdan mide lümenine geri akan safra asitleri gibi endojen maddelerin de içinde bulunduğu zararlı faktörlere maruz kalmasına rağmen, yapısal bütünlüğünü devam ettirmektedir. Konu ile ilgili ilk hipotezler Hunter tarafından 1772'de ve Virchow tarafından 1853'de ortaya konmuştur. Bu araştırmacıların hipotezlerine göre midede mukozal savunma mekanizması, bazik özellikteki kanın mukozal kan damarlarında sürekli dolaşımı ve asidi nötralize etmesine dayandırılmıştır.

Mide mukozasının savunma mekanizmaları mukus bikarbonat (HCO_3^-) sekresyonu, mukozal hidrofobisite, kan dolaşımı, koruyucu prostaglandin (PG)'lerin yapımı, mukozal sülfidrillerin varlığı, nitrik oksit (NO), hidrojen sülfid (H_2S) ve karbon monoksit (CO) gibi gaz mediyatörlerin salınımı, aktif duysal afferent sinirlerden kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) gibi vazoaktif nöropeptidlerin salgılanması gibi çeşitli mukozal savunma hatlarını içermektedir.

Mukoza hücrelerinin korunma mekanizmalarının tanımlanması, PG'lerin keşfi ile hız kazanmıştır. Araşidonik asit metabolizmasının en önemli ürünü olan, PG'ler siklooksijenaz (COX) yolağı aracılığı ile oluşmaktadır. Mide mukozal savunma mekanizmaları ile ilgili olarak dönüm noktası kabul edilen bulgulardan biri, Vane ve arkadaşlarının, aspirin ve steroid olmayan anti inflamatuvar ilaçlar (NSAID)'ın ülserojenik etkilerinin temel mekanizması olarak PG sentezinin inhibisyonunu göstermeleri olmuştur [31]

1976'da sonunda Andre Robert tarafından, mikrogram dozunda ekzojen PGE_2 'nin ya da sentetik analoglarının hiperosmolar solüsyonlar, etanol, güçlü asitler, konsantre safra ve kaynar su gibi çeşitli ülserojenik ve nekrotize edici ajanlara karşı mide mukozasını etkili şekilde koruduğu gösterilmiştir [32]. Bu bulgular mide mukozal savunma mekanizmalarına olan ilgiyi yeniden canlandırmıştır. Sonradan

gelen çalışmalar, bir dizi mukozal savunma mekanizmasının mukoza bütünlüğünün devamlılığını sağladığını ve hasar ya da ülser oluşumuna karşı koruduğunu göstermiştir [33].

Midede, PG'ler aracılığı ile sağlanan hücre koruyucu etkinin temel mekanizması, PG'lerin mide mukozal savunma mekanizmalarını güçlendirmesi esasına dayandırılmıştır. Ancak Konturek ve arkadaşları, ilk defa PG'lerin hücrel korunma mekanizmasında primer mediyatör olmayabileceğini ortaya koymuşlardır [34-35]. Mukozal savunma hatlarına epidermal büyüme faktörü (EGF)'nü de eklemiştirler. Sonraki çalışmalarında, mukozal NO biyosentezindeki değişimlere bağlı olarak tükürük bezlerinin trofik bir hormon olan EGF'ü salgıladığını, EGF gibi tükürük bezi kaynaklı olan büyüme faktörlerinin, NO ile etkileşime girerek mukozal kan akımını artırmak yolu ile mide mukoza bütünlüğünün devamlılığını sağlayabileceğini ortaya koymuşlardır [36]. Yapılan çalışmalarda büyüme faktörleri (özellikle EGF)'nin, aspirin gibi NSAID'lerin sebep olduğu PG inhibisyonuna bağlı mukozal hasara karşı, koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir [30].

Normal şartlar altında, mukoza bütünlüğünün devamı, savunmanın ilk hattı olan preepitelyal faktörler (mukus-bikarbonat bariyeri) ve savunmanın ikinci hattı olan epitel bariyer (sıkı ve gevşek bağlantılar ile birbirlerine bağlantılı, aralıksız yüzey epitel hücrelerinin oluşturduğu, HCO_3^- , mukus, fosfolipit, PG'ler ve şok proteinlerini üreten tabaka) tarafından sağlanmaktadır. Mide mukozasının diğer önemli savunma mekanizmaları ise büyüme faktörleri, PGE_2 ve anti apoptotik bir protein olan survivin tarafından regüle edilen progenitör hücrelerin proliferasyonu ile sürekli epitel hücre yenilenmesi, mukozal mikro damarlar aracılığı ile kesintisiz kan akımı, duysal innervasyon, NO ve H_2S 'in üretimi olarak sıralanabilir [37].

2.1.1. Mukus-Bikarbonat Bariyeri

Mukozal savunmanın ilk basamağında yer alan mukus-bikarbonat-fosfolipid bariyeri, mukus jeli, HCO_3^- iyonları ve güçlü hidrofobik özelliklere sahip surfaktan fosfolipidlerden oluşmakta ve mukozanın luminal yüzeyini kaplamaktadır [38-40]. Bu jel yapıdaki katman, yüzey epitel hücreleri tarafından salgılanan HCO_3^- 'i yapısında barındırarak mukozal yüzeydeki mikroçevrenin nötralizasyonunu (pH:7.0) sağlamakta ve pepsinin dokuya girişini engellemektedir.

Mukozadaki yüzey epitel hücreleri tarafından salgılanan mukus, yapısında %95 su, %5 müsin glikoproteinleri ve müsin geni ürünlerini kapsar. Mukus düşük molekül ağırlıklı trefoil faktör ailesine ait peptit (TFF)'ler ile birlikte salgılanır. Mukus sekresyonu, aralarında gastrin ve sekretin'in de bulunduğu mide-bağırsak hormonları, PGE_2 ve kolinerjik ajanlar tarafından stimüle edilmektedir [39]. Aspirin ve safra tuzları gibi ülser oluşturucu maddelerin mukus jeli ve fosfolipid katmanın zarar görmesine neden olduğu ve böylece asit geri difüzyonuna ve mukozal hasarlara yol açtığı bilinmektedir [39, 41].

Lümen ve epitel arasındaki tek preepitelyal bariyer, mukus HCO_3^- bariyeridir. Bu bariyerin diğer bileşeni olan HCO_3^- 'in mukus tabakasına sekresyonu, mide ve duodenum'un epitel yüzeyinde pH gradienti oluşumuna neden olmakta ve böylece luminal asite karşı ilk mukozal savunma hattı oluşmaktadır [39-40]. EP1 reseptörü

aracılığı ile etki eden PGE₂'nin yanı sıra, luminal asit, kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF), melatonin, uroguanilin ve oreksin-A HCO₃⁻ sekresyonunu stimule eden faktörlerdir. Asit salgılayan mide mukozasının yüzey epiteli asit sekresyonunun sadece %10'u kadar bir oranda HCO₃⁻ salgılamaktadır. Mukus jeli HCO₃⁻'in luminal kaybını en aza indirerek apikal hücre yüzeyinde nötral pH düzeyini korumaktadır. Bazolateral membranda Na⁺ ve HCO₃⁻'in birlikte taşınması HCO₃⁻'in alımı için en önemli mekanizmadır.

2.1.2. Epitel Bariyeri

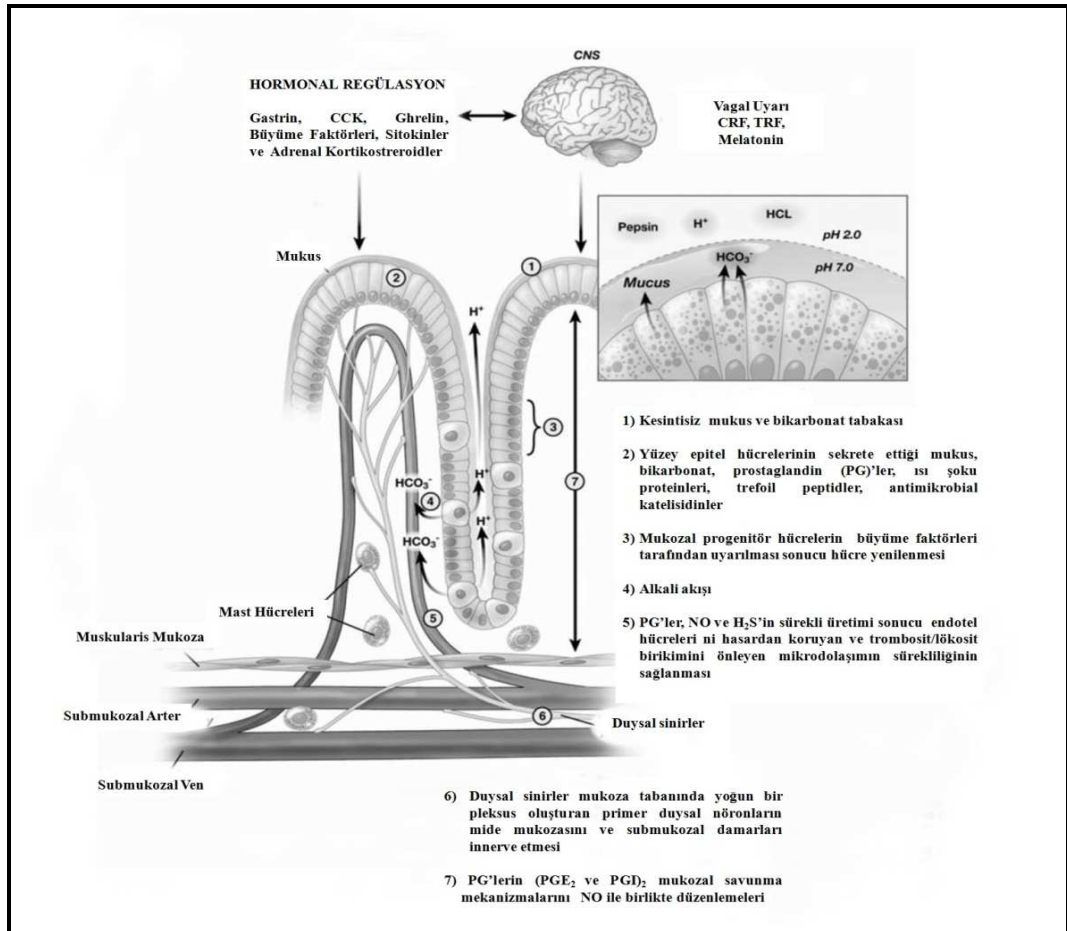
Mukozal savunmanın bir sonraki basamağı, yüzey epitel hücrelerinin oluşturduğu sürekli ve kesintisiz katmandır. Bu katmanı oluşturan epitel hücreleri, mukus-HCO₃⁻, PG'ler, ısı şoku proteinleri (HSP)'ler, trefol ailesi faktörleri (TFF)'ler ve katelisinleri salgılamaktadır. Yüzeylerindeki fosfolipidler nedeniyle hidrofobik olan epitel bariyer, asit ve suda çözünebilir zararlı ajanları uzak tutmaktadır [38]. Sıkı bağlantılar ile birbirine bağlanmış olan yüzey epitel hücreleri, asit ve pepsin'in geri difüzyonunu önleyici bir "bariyer" oluşturmaktadırlar [39, 42]. Yüzey epitel hücreleri gevşek bağlantılar aracılığı ile metabolik ve elektriksel iletişimi sağlarlar. Mide epitel hücreleri tarafından üretilmekte olan HSP'ler, artan sıcaklık, oksidatif stres ve sitotoksik ajanlar gibi stres faktörlerine yanıt olarak üretilmekte ve protein denatürasyonunu engelleyerek, hücreleri hasara karşı korumaktadırlar [43-44].

Epitel tabaka, progenitör hücrelerin iyi koordine edilmiş kontrollü proliferasyonu ile sürekli yenilenmektedir. Mukozal progenitör hücreler aracılığı ile olan sürekli hücre yenilenmesi, mukozanın yapısal bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır. Progenitör hücrelerin proliferasyonu büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Midedeki progenitör hücreler üzerinde bulunan en önemli büyüme faktörü reseptörü epitelyal büyüme faktörü reseptörüdür (EGF-R). Bu reseptörü aktive eden en önemli mitojenik büyüme faktörleri transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'dir. PGE₂ ve gastrin EGF-R aracılığı ile mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağını tetikleyerek hücre proliferasyonunu uyarırlar ve böylece trofik etkileri gerçekleştirmiş olur. Mide yüzey epitelinin tamamen yenilenmesi genellikle 3-7 gün sürerken, glandular hücrelerin yenilenmesi için gereken süre ise ayları bulabilir. Mide bezlerinde tek bir kök hücre bölünmeye uğrayarak progenitör hücreleri oluşturur. Bu hücreler farklılaşarak olgun epitel hücresi tiplerine dönüşmektedir [45]. Kök/progenitör hücre kümesi, proliferasyona ve farklılaşmaya uğrayan epitel hücreleri ve onları çevreleyen mezenşimal hücrelerden oluşmaktadır [46]. Mezenşimal hücreler büyüme faktörlerini üreterek mezenşimal hücreler ile epitel hücreler arasında çapraz iletişim ve sinyalizasyon sağlanmasına katkıda bulunmaktadırlar. Yüzeysel hasarlardan sonra yüzey epitelinin eski haline dönmesi, mide bezlerinin boyun kısmında bulunan ve korunmaya alınmış olan epitel hücrelerinin göçü ile dakikalar içinde gerçekleşmektedir. Bu hücre göçü öncüdür ve progenitör hücrelerin proliferasyonundan bağımsızdır. Progenitör hücre proliferasyonunun hasar oluşumundan saatler sonra gerçekleştiği bilinmektedir [47].

2.1.3. Endotel Hücre Bariyeri

Mide mukozasındaki preepitelyal faktörler ve epitel bariyere ek olarak, mukozal mikro damarların çeperindeki endotel hücreleri üçüncü savunma hattını oluşturmaktadır. Endotel hücrelerin oluşturduğu bariyerin mukozal savunmada ve özellikle hasardaki rolleri henüz tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte son dönemde konuyla ilgili çok sayıda yayın bulunmaktadır.

Sindirim sistemi mukozası da dahil olmak üzere, dokularda mikro damarlar (kapillerler, arterioller, toplayıcı venüller) aracılığıyla kan akımı dokunun bütünlüğünün ve fonksiyonunun sürdürülebilmesi için oldukça önemlidir [37, 48]. Mikro dolaşımın önemli olmasının sebebi, tüm dokulara besin ve oksijenin getirilmesi ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılmasının sağlanmasıdır [49]. Damar görüntüleme çalışmaları mide mukozası boyunca yoğun bir kapiler ağ bulunduğunu göstermiştir [50]. Mide mukozasında muskularis mukoza seviyesinde, kapiler mikro damarlar submukozal arterlerden dallanırlar. Lamina propria'nın üst bölümlerinde glandların proksimalinde ve toplayıcı venlere yaklaştığında, lamina proprianın lümenine en yakın bölgesinde mukozal savunmada önemli rolleri olan yüzey mukus hücreleri bulunmaktadır. Toplayıcı venüller kanı submukozal venlere taşırlar. Mikro dolaşımın, arteriyo-venöz şanta kayması durumunda ciddi mukozal hasar oluşumu gözlenir [51].



Şekil 2.1. Mide mukozal savunma mekanizmaları

Mikro damarlarda yaklaşık 0,5-1 µm kalınlığında tek katlı endotel hücre tabakası bulunmaktadır. Endotel tabakasını oluşturan hücreler çoğunlukla bazal membrana yapışık veya bazen de perisitler gibi mikro damarlara yapışık hücrelere bitişik olarak konumlanmıştır [52]. Endotel hücreleri sıkı bağlantı tipinde adezyon bağlantıları ile birbirine bağlanmakta, epitel bariyere benzer şekilde hücreler arası difüzyonu engelleyen endotel bariyerini oluşturmaktadırlar

Mikro damarlardaki endotel hücreleri sadece solütlerin, oksijenin, karbondioksit (CO₂)'in ve besinlerin geçişine izin vermekle kalmaz, aynı zamanda metabolik aktif bir organ gibi davranarak koagülasyonla ilişkili vazoaktif maddelerin, prostanooidlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin yapımını sağlamaktadır [53].

Mide endotel hücrelerinin karakteristik yapısı incelendiğinde bariyer boyunca madde transportu ile ilişkili çok sayıda pinositotik vezikül ve fenestraları içerdiği gözlenmiştir. Endotel hücrelerinin yapısında bulunan Weibel-Palade parçacıkları olarak isimlendirilmiş veziküller von Willebrand faktör gibi kan koagülasyonunda önemli rolü olan faktörleri, P-selektin gibi lökositlerin endotel yüzeyine tutunma ve ekstrasvasküler boşluğa çıkıp, hasar ya da enfeksiyon alanına göçlerini kolaylaştırıcı faktörleri içermektedir [54]. Weibel-Palade veziküllerinin diğer bileşenleri, kemokinler, interlökin 8 (IL-8) ve eotaksin-3, endotelin-1, anjiopietin-2 ve osteoprotegerindir. Sitokin uyarısına cevaben bu veziküllerin endotel hücrelerinin lümenal membranına yapışması ve içeriklerini hücre yüzeyine boşaltması, otokrin veya parakrin etkilere sebep olmaktadır [55].

Endotel hücreleri, kan basıncındaki değişimleri, oksijeni, hipoksiyi ve kan akımını henüz çok iyi anlayamamış mekanizmalarca algılayabilen hücrelerdir. Mikrovasküler endotel, oksijen besinler, PG'ler, lökotrienler, pro-koagulan faktörler NO, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast kökenli büyüme faktörü (bFGF), anjiopietin-2, endotelin, kollajenin spesifik tipleri ve plazminojen gibi pek çok maddenin transportunu kolaylaştırmakta ve etkin şekilde ilişki kurabilmektedir [53]. Uyarılmamış endotel normalde kandan madde difüzyonuna geçirimsizdir. Bu sayede damar lümeni ve damar etrafındaki doku arasında selektif bir bariyer görevi üstlenerek, dokunun sıvı, lökosit, besin ve metabolik atık değişimlerini regüle etmekte ayrıca, dolaşımdan gelebilecek patojenlere ve hasarlayıcı materyallere karşı dokuyu korumaktadır. Lokal uyarıya cevaben endotel hücreleri, endotelin ve lökotrien C4 gibi güçlü vazokonstriktör, NO ve prostasiklin (PGI₂) gibi güçlü vazodilatör özellikteki düz kas tonusunu etkileyen, vazoaktif maddeleri salgılamaktadır [56].

Endotel hücreler koruyucu fonksiyonlarını NO, PGI₂, prostaglandin E₂ (PGE₂), CO, doku plazminojen aktivatör (t-PA), VEGF ve bFGF faktörlerinin yapımına ve salınımına aracılık ederek gösterirler. Bu endotelyal mediyatörler, trombositlerin ve lökositlerin aktivasyonlarını azaltarak trombus oluşumunu engellemekte, trombolizisi destekleyip, doku perfüzyonunun devamlılığını sağlamakta ve mikrovasküler duvarı akut hasara karşı korumaktadırlar[57].

Endotel bariyeri lokal çevredeki değişimlere hızlıca adapte olabilmektedir. Yaralanma, enfeksiyon ya da zararlı uyarılar endotel hücrelerini aktive ederek onksiyonlarını değiştirirler. Histamin veya serotonin gibi faktörlerin etkisi altında endotel hücreleri aralarındaki sıkı bağlantılarını kaybederler. Endotel permeabilitesinin artması sonucu sıvı ve proteinler damar dışına lamina propria'ya difüze olur ve bu alanda ödem gelişir [58]. Hücreler arası bağlantıların hızlıca ve geri dönüşümlü şekilde yeniden organize olması birkaç dakika alır. Endotel permeabilitesinin en önemli regülatörü başlangıçta vasküler endotel permeabilite faktörü olarak tanımlanmış olan VEGF'dür. Pedram ve arkadaşları, VEGF'ün kültüre edilmiş vasküler aortik endotel hücre hattında Src, ekstraselüler sinyal ile regüle edilen kinaz (ERK), Janus Kinaz (JNK) ve fosfatidil inozitol 3 kinaz/AKT (PI3K/AKT) sinyal yolları aracılığı ile aktin ve zonula okludens-1 ve oklüdin gibi sıkı bağlantı proteinlerinin fosforilasyonunu ve yeniden düzenlenmesine sebep olarak, endotel hücre bariyer yapısının kaybolması sonucu vasküler permeabilite artışına sebep olduğunu göstermişlerdir [59].

Endotel hücrelerinin birbirlerine ve ekstraselüler matriks (ECM)'e tutunmaları, integrin, katherin gibi hücre adezyon molekülleri aracılığı ile olmaktadır. Vasküler endotel (VE) ve Katherin, endotel hücrelerinin hemen komşuluğundaki diğer endotel hücresi ile kalsiyum bağımlı etkileşimlerine aracılık etmektedir. Bu bağlantılar, endotel hücreler arasındaki sızıntı için mekanik bir bariyer oluşturmaktadır. VE-Katherin α , β , ve γ -Katenin ile etkileşime girerek bir kompleks oluşturur bu kompleks, hücre iskeletinin bileşenleri olan α -aktinin ve vinculin ile etkileşime girer Bu sayede VE-Katherin-Katenin kompleksi aktin hücre iskeleti ile bağlantılı hale gelir [60]. VE-Katherin VEGFR-2 ile ortaklaşa, PI3K/Akt bağımlı endotel hücrelerinin sağ kalım yolağını uyarırlar [61]. Ayrıca endotel hücreler yüzeylerindeki heterodimerik integrinler aracılığı ile ECM'e de tutunurlar. ECM proteoglikan ve glikoprotein komplekslerini içeren yoğun kollajen ve elastin ağıdır. İntegrinlerin ECM'e bağlanması fokal adezyon moleküllerini ve fokal adezyon kinaz (FAK)'ı aktive eder. Aktive olan FAK, Src ve diğer sinyal moleküllerini uyarır. Endotel hücreler için diğer sağ kalım sinyalleri VEGF ve reseptörü VEGFR-2 aracılığı ile ve angiopoietin-1 ve reseptörü Tie-2 aracılığı ile oluşturulmaktadır. VEGF ve angiopoietin-1'in her ikisi de endotel hücrelerin ECM'den kopmaları durumunda apoptozisten kaçışına (anoikis) olanak sağlar. NO, PGE₂, PGI₂, VEGF, bFGF ve ghrelin endotel hücrelerinin korunmasında ve sağ kalımında önemli rolleri olan ajanlardır [33, 62-63].

Sitoplazmada sağ kalım sinyalleri VEGF tarafından ve PI3K/AKT ve ERK1/2 yolları aracılığı ile başlatılır [64]. Ayrıca düşük konsantrasyonda reaktif oksijen türlerinin endotel hücrelerinin korunmasında ve sağ kalımında rolü olduğu gösterilmiştir [65]. ROS üretimi, endotel hücre sinyalizasyonunu ve hücrenin hipoksiye karşı yanıtını belirlemektedir [66]. Endotel hücrelerindeki mitokondri, özellikle sitokrom C oksidaz (CcO) kompleksi oksijen tüketiminin, oksidatif fosforilasyonun ve ATP üretiminin merkezidir. NO'in CcO aktivitesini regüle ettiği gösterilmiştir. Yüksek oksijen konsantrasyonunda CcO okside durumdadır, oksijeni tüketir ve NO'ı metabolize eder. Düşük oksijen konsantrasyonlarında ise CcO indirgenmiş durumdadır ve O₂ ve NO CcO'a bağlanmak için yarışır ve NO metabolize edilemez ve birikir [67].

2.1.4. Midede Mikrovasküler kan Akımının Regülasyonu ve Haraplayıcı Faktörlere Karşı Kan Akımı Yanıtı

NO ve PGI₂ gibi güçlü vazodilatör ajanlar, mide mukozasını çeşitli irritan maddelere ve lökotrien C₄, tromboksan A₂ ve endotelin gibi güçlü vazokonstriktörlerin mukozayı hasarlayıcı etkilerine karşı korumaktadır [68]. Mide mukozası irritana maruz kaldığında ya da asit geri difüzyonu olduğunda, lümendeki HCl/irritanı ortamdaki uzaklaştırmak ya da dilüe etmek amacıyla mukozal kan akımında hızlı ve belirgin bir artış görülür. Bu hiperemik yanıt en önemli mukozal savunma mekanizması olup, mekanik olarak kan akımının kesintiye uğraması nekroze sebeptir. Holzer bu hiperemik yanıtın sorumlu mekanizmaları karakterize etmiş ve bu yanıtın duysal afferent sinirler aracılığı ile geliştiğini göstermiştir [69-71]. Geniş submukozal damarlara yakın bulunan gastrik duysal sinirler CGRP ve substance P gibi nörotransmitterleri salgırlar. Duysal afferent sinirlerin kronik ve yüksek doz kapsaisin tedavisi ile hasarlanması, hiperemik yanıtı bozmakta ve mide mukozasının hasara karşı hassasiyetini artırmaktadır [69-70].

2.1.5. Nörohormonal Koruma Mekanizmalarının Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi

Mukozal savunma mekanizmalarının duysal innervasyon, vagal stimülasyon, CRF, tirotropin-salgılatıcı faktör (TRF), melatonin, gastrin, kolesistokinin (CCK), ghrelin, adrenal kortikosteroidler sülfidril ve büyüme faktörleri (EGF) tarafından regüle edildiği bilinmektedir.

Duysal liflerin çeşitli uyarıların oluşturduğu hasara karşı koruma ile ilişkili olduğu ve bu koruma mekanizmasında kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP)'nin potansiyel bir mediyatör olduğu bilinmektedir [72-73]. CGRP, kapsaisine duyarlı duysal liflerden salınan, gastrointestinal sistemde geniş yayılım gösteren bir nörotransmitterdir. CGRP'nin sentezi ve salınımı, transient reseptör potansiyel vanilloid1 (TRPV1) tarafından regüle edilmektedir [74]. TRPV1, kapsaisine olan yüksek duyarlılığından dolayı kapsaisin reseptörü olarak da bilinmektedir. Adenozin, substance P ve asetilkolin gibi güçlü vazodilatör ajanlardan 100 -1000 kat daha güçlü vazodilatasyona sebep olduğu bilinen CGRP [75], mide mukozasındaki koruyucu etkisini, mukozal kan akımını düzenlemek, mide asit sekresyonunu inhibe etmek, hücre apoptozisini ve oksidatif hasarı engellemek yolu ile göstermektedir [54-55].

Merkezi vagal stimülasyon, sıçan midesinde mukus üretimini ve yüzey hücrelerde hücre içi pH düzeyini artırmaktadır [76]. Merkezi CRF'nin ve periferik CRF-ilişkili mekanizmaların sindirim sistemi motilitesi ve mukozal fonksiyonlarda stresin neden olduğu değişimlerde etki olduğu bilinmektedir [77-78]. CRF2 reseptörünün insan midesinde bulunduğu ve apoptozisi inhibe ederek koruyucu bir rol üstlendiği rapor edilmiştir [77]. CRF'nin ya da ürokortin'in periferik enjeksiyonunun mide boşalımını ve motilitesini CRF2 reseptörleri yoluyla inhibe ettiği, bunun tersine, periferik olarak verilen CRF antagonistlerinin stresin neden olduğu gecikmiş mide boşalımını engellediği gösterilmiştir.

Glukokortikoidlerin mukozal savunmayı kolaylaştırıcı rolü olduğu [79-81] ve stres esnasında miktarı artan kortikosteronun, strese karşı üretilen hormonal cevabın güçlü bir koruyucu bileşeni olduğu bilinmektedir [82]. Glukokortikoidlerin koruyucu

etkilerinin; glukoz homeostazisini, mide kan akımını ve mukus sekresyonunu sürdürebilmesi ve ayrıca artmış mide motilitesini ve mikrovasküler permeabiliteyi azaltması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [81]. Spesifik bir glukokortikoid reseptörünün antagonistinin (RU-38486) uygulanması stres kaynaklı lezyonların şiddetini artırırken, stres sırasında glukokortikoidlerin midedeki koruyucu rolünü destekler niteliktedir [79].

Ghrelinin, NO üretimi ve duysal afferent sinirlerin kapsaisin ile stimülasyonu yoluyla mide mukozal kan akımını artırarak, mukozayı koruyucu ve hasarları iyileştirici rol üstlendiği periferal etkilerinin de olduğu bilinmektedir [82].

2.1.6. Prostaglandinlerin Mide Mukoza Bütünlüğünün Korumasındaki Önemi

PG'ler arasıdonik asitten COX enziminin 2 farklı izoformu (COX-1 ve COX-2) aracılığı ile üretilmektedir [56-57]. PG'lerin sindirim sisteminin tamamında asit sekresyonu, HCO₃⁻ sekresyonu, mukus yapımı, mukozal kan akımı, motilite gibi önemli fonksiyonlarda rolleri olduğu ayrıca, PG uygulamasının mide mukozasını stres, nekrotize edici ajanlar, steroid olmayan anti inflamatuvar ajanlar gibi ülserojenlere karşı koruduğu bilinmektedir [59].

Mukoza bütünlüğünün devamlılığının sağlanmasında ve sindirim sisteminin sistemin çeşitli fonksiyonlarında önemli rolleri olan endojen PG'ler hücre içi etkilerini her biri G proteini ile eşleşen 4 farklı reseptör aracılığı ile oluşturmaktadır. EP1'den EP4'e kadar sınıflandırılmış olan bu reseptör alt tiplerinin dağılımı PG'lerin sindirim sisteminde ve diğer dokulardaki farklı, çoklu etkilerini açıklamaktadır. Prostanoid reseptörlerinden yoksun fareler ile yapılan çalışmalarda EP reseptörü alt tiplerinin gastrointestinal koruma ve iyileşme süreçleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [60-61].

PGE₂ sindirim sisteminde en etkili olan PG tipidir. PGE₂'nin asitin sebep olduğu özofajit, etanol ve indometazine karşı hücre koruyucu etkili olduğu bilinmektedir. PGE₂'nin bu etkileri EP1 reseptör agonistleri tarafından taklit edilebilirken, indometazin gibi hafif iritanlara karşı oluşturulan adaptif hücre koruyucu yanıt EP1 reseptör antagonisti uygulaması ile azalmaktadır. PG'lerin kapsaisin aracılı koruma mekanizmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Kapsaisin aracılı koruma mekanizmasının, indometazin uygulaması veya duysal liflerin kesilmesi ile azaldığı gözlenmiştir. Kapsaisine duyarlı duysal liflerin kesilmesinin midedeki PGE₂ seviyesini azaltmadığı veya bu liflerin kapsaisin ile uyarılmaları halinde midedeki PGE₂ seviyesinin artmadığı, koruyucu etkinin endojen PGE₂ tarafından sağlandığı belirtilmiştir. Benzer şekilde, PGE₂'nin EP1 reseptöründen yoksun farelerde hücre koruyucu rolünü gösteremediği, ancak bu hayvanlarda kapsaisinin indüklediği korumanın gözlemlendiği rapor edilmiştir.

EP3 reseptöründen yoksun hayvanlarda asit perfüzyonu duodenumda hasara yol açmaktadır. PGE₂'nin indometazin ile indüklenen bağırsak hasarındaki koruyucu etkisi EP3 ve EP4 reseptör agonistleri ile taklit edilebilmektedir. PGE₂'nin mide ülserlerinde ve intestinal lezyonlarda iyileşmeyi artırıcı etkisi EP4 reseptörü aracılığı ile olmaktadır.

PGE₂'nin mide, duodenum ve ince bağırsaktaki koruyucu etkilerinin mekanizmasında farklı reseptör alt tipleri yer almaktadır. PGE₂ mide koruyucu etkisini EP1 reseptörü aracılığı ile mide kontraksiyonlarını inhibe ederek ve mukus sekresyonunu uyararak göstermektedir. Duodenumdaki koruyucu etki ise PGE₂'nin EP3/EP4 reseptörleri aracılığı ile duodenal HCO₃⁻ sekresyonunu stimule etmesi ile açıklanmıştır. PGE₂'nin bağırsak koruyucu etkisi EP4 reseptörü aracılıdır. PGE₂ bağırsakta intestinal kontraksiyonları inhibe ederek bakteriyel invazyonu baskılamakta ve EP3/EP4 reseptörleri aracılığı ile mukus sekresyonunu artırmaktadır. Ülser iyileşmesini uyarıcı etkisi ise VEGF ekspresyonunu artırarak anjiyogenezi stimule etmesine bağlanmıştır. Ekzojen PGE₂ hücre koruyucu etkisini EP1 reseptörü aracılığı ile göstermekte ve bu etki EP1 antagonisti olan ONO-AE-829 kullanımı ile tamamen bloke edilmektedir [63]. Hafif iritanların midede endojen PGE₂ yapımını uyardığı ve adaptif hücre koruma yanıtı oluşumuna katıldığı bilinmektedir. Bu etki EP1 reseptör antagonisti ile bloke edilmesinin yanı sıra indometazin ile de bloke edilmektedir.

İndometazin gibi steroid olmayan anti inflamatuvar ilaçlar midede ciddi hasara sebep olmaktadır. Bu ilaçlar COX aktivitesini inhibe ederek endojen PG yokluğuna sebep olmaktadır. PG yokluğu mide mukozası için majör patojenik faktördür. PGE₂'nin indometazin ile indüklenen mide mukozal hasarına karşı koruyucu rolünü EP1 reseptörü aracılığı ile yaptığı gösterilmiştir [63].

2.1.7. Endojen NO'in Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi

NO ikincil haberci olarak kabul görmüş, tüm sistemlerde özellikle kardiyovasküler ve gastrointestinal sistemlerde vazodilatör etkili, gaz yapısında bir moleküldür. NO'in enzimatik biyosentezi ve biyoyararlılığı NO sentezinden sorumlu olan NOS izoformlarının ekspresyonları ve aktiviteleri ile kontrol edilmektedir. Vazodilatasyon büyük bir kısmı NO bağımlı olarak gerçekleşen önemli bir inflamatuvar sinyaldir. Güçlü vazodilatör ajanlar olarak bilinen histamin ve bradikininin neden olduğu vazodilatasyonun mekanizmasında da endotelden salınan NO bulunmaktadır [64].

Yarı ömrü sadece birkaç saniye olan NO, endotel hücrelerinin lüminal ve bazolateral kısımlarından difüze olabilir. Düz kasa difüze olan NO, solubl guanilat siklazı aktive eder. Bu aktivasyon, düz kas hücrelerinde cGMP artışına sebep olur. NO, oksihemoglobin ile etkileşime girerek hızlıca inaktif hale gelir.

NO, mukoza bütünlüğünün korunması ile ilgili önemli bir mediyatördür. Wang ve arkadaşlarının çalışmalarının sonuçlarına göre, mukozada normal koşullarda hasar oluşumuna sebep olmayan hafif iritanlar, indometazin uygulamasına benzer şekilde, nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olan L-NNA uygulamasını takiben midede lezyon oluşumuna sebep olmuşlardır. Bu sebeple, NO adaptif hücre koruyucu mekanizma ile ilişkilendirilmiş, NO'nun adaptif hücre koruyucu mekanizmaya katkısının endojen PG'ler aracılı olduğu düşünülmüştür [33].

Son yıllarda yapılan çalışmalar NO'in pek çok fizyolojik bileşiğin koruyucu etkisine aracılık ettiğini göstermektedir. Melatonin gibi hipofiz bezinin önemli endokrin salgıları, etanol veya aspirin gibi mukozal hasar oluşumuna sebep olan

ajanlara karşı PG'lerden bağımsız bir mekanizma ile NO/NOS sistemini aktive ederek güçlü mide koruyucu etki göstermektedirler. Melatoninin mide mukozası için koruyucu etkisi, stres karşıtı etkisi ve ülser iyileşmesine katkısı sadece güçlü antioksidan özelliği ile ilişkili değildir. Melatonin, antioksidan özellikte bir bileşen olmasının yanı sıra, mikrodolaşımı PG'lerden bağımsız şekilde NO/NOS sistemini aktive etmek sureti ile uyarmaktadır. Ayrıca, melatoninin, kapsaisine duyarlı afferent duysal sinirlerden olan CGRP salınımını uyardığı da gösterilmiştir [65, 67].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, özellikle leptin, ghrelin ve oreksin gibi bazı hormonların mide mukozasının savunma mekanizmaları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. İntraperitoneal ya da intraserebral ghrelin uygulamasının, etanol ya da iskemi/reperfüzyonun neden olduğu mide hasarını hafiflettiği, bu koruyucu etkinin L-NAME uygulaması ile ve fonksiyonel duysal afferent liflerin kesilmesi sonucu ortadan kalkması nedeni ile gerek vasküler endotelden salınan, gerek duysal afferent liflerden salınan NO'nun, iştah hormonlarının mide koruyucu etkisinde en önemli mediyatör olduğunu doğrulamaktadır [69]. Özellikle hasar alanında ghrelin mRNA'sında belirgin artış olması bu hormonun lokal etki göstererek NO/NOS sisteminin aktivasyonu gibi çeşitli koruyucu mekanizmaları aktive etmek sureti ile mukozal toparlanma/iyileşme sürecine katılıyor olabileceğini düşündürmektedir [66].

2.1.8. Endojen H₂S'in Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi

Uzun zaman boyunca endüstriyel kirlilik, çevresel bir toksin olarak nitelendirilen H₂S günümüzde vücut tarafından üretilen, pek çok organ ve dokuda önemli fonksiyonlara etki eden gaz mediyatör olarak nitelendirilmektedir [70].

H₂S sindirim sisteminde güçlü anti-inflamatuvar etkiler göstermektedir. Kan akımı, düz kas tonusu, epitel hücre sekresyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunmakta ve ülser iyileşmesini teşvik etmektedir. H₂S'in pek çok etkisi, fizyolojik önemi açıklığa kavuşmadan önce H₂S ile benzer şekilde kirlilik ve toksin olarak tanımlanmış bir diğer gaz mediyatör olan NO ile örtüşmektedir [71].

H₂S, NO ile benzer şekilde mide mukozası savunmasının önemli bir mediyatörüdür [71]. Endojen H₂S sentezinin inhibe edilmesi, NSAID'a karşı mide mukozasının hassasiyetini artırmaktadır. Diğer yandan ekzojen H₂S donörlerinin mide mukozasının hasara karşı direncini artırdığı gözlenmiştir. Mide mukozasında hasarlanmayı takiben sentezi artan H₂S hasarlı dokunun iyileşmesini destekler [72]. Deneysel modellerde H₂S donörü uygulaması ülser iyileşmesini hızlandırmaktadır. Mard ve arkadaşları, iskemi reperfüzyon uygulamasından hemen önce H₂S uygulamasının doza bağlı şekilde mideyi iskemi reperfüzyonun sebep olduğu hasardan koruduğunu göstermişlerdir. Aynı koruma H₂S öncülü L-sistein verilerek de sağlanmıştır. Endojen H₂S sentezinin propargylglycine ile baskılandığında mide hasarında aşırı artış gözlenmiş olması, mukozası bütünlüğünün korunmasında H₂S'in esas rolü üstlendiğini göstermektedir. H₂S uygulamasının mide hasarını azalttığını gösteren Mard ve arkadaşlarının çalışmasında, H₂S'in bu etkisi, HCO₃⁻ sekresyonu, mukozal kan akımı gibi mukozal savunma mekanizmalarının bileşenlerine bağlanmıştır [83].

İskemi reperfüzyon hasarının patogeneğinde en önemli olaylardan biri lökositlerin vasküler endotele aderensidir. Bu olay, iskemik periyot sonrasında azalan doku perfüzyonunun azalmasına sebep olmaktadır. H₂S'in koruyucu etkisinin, NO gibi vasküler endotele lökosit aderensini baskılayıcı etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Post kapiler venüllerde H₂S'in etkisi ile post iskemik lökosit aderensinin azalması sonucu kan akımının daha az bozulacağı, buna bağlı olarak, daha az doku hasarı oluşumu gözlenebileceği rapor edilmiştir [74].

2.1.9. Endojen CO'in Mide Mukoza Bütünlüğünün Korunmasındaki Önemi

2.1.9.1. Hemoksijenaz Sistemi

Hemoksijenaz (HO) hem katabolizmasında, serbest hemin oksidatif yıkımını katalizleyerek, biliverdin (BV), serbest demir ve CO'e ayrıştıran, bu sayede hücre içi hem seviyelerinin regülasyonunda merkezi rolü olan hız kısıtlayıcı bir enzimdir. Hem katabolizması sonucu oluşan BV, biliverdin redüktaz (BVR) aracılığı ile bilirubin (BR)'e metabolize olur [84]. Serbest demir ferritin tarafından tutulur. Hem degradasyonu aracılığı ile üretilen CO ve BV'in koruyucu olduğu, aşırı CO ve BV birikiminin potansiyel toksik etkileri olabileceği bildirilmiştir.

HO sistemine ait, HO-1, HO-2 ve HO-3 olmak üzere 3 farklı HO izoformu bulunmaktadır. HO izoformları farklı genlerin ürünü olup, dokulara göre dağılımları ve ekspresyon modelleri birbirinden farklıdır [85].

HO-1 32-kDa ağırlığında, stres proteinleri süper ailesinin bir üyesi olup indüklenbilir HO izoformudur. Pek çok doku ve hücrede bu proteine ait bazal ekspresyon seviyelerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Sadece substratı olan hem tarafından değil, aynı zamanda UV ışık, lipopolisakkarit (LPS) gibi oksidatif stres uyaranları, hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türevleri, vazo aktif bileşenler, sitokinler belirgin HO-1 artışına sebep olmaktadır. HO-1'in diğer güçlü uyaranları arasında ağır metaller, sülfidril reaktif ajanları ve hipoksi sayılabilir. HO-1'in indüklenmesi, genellikle oksidatif stresin toksisitesine karşı oluşturulan adaptif hücre koruyucu yanıt olarak değerlendirilmektedir [86].

HO-2 ise 36-kDa ağırlığında bir protein olup, temel HO izoformudur ve sürekli eksprese olmaktadır. Dokulara göre ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, beyin ve testis dokusunda yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. HO-2 ekspresyon düzeyi metabolik veya reseptör aracılı uyaranlar ile regüle edilmemektedir [87]. HO-3 ise son klonlanan HO izoformu olup, insanlarda ekspresyonu yoktur.

HO-1 ve HO-2 hemin alfa-meso karbon köprüsünü kırarak hemini ayrıştırır. Bu ayrıştırma, bakır protoporfirin (Zinc protoporphyrin, ZnPP) ya da kalay protoporfirin (Tin protoporphyrin, SnPP) gibi çeşitli metalloproteinler tarafından inhibe edilir.

HO enzim aktivitesinin spesifik olarak arttığı durumlarda, kompleman bağımlı inflamasyonun azaldığı gözlenmiştir[88]. HO-1'den yoksun farelerde

sadece kronik inflamasyon gelişimine değil, aynı zamanda klasik proinflamatuvar mediyatör olan endotoksin ile indüklenen deneysel sepsise karşı aşırı hassasiyet gözlenmiştir. HO-2'den yoksun farelerde ise bağışıklık yanıtının sağlam olduğu gözlenmiş, fakat merkezi ve otonom sinir sistemlerinde gelişimsel defektlere rastlanmıştır [89].

HO sistemine ilginin sebebi, yüksek derecede oksidatif olan hemi parçalayarak hücre içi hem metabolizmasını regüle etmesi olsa da, son zamanlarda yapılan çalışmalar, Hem/HO sisteminin ve altındaki efektör bu sistemde yer alan moleküllerin, hücresel strese temel adaptasyon cevabı, hücre korunması, apoptozis ve inflamasyon gibi pek çok fizyolojik ve pato-fizyolojik süreçlerin regülasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Hemoksijenaz-1

HO-1 ekspresyonu transkripsiyonel olarak, çok sayıda farmakolojik ajan tarafından, aynı zamanda ısı şoku proteinleri, hücre içi veya hücre dışı stres gibi durumlarda da uyarılmaktadır. İnsan hücrelerinde HO-1 ekspresyonu termal stres, hipoksi ya da interferon gama tedavisi uygulanırken baskılanır. Bu baskılanma, zararlı HO-1 yapımını engelleyici bir regülasyon mekanizmasıdır [90].

HO-1 ekspresyonu ile ilişkili çok sayıda transkripsiyon faktörü ve sinyal molekülü tanımlanmıştır. Bu moleküller arasında MAPK'lar, nükleer faktör E ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), Bach1 (bric-a-brac, tramtrac and broad complex and cap'n' collar homology 1), protein kinaz C (PKC), protein kinaz A (PKA), PI3K/ Akt, aktivatör protein-1 (AP-1) nükleer faktör kappa B (NF-kB), siklik adenosin monofosfat yanıt elementini bağlayan protein (CREB), redüktaz (BVR), aktive transkripsiyon faktörü-2 (ATF-2) sayılabilir. Bu moleküller arasındaki etkileşimin sonucu olarak HO-1 ekspresyonu gerçekleşir.

HO-1 yapımına neden olan en az 1 veya daha fazla kinazı (MAPKs, PKC, PKA) ya da transkripsiyon faktörlerinden birini (NF-kB, Nrf-2, CREB) aktive eder. Normal şartlar altında, transkripsiyon faktörleri sitozolde ya da nükleusta bulunmaktadır. Uyarıyı takiben transkripsiyon faktörlerinin aktive olan formları, nükleusa transloke olur ve hoc-1 geni transkripsiyonuna yol açan spesifik DNA sekansına bağlanır. Normal şartlar altında Bach1/small MAF kompleksi hoc-1 gen promoteri olan MARE' ye sürekli bağlanarak, hoc-1 gen'i transkripsiyonunu inhibe eder. Serbest hem ya da reaktif oksijen türleri (ROS)'ne cevaben, Nrf2, Keap1 ve Bach1 etkileşir. Bach1 nükleustan çıkarak, ubiquitinlenir ve parçalanır. Bu sayede transkripsiyonel baskılama durur. ROS, Keap1 ubiquitinasyonuna neden olur, ubiquitinlenen Keap1 parçalanır, böylece nükleusta Nrf2 birikimine izin verilmiş olur. Nrf2/small MAF kompleksi MARE' ye bağlanır ve hoc-1 geni transkripsiyonunu uyarır.

Hemoksijenaz-1 ve Anjiyogenez

Vasküler sistemin gelişimi, bir grup kemik iliği kökenli hücre ile başlar. Bu hücreler, damarların ilk damar pleksusunu şekillendirirler, bu sürece vaskülogenezis denir. Hemen devamında, endotel hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu ile tüp benzeri yapılar oluşturmaları sonucu yeni damar oluşumu

gözlenir. Bu olayın tamamına anjiyogenez denir. Yeni damarlar oluşurken, endotel tabaka doku ve kan arasında, kandan tüm hücrelere besin ve oksijen geçişinin kontrolünü sağlayabilecek önemli bir ara yüz oluşturur. Endotel hücreleri oksijen gerimine, HO-2 ve endoteliyal nitrik oksit sentaz (eNOS) gibi çeşitli oksijen algılayıcı mekanizmalar aracılığı ile adapte olmaktadır [91]. Oksijen algılayıcı mekanizmalar, damar yapımını endotel hücrelerin akıbetinden, vaskülogenez ve anjiyogeneze kadar çeşitli seviyelerde regüle ederler.

HO-1 indüksiyonu, anjiyogenez için kritik bir olaydır. HO-1'in katalitik reaksiyonu sonucu sentezlenen CO, hem gelişimsel hem de patolojik anjiyogenezde temel faktör kabul edilen VEGF ile IL-8 ve stromal hücre kökenli faktör-1 (SDF-1) gibi anjiyogenik mediyatörlerin yapımını indüklerken diğer taraftan, solubl VEGF1 reseptörü, solubl endoglin gibi antianjiyogenik mediyatörlerin yapımını azaltır. Sonuç olarak endotel hücre proliferasyonu, migrasyon ve anti-apoptotik yanıt gelişir [92-93]. BV'in, insan keratinosit hücrelerinde, VEGF, IL-8 gibi pro-anjiyogenik faktörleri stimüle ettiği gösterilmiştir.

Genetik ve gen transferi çalışmaları, HO-1'in anjiyogenez ve endotel disfonksiyonundaki farklı rollerini aydınlatmıştır. Genetik olarak HO-1'in aşırı eksprese edilmesi, VEGF sentezini ve vasküler kapiler damar oluşumunu artırmakta, iskemik dokularda kan akımını düzeltmektedir. Bu etki HO aktivitesinin ZnPP ile inhibe edilmesiyle tamamen ortadan kalkmaktadır. Bir başka araştırma grubunun çalışma sonuçlarına göre, VEGF'nin endotel hücrelerinde HO-1'i indüklediği ve bu indüksiyonun VEGF aracılı anjiyogenezde elzem olduğu, HO-1 aktivitesi SnPP veya ZnPP ile inhibe edildiğinde kan damarı oluşumunun tümüyle ortadan kalktığı gösterilmiştir [94]. HO-1 yoksunu farelerde, endotel hücrelerin buldukları ortamdan hasar alanına göçlerinde böylece tamiri kolaylaştırmada rol alan, bir kemokin olan SDF-1'e cevaben, kapiler filizlenmeyi yapamadıkları, bu eksikliğin karbon monoksit salgılatıcı molekül (CORM) tedavisi ile tamamen düzeltildiği gösterilmiş, HO-1'in VEGF ve SDF-1 aracılı anjiyogenez, vasküler remodeling ve yara iyileşmesindeki fonksiyonel önemi doğrulanmıştır [95-96].

Anjiyogenez prenatal ve postnatal dönemlerde görülmektedir. Fonksiyonel HO-1 geninden yoksun farelerde düşük sağ kalım gözlenirken (%20) [97], fonksiyonel VEGF yoksun fare embriyolarında embriyonik gelişimin 8,5 veya 9,5. günlerinde ölüm gözlenmiştir [98] Bu bulguya ek olarak, tavuk embriyosunda VEGF tedavisinin embriyonel gelişim sırasında anjiyogenezi ve HO-1 ekspresyonunu artırdığı gözlenmiş, bu etki HO inhibitörü mezoporfirin ile anlamlı derecede azaltılmıştır [99]. Bu verilerden yola çıkarak, VEGF ve HO-1 in prenatal anjiyogenezde karşılıklı etkileşimleri olduğu ve öne sürülmüştür.

Diğer yandan HO-1 aktivitesi SnPP ile inhibe edildiğinde ya da genetik olarak HO-1 yoksunluğu yaratılan yetişkin hayvan modellerinde, yaralı dokularda yeni damar oluşumu baskılanmakta, yaranın kapanması gecikmektedir [100]. Bu veriler HO-1'in postnatal yeni damar oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Tüm bu bulgular, HO-1 yolağının prenatal ve postnatal

anjyogenez sürecine katıldığıının göstergeleri olarak kabul edilmektedir.

Hemoksijenaz-1 ve Endotel Hücreler

Endotel, periferel kan akımı ve inflamasyonlu doku arasında bariyer vazifesi gördüğü için inflamatuvar reaksiyonların regülasyonunda merkezi roldedir. Endotel tabakası nötrofiller ya da T lenfositler gibi immünolojik olarak aktif kan hücrelerinin inflamasyon alanına geçişlerini regüle etmektedir [101]. Hayashi ve arkadaşları, polimorfonükleer lökositler ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimi HO-1'in regüle ettiğini rapor etmişlerdir. Hayashi ve grubu, sıçanda deneysel oksidatif stres modelinde, artmış HO enzim aktivitesinin mikro damar endotelinde lökosit adezyonunu azalttığını göstermişlerdir [102]. Farklı araştırma gruplarının verilerine göre, endotelial HO-1 aktivitesi, deneysel inflamasyon modelinde, spesifik olarak, inflamasyon bölgesine lökosit birikimini modüle etmektedir [103]. Streptozotocin ile indüklenmiş deneysel diyabet modelinde HO-1'in aşırı yapımı oksidatif strese bağlı olarak gelişen endotel hücre hasarını azaltmaktadır [104]. HO-1'in anti-inflamatuvar endotel koruyucu etkisinin, HO-1'in, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α)'nın indüklediği çeşitli adezyon moleküllerini azaltma özelliğinden kaynaklanıyor olabileceği öne sürülmüştür.

Hemoksijenaz-2

Fizyolojik şartlar altında HO-2 ekspresyonu pek çok dokuda özellikle testis ve beyinde gösterilmiştir. HO-2 ekspresyonu transkripsiyonel olarak kortikosteroidler tarafından modüle edilebilir ancak HO-1 ekspresyonunu belirgin şekilde artıran çevresel stres tarafından modüle edilemez [87]. Göreceli olarak sabit ekspresyon seviyesinde olan HO-2 aktivitesinin protein fosforilasyonu gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlar aracılığı ile dinamik olarak regüle edildiği rapor edilmiştir. HO-1'den farklı olarak HO-2, 3 adet sistein rezidüsü içermektedir. Her bir sistein rezidüsü, sistedin dipeptidi ve prolin içermekte ve hem bağlayıcı bölge olarak fonksiyon göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı HO-2'nin hücre içi hem seviyesinin düzenlenmesine aracılık ettiği kabul edilmektedir [90].

HO-2'nin bir diğer özelliği oksijen sensörü olmasıdır [105]. Ayrıca, HO-2'nin endotel hücre homeostazisinde rol aldığı bilinmekte, HO-2'den yoksun farelerde oksidatif stres, inflamasyon ve anjyogenez durumlarında aşırı endotel hücre aktivasyonu tespit edilmiştir [106]. Yine HO-2 yokluğu, HO-1 yapımında bozulmalara sebep olmakta ve antijen ile oluşturulan deneysel peritonitte akut inflamatuvar yanıtın sonlandırılmasını ve onarıcı yanıtın oluşumunu engellemektedir [107]. HO-2 'den yoksun olan farelerin HO-2 kayıplarını HO-1 ekspresyonlarını artırarak kompanse edemedikleri gözlenmiştir [108]. Bu durum, HO-2'nin HO-1 ekspresyonu için önemli olduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır.

2.1.9.2. Hem Katabolizmasının Ürünleri

HO sisteminin koruyucu etkileri pek çok deneysel modelde doğrulanmış fakat koruyucu etkilerinin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Hem, biyolojik sistemlerdeki pek çok enzimin temel prostetik grubu olsa da,

hücre içinde proteinlerden ayrıldığında, yapısı, gereği hücre için tehlikeli olmaktadır. Serbest hem'in aşırı hidrofobik yapısı bu molekülün hücre membranına girişine izin verir, bu durum hücrenin oksidan aracılı hasara karşı daha hassas olmasına ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa sebep olur. Aktif lökositler tarafından yapılan H₂O₂, hücre membranında bulunan hemin yapısındaki hem halkasını ayırır ve hücre içinde ROS yapımını katalizleyen serbest redoks aktif demir salınır [84, 109]. Bu durumda serbest hemin HO tarafından parçalanması doku korumasında ilk adımdır. Hem katabolizmasının ürünleri CO, ferröz demir, BV ve BR olarak tanımlanmıştır.

CO toksik bir gaz olarak bilinse de, son dönemde yapılan çalışmalar CO'in önemli bir sinyal molekülü olduğunu göstermektedir [110]. Fizyolojik dozdaki CO'in hücre içi sinyal süreçlerinde anti-inflamatuvar, antiproliferatif ve anti-apoptotik etkilerinin yanı sıra [111], nörotransmisyon, koagülasyon, vazodilatasyon gibi önemli fizyolojik olaylara aracılık ettiği gözlenmiştir [112-113].

CO, NO ile benzer şekilde, solubl guanilat siklaz (sGC)'in hem kısmına bağlanır. Bu bağlanma sGC'in uyarılmasına ve devamına cGMP seviyelerindeki artışa ve koruyucu vasküler relaksasyona sebep olur [110]. CO, sGC'a bağlandığı gibi diğer hemoproteinlerin de hem kısımlarına bağlanarak bu proteinlerin enzimatik aktivitesini etkiler. Bu şekilde CO'in COX aktivitesini stimule ettiğine dair bilgiler mevcuttur [114]. Sıçan hipotalamusunda ve sıçan hipotalamik astrosit kültüründe, HO'ın substratı olan hemin, COX enzimini uyararak PGE₂ yapımını stimule ettiği, bu etkinin HO inhibitörü olan mezoporfirin-IX ve CO süpürücüsü olan hemoglobin tarafından engellendiği gösterilmiştir [115].

CO, MAPK aracılı proinflamatuvar sitokin üretimini azaltarak anti-inflamatuvar doku korunmasını sağlar. CO'in anti-apoptotik ve antiproliferatif etkileri MAPK yollarının modülasyonu ile ilişkilendirilmiştir [116-117].

CO'in koruyucu etkisinin yanı sıra zararlı etkisi de olabilir. Hücre tipine, CO konsantrasyonuna ve dokuya spesifik sinyal iletim yollarına bağlı olarak değişmektedir [109]. CO, sıçan hipotalamusunda ve hipotalamik astrosit kültürlerinde COX' u aktive ederek, proinflamatuvar PG yapımını artırmaktadır. CO'in hücresel antioksidan seviyesini azalttığı, mitokondriyal ROS üretimini, kompleks IV' deki sitokromlara bağlanarak artırdığı bu sayede oksidatif hücre hasarı oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir [118-119].

Demir HO enziminin hem'i parçalaması sonucu oluşan üründür. Ferröz demir redoks bağımlı enzim reaksiyonlarının temel bileşeni ve aşırı derecede prooksidatif bir moleküldür. Serbest hem katabolizması sonucu oluşan demirin sebep olduğu toksisiteye karşı koruyucu mekanizmada kilit rol, hücre içinde eksprese olan, hücre içi demiri etkili şekilde ayırarak ferröz demirin prooksidan kapasitesini sınırlamakla sorumlu protein yapıdaki ferritindir [110, 116].

BV ve BR endotel hücrelerin ölümünü engelleyerek endotel hücre bütünlüğünü koruyan metabolitler olup, vücut tarafından üretilmiş güçlü antioksidanlar olarak tanımlanmışlardır [116]. BV ve BR, ROS süpürücü özellikleri

ile serbest radikal NO ile ve oksidan peroksinitrit ile etkileşime girmektedirler. BR, serbest radikal üreten NADPH oksidaz aktivitesini güçlü şekilde baskılar [114-115]. Hayvanda deneysel inflamasyona karşı HO kökenli BR'in koruyucu olduğu gösterilmiştir. Kemirgenlerde deneysel astım modelinde BR'in özellikle lökosit transmigrasyonunu, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ile etkileşimini engelleyerek azalttığı gösterilmiştir [120].

2.1.10. HO/CO ve NOS/NO Yolakları arasındaki Karşılıklı Etkileşim

CO ve NO, HO ve NOS tarafından katalitik reaksiyonlar sonucu üretilmekte ve benzer özellikleri paylaşmaktadırlar. Bu özellikler; a) CO ve NO birer retrograd habercidir ve yüksek oranda difüze olabilirler. b) GMP yapımının artışı ile nörotransmitterler gibi etki gösterirler. c) Komşuluğundaki hücreleri yüzey reseptörünü aktive etmeden etkilerler. d) Kısa ömürlüdürler. Bu özellikleri dolayısıyla CO ve NO hücreler arası haberciler olarak etki etmektedirler.

Dokularda pro-oksidan şartlardaki İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonu ve buna bağlı HO-1 aktivasyonu, HO-1'in NO'yu algıladığını böylece ROS'a karşı koruyucu etkisi gösterdiği fikrini desteklemektedir. iNOS ve HO-1'in ekspresyonlarını birbirini takip eden tarzda olduğu gösterilen çalışmada, aortik vasküler hücrelerde, NO'nun HO-1 ekspresyonunu indüklediği, NOS inhibitörleri varlığında NO üretimi ve HO-1 ekspresyonunun her ikisinin de baskılandığı saptanmıştır [121].

NO'in koruyucu etkileri, HO-1'in de dahil olduğu 100'den fazla hücre koruyucu genin indüksiyonundan sorumlu Keap1/Nrf2/ARE yolağının transkripsiyonel aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşmektedir. Keap1/Nrf2/ARE yolağının aktivasyonu, çeşitli stres durumlarına karşı hızlı adaptasyona öncülük eder ve hücre sağ kalımını destekler [122].

Endotel kökenli CO ve NO anjiyogenez aracılığı ile dokulara oksijen desteği için önemlidir. HO kökenli CO, anjiyogeneze sadece VEGF, SDF-1 gibi anjiyogenik faktörlerin artışı sağlayarak değil, aynı zamanda bu faktörlerin endotel hücreleri ile etkileşimini sağlar [123-124]. CO'in VEGF ekspresyonu üzerine olan etkisi Marti ve Risau tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar hayvanları 6 saat süresince %0,1 CO içeren atmosferde tutmuşlar, pek çok organda VEGF ekspresyonunun indüklendiğini gözlemişlerdir [125]. Ayrıca HO-1'in genetik olarak aşırı ekspresyonu endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunun uyarılmasına sebep olmaktadır [123]. Güçlü anjiyogenik etkili VEGF de endotel hücrelerinde HO-1 ekspresyonunu [126] ve eNOS kökenli NO yapımını uyarabilir [127] ve sonuç olarak anjiyogenezi indükler, çünkü HO-1 ekspresyonu endotel öncülü hücreleri oksidatif hasara karşı korumakta ve bu öncül hücreleri hasarlı bölgeye yerleşmeleri yönünde uyarmaktadır. CO ile uyumlu şekilde NO de anjiyogenezi HO-1, VEGF, IL-8 gibi pro-anjiyogenik mediyatörleri artırarak indüklemektedir [123]. Endotel hücreleri NO donörü ile muamele edildiklerinde HO-1, VEGF, IL-8 protein seviyelerinin artışına neden olması yine endotel hücrelerinde VEGF' nin eNOS kökenli NO yapımını uyarması, anjiyogenezin regülasyonunda NO-HO-1/CO-VEGF aksının önemini vurgulamaktadır [128].

HO-1/CO, SDF-1'in pro-anjiyogenik etkileri ile yakın ilişkilidir. Anjiyogenik bir faktör olan SDF-1'in lokal gen transferinin yapıldığı in-vivo bir çalışmada, iskemi reperfüzyonun indüklediği vaskülogenez ve anjiyogenezin arttığı gözlenmiştir [124]. Bu artışa sebep olarak, VEGF ekspresyonunda ve NO yapımındaki artış gösterilmiş ve SDF-1'in uyardığı vasküler yapılanmada VEGF/eNOS yolağının önemi vurgulanmıştır. Bu bulgular, HO-1/CO, eNOS, VEGF ve SDF-1 arasında pozitif bir bağlantı olduğunu ve bu bağlantının yetişkinlerde iskeminin indüklediği yeni damarlanma için yeni bir yol olduğunu ve ayrıca HO-1 ve ürünü CO'in endotel öncülü hücrelerin mobilizasyonlarını artırmak yolu ile vasküler tamirde yaşamsal rolü olduğunu göstermektedir.

HO-1/CO'in eNOS/NO 'e bağlı anjiyogenik olaylarla ilişkili olması ya da tam tersi eNOS/NO'in HO-1/CO'e bağlı anjiyogenik olaylarla ilişkilendirilmesi oldukça ilginçtir. NO, HO-1'i ve CO yapımını artırır [129], yüksek seviyedeki CO ise, NOS aktivitesini ve NO serbestlenmesini inhibe eder [130]. Düşük konsantrasyondaki CO, NO serbestlenmesini eNOS' u stimule ederek uyarır [131]. Tüm bu veriler HO-1/CO ve eNOS/NO yolları arasında karmaşık, adapte olabilen, karşılıklı bir ilişki olduğunu göstermektedir.

2.2. İskemi Reperfüzyon

İskemi ve reperfüzyon, organda kan desteğinin kesintiye uğraması ile başlayan, devamında kan desteğinin yeniden sağlanması (yeniden oksijenlenme) ile karakterize olan patolojik bir durumdur.

Arteriyel kan desteğinin emboli, vs sebebi ile tamamen durması ya da kesintiye uğraması, buna bağlı olarak organın metabolik kan ihtiyacı ile gelen kan arasında ciddi dengesizlik sonucu doku hipoksisi oluşmaktadır. Kan akımının kesinti sonrası yeniden sağlanması, organın yeniden oksijenlenmesi, çoğunlukla doku hasarının daha da kötüleşmesine ve derin inflamatuvar yanıt oluşumuna sebep olur (reperfüzyon hasarı) [132]. İskemi ve reperfüzyon hasarı; kardiyak arrest ve diğer travma çeşitleri, çoklu organ iskemisi gibi pek çok patolojik durum ile beraber anılmaktadır. Uyku apnesi sırasında, hava yolundaki tıkanıklıklar hipoksiye sebep olur ve devamında yeniden oksijenlenme gözlenir [133]. Benzer şekilde orak hücre hastalığı olan kişilerde, periyodik ağrılı damar tıkanıklığı döngüleri ve devamındaki reperfüzyon özellikleri bakımından iskemi ve reperfüzyon ile benzerlik göstermektedir [134].

Tek bir organın iskemi ve reperfüzyona uğraması, diğer organlarda da inflamatuvar reaksiyona sebep olmaktadır [135]. Bilinen patolojik süreçlerin büyük bir kısmı iskemi-reperfüzyon ile ilişkili doku hasarı oluşumuna katkıda bulunurlar. Örneğin iskemik süreçte gözlenen oksijene ulaşımın sınırlı olması durumu yani, hipoksi, bozulan endotel hücre bariyer fonksiyonu ile ilişkilidir, bu durum adenilat siklaz enzim aktivitesinin ve cAMP miktarının azalması, beraberinde vasküler permeabilitenin ve sızıntının artmasına yol açar [136-137]. Ek olarak, iskemi ve reperfüzyon apoptozis (nükleer fragmentasyon, plazma membranında kabarcık oluşumu, hücrenin büzülmesi, mitokondri membran bütünlüğünün ve mitokondri membran potansiyelinin bozulması ile karakterize), otofaji ile ilişkili hücre ölümü (sitoplazmik vakuolizasyon, organel kaybı ile karakterize) ve nekrozis (hücrelerin ve

organellerin şişmesi, hücre membranında yer yer parçalanmalar, proteazların ve lizozomların ekstraselüler boşluğa sızmaları ile karakterize) hücre ölüm programlarının aktivasyonuna sebep olmaktadır [138].

İskemik koşullar, transkripsiyonel yeniden programlanmaya neden olmaktadır. Örneğin; iskemi, kofaktör olarak oksijeni kullanan, prolihidroksilaz (PHD) enzimlerin inhibisyonuna yol açmaktadır. Hipoksiye bağlı olarak PHD enzimlerinin inhibe olması, hipoksi ile indüklenen faktör (HIF) ve nükleer faktör kapp B (NF-kB)' nin stabilitesini kontrol eden sinyal yollarını aktive etmektedir [139]. İskemi ve reperfüzyon tipik olarak steril çevrede oluşmasına rağmen, iskemi reperfüzyon sırasında Toll benzeri reseptörler (TLR) gibi patern tanıyıcı reseptörlerin aktivasyonu ve hasarlı organa inflamatuvar hücre göçü gibi doğuştan ve adaptif immün yanıtların oluşması hasar oluşumuna katkıda bulunmaktadır [140-141].

2.2.1. İskemi-Reperfüzyon ve İmmün Aktivasyon

İntestinal hasar sonrası bakteriyel translokasyon gibi bir kaç istisna haricinde iskemi ve reperfüzyon tipik olarak steril bir çevrede gerçekleşir. Bununla birlikte, iskemi reperfüzyonun sonuçları mikroorganizmaların sebep olduğu immün yanıt ile fenotipik paralellikler göstermektedir. Bu steril immün yanıtta, TLR gibi patern tanıyan moleküller aracılığı ile başlayan sinyal, doğal ve adaptif immün sisteme ait immün hücrelerin aktivasyonlarına, bölgede birikmelerine ve kompleman sistemin aktivasyonuna sebep olmaktadır [141]. Bu yanıtların çeşitli yan etkileri olduğu için iskemi reperfüzyonun sebep olduğu hasarın tedavisinde immün aktivasyon önemli bir terapötik kavram olarak kabul edilmektedir.

2.2.1.1. İskemi-Reperfüzyon ve Doğal İmmün Yanıt Oluşumu

Canlıda mikroorganizmalara karşı yanıt oluşturan reseptörler, iskemi reperfüzyon sırasında oluşan steril inflamasyonda da önemlidir [141]. Örneğin, TLR'lere ligandın bağlanması, NF-kB, MAPK ve gibi TLR reseptörünün altındaki sinyal yollarının aktive olmasına ve proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin oluşmasına sebep olur. Bu reseptörler ayrıca mikroorganizma olmaksızın, iskemi reperfüzyon sırasında gerçekleşen hücre hasarı sonucu ortaya çıkan endojen moleküller tarafından da aktive edilebilirler. Bu ligandlar hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP) olarak adlandırılmaktadır. High Mobility Group Box1 (HMGB1) protein ya da ATP gibi ligandlar normalde hücre içinde tutulmaktadır, fakat doku hasarını takiben bu moleküller ekstraselüler kompartmana salınırlar ve immün yanıt oluşumunu aktive ederler [142]. Bununla birlikte hücre dışında, katabolizma sonucu oluşmuş ya da salınmış hasar ile ilişkili moleküler paternler bulunmaktadır. Katabolik DAMP'lar; TLR aracılı sinyal yolağını, immün yanıt oluşumunu ya da fonksiyonunu veya hasarlayıcı immün yanıtı kısıtlamak ve iskemi reperfüzyon sırasında doku bütünlüğünü sağlamak için de aktive edebilirler [143].

En çok çalışılan patern tanıyıcı reseptör, gram negatif bakteriye karşı inflamatuvar yanıt oluşumundan sorumlu olan TLR4'dür. TLR4 aktivasyonu iskemi reperfüzyon sırasında oluşan oksidatif stres ile artabilir [144]. Hemorajik şok ve resüsitasyona maruz kalmış kemirgenlerden elde edilen alveolar makrofajlar incelendiğinde, makrofaj yüzeyinde TLR4 ekspresyonunun artmış olduğu, antioksidan olan N-asetil sistein varlığında inhibe olduğu gözlenmiştir. Ayrıca,

makrofaj kültürlerine H₂O₂ ilavesi, benzer şekilde makrofaj yüzeyinde TLR4 ekspresyonunun artışına sebep olmuştur [144]. Sadece TLR4 değil diğer TLR'lerin de zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Viral RNA tanınmasından sorumlu olan TLR3, viral aktivasyondan bağımsız olarak, nekrotik hücrelerden salınan RNA'ları da tanımaktadır. TLR3'e karşı nötralize edici antijen uygulamasının intestinal iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir [145]. Epitelde TLR2 ekspresyonu hipoksi ya da inflamasyon ile indüklenmekte ve renal TLR2 sinyalizasyonu iskemi reperfüzyon sırasında oluşan akut böbrek hasarına katkıda bulunmaktadır [146]. Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki, TLR sinyalizasyonunun inhibe edilmesi, iskemi reperfüzyon ile indüklenen steril inflamasyonun tedavisinde etkili olabilir

İskemi reperfüzyon sırasında gelişen steril inflamasyon, inflamasyon bölgesinde inflamatuvar hücrelerin birikimi ile karakterizedir. Özellikle reperfüzyonun erken fazında doğal bağışıklık hücreleri, infiltratın hücrel kompozisyonunda baskın olan hücrelerdir. Bu hücrelerin fonksiyonel katkıları açık değildir. İnflamasyonun patolojik olarak aktive edilmesinden, kollateral doku hasarından ya da tam tersine hasarın rezolüsyonundan sorumlu olabilirler. Son dönemde yapılan bir çalışmada; monositler splenik bir rezervuarda toplanan monositlerin ve miyokardiyal iskemi reperfüzyon sonrasında, iyileşmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir [147]. Klasik dendritik hücrelerin yokluğu, hepatik iskemi reperfüzyon sonrasında oluşan inflamasyon ve doku hasarını artırır [148]. Dendritik hücre aracılı koruma bu hücrelerin anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 yapımlarına, azaltılmış TNF- α , IL-6 ve ROS miktarlarına bağlıdır. ROS, iskemi reperfüzyona bağlı doku hasarı oluşumu ile ilişkilidir [149]. ROS, toksik moleküller olup, hücrel proteinlerin, lipidlerin ribonükleik asitlerin değişimine ve sonuç olarak hücrede fonksiyon bozukluğuna ya da hücre ölümüne öncülük eder. NADPH oksidaz, tüm inflamatuvar hücrelerde eksprese olur ve sitotoksik ROS, peroksinitrit ve H₂O₂ yapımına katkıda bulunur. Peroksinitrit ve diğer reaktif türler, oksidatif DNA hasarına ve devamında, nükleer enzim olan Poli-ADP-Riboz-Polimeraz (PARP) enzimlerinin en yaygın izoformu olan PARP-1 aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu sebeple PARP inhibitörleri de iskemi reperfüzyon hasarının klinik tedavisinde gelişim aşamasındadır [150].

Steril inflamasyon alanında granülositlerin toplanması kontrol edilmesi gereken bir olaydır. Çok az miktarda granülosit toplanması yeterli doku tamirine olanak vermezken, çok fazla miktarda granülosit birikimi ise kontrolsüz inflamasyona ve doku hasarına sebep olmaktadır [151]. Miyeloid progenitör hücre farklılaşmasının inhibe edilmesinin, steril inflamasyonun sebep olduğu doku hasarına karşı koruyucu terapötik bir strateji olabileceği öne sürülmektedir.

2.2.1.2. İskemi-Reperfüzyon ve Adaptif İmmün Yanıt Oluşumu

İskemi reperfüzyon, T lenfositler ile birlikte diğer hücre tiplerini de kapsayan güçlü bir adaptif immün yanıt oluşturulmasına sebep olur. Steril inflamasyon sırasında antijene spesifik olarak aktive olan T lenfositlerin aktivasyon mekanizmaları henüz çok iyi anlaşılammıştır. Fakat yeni ortaya çıkan kanıtlar, aktivasyonda hem antijene spesifik hem de antijenden bağımsız mekanizmaların katkısı olduğunu göstermektedir [152-153].

İskemi- reperfüzyon dokuda T lenfosit birikimine neden olmaktadır. Örneğin, iskemik beyinde T hücreler reperfüzyonun 24. saati içinde infarkt alanının sınır bölgesinde lokalize olmaktadır. Reperfüzyondan sonra 3. ve 7. günde devam eden hücre birikimi 14. günde azalmaktadır [154]. Lenfositlerin spesifik popülasyonlarından yoksun olan fare hatları ile yapılan çalışmalara göre, beyin, kalp ve böbrek iskemi reperfüzyonunda CD4+ ve CD8+T hücrelerinin zararlı rolleri belirlenmiştir [155-157]. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, beyinde iskemi reperfüzyon hasarında gd-T hücreleri tarafından yapılan interlökin-17 (IL-17)'nin rolü gösterilmiştir. IL-17'nin ana kaynağı olarak özellikle gd-T hücreleri tanımlanmış ve bu hücrelerin iskemik felçte terapötik bir hedef olabileceği doğrulanmıştır [158].

Tam tersine T-reg hücreler iskemi reperfüzyonda koruyucu role sahiptirler. Deneysel felç modeli uygulanan bir çalışmada, T-reg hücrelerinin yokluğu ciddi anlamda artan beyin hasarına ve fonksiyon bozulmasına yol açmıştır. Yabanıl ve IL-10 eksikliği olmayan T-reg hücrelerin transferi iskemik beyin hasarını azaltmıştır. Buna göre araştırmacılar, T-reg aracılı interlökin-10 (IL-10) yapımının erken zamanda artan TNF- α 'yı azalttığını öne sürmüşlerdir [159].

2.2.2. İskemi-Reperfüzyon ve Hücre Ölümü

Nekrotik hücreler yüksek oranda immün stimülasyona sebep olan hücrelerdir. İnflamatuvar hücre infiltrasyonuna ve sitokin yapımına sebep olurlar [138]. Apoptozis, hücrenin ve nükleusun büzülmesi, sürecin sonlarına doğru hücre membranı bütünlüğünün bozulması ile karakterize olup, hücrenin ölümü için gerekli kısımları içeren planlı bir kaspaz sinyal kaskadı aktivasyonunu içermektedir [141]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, apoptotik hücrelerden ekstraselüler alana çıkan ATP'nin panneksin hemi kanalları aracılığı ile "bul beni" sinyali gönderdiğini ve fagositozu tetiklediği gösterilmiştir [160].

Apoptozisin inhibe edilmesi iskemi reperfüzyon hasarı için terapötik bir strateji olabilir. Örneğin; akut böbrek hasarı modeli uygulanan fareler ile yapılmış bir çalışmada, matriselüler bir protein olan trombospondin 1 (THBS1 veya TSP-1)'in proksimal tübül hücrelerinde apoptozisi indüklediği, Thbs-1^{-/-} farelerin ise hasardan korunduğu gözlenmiştir [161]. Diğer çalışmalar ise güçlü bir nöron koruyucu trombosit kökenli büyüme faktörü-CC (PDGF-CC) üstüne odaklanmıştır. Bu faktör, nöron koruyucu etkisini glikojen sentaz kinaz-3b (GSK-3b) aktivitesini modüle etmek suretiyle yapmaktadır [162]. PDGF-CC geni ya da proteini iskemi ile indüklenen felç gibi deneysel nöronal hasar modeli uygulanan hayvanlarda, nöronları hem retinada hem de beyinde apoptozisten korumuştur. Bilindiği gibi Ser9 fosforilasyonu apoptozisi inhibe etmekte, Tyr216 fosforilasyonu ise apoptozisi artırmaktadır. Çalışmada PDGF-CC uygulaması GSK-3b'nin Ser9 fosforilasyonunu artırmış, Tyr216 fosforilasyonunu azaltmıştır [163].

Bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB iskemi reperfüzyon sırasında apoptozisi modüle eder. Sınırlı oksijen varlığı, hipoksiye bağlı oksijen sensörlerinin inhibisyonunu içeren bir mekanizma ile NF-kB aktivasyonuna sebep olur [164]. NF-kB aktivasyonu için esansiyel olan inhibitör kappa kinaz (IKK)'ın katalitik subüniti olan IKK-b'nin enterositlerde yokluğu, intestinal iskemi reperfüzyon çalışmasında

azalmış inflamasyona, aynı zamanda reperfüze mukozada şiddetli apoptozise sebep olmuştur. Bu sebeple NF-kB inhibisyonu "iki ucu keskin bıçak" olarak ifade edilir. Bu durum NF-kB inhibisyonunun sistemik inflamasyona karşı koruyucu iken lokal hasarı artırıcı etkili olması ile ilişkilidir [165].

Bir hücre ölüm şekli olan otofajinin subletal strese karşı oluşturulan adaptif bir yanıt olduğuna dair veriler mevcuttur [138]. Bir transkripsiyon faktörü olan HIF, hipoksik cevabın düzenlenmesinde merkezi bir mediyatör olmanın yanı sıra otofajiyi de regüle etmektedir. Hipoksi ile indüklenen mitokondrial otofaji HIF'e bağlı otofajik genlerin ekspresyonunu gerektirir [166]. Bu durum, hipoksik ya da iskemik dokuların sınırlı oksijen varlığındaki metabolik adaptasyonlarında HIF' in önemini göstermektedir.

2.2.3. İskemi-Reperfüzyon ve Mikrovasküler Fonksiyon Bozukluğu

İskemi reperfüzyonda, vasküler permeabilite artışı, endotel hücre inflamasyonu, vazodilatör ve vazokonstriktör faktörler arasındaki dengesizlik, koagülasyon ve kompleman sistemlerin aktivasyonu ile karakterize bir vasküler fenotip gözlenmektedir.

Kompleman sisteminin aktivasyonu, lökosit-endotel hücre adezyonu, trombosit-lökosit agregasyonu, mikro vasküler fonksiyon bozukluğu reperfüzyon sonrasında hasarı daha da ağırlaştırmaktadır [167] Reperfüzyondan sonra azalan vasküler gevşeme, infarkt alanında tıkanan kan damarının yeniden açılması sonrasında mikro vasküler kan damarında artan direnç (akım yok fenomeni) ile sonuçlanabilir [132]. Deneysel iskemik beyin hasarı modeli uygulandığında, orta serebral arterin başarı ile yeniden açılmasına rağmen iskeminin mikro damarlarda devam eden perisit kontraksiyonunu indüklediği gösterilmiştir [168]. Oksidatif ve nitratif stresin baskılanması, perisit kontraksiyonunu hafifletmekte, eritrosit tuzağını azaltmakta, mikro vasküler açıklığı onarmakta ve doku sağ kalımını artırmaktadır. İskemi reperfüzyonun indüklediği mikro vasküler disfonksiyonun sebebi olan oksijen ve nitrojen radikallerinin majör kaynağı mikro damar duvarıdır.

2.2.4. İskemi Toleransını Artırmaya Yönelik Metabolik Stratejiler

İskemi sırasında, dokuların yaşayabilirliklerini daha uzun süre devam ettirebilmeleri için enerji metabolizması yağ asidi oksidasyonundan, oksidasyonun daha verimli olduğu glikolize kayar. Bu metabolik kayma direk olarak bir transkripsiyon faktörü olan ve oksijen seviyesi düştüğünde stabil olan ve glikolitik enzimlerin indüksiyonundan sorumlu olan HIF'in kontrolü altındadır [139, 169]. HIF'in stabilizasyonu, oksijen sensörü olan 3 izoformu bulunan (PHD1-PHD2-PHD3) PHD enzimleri tarafından regüle edilir.

HIF'in en iyi bilinen hedef geni eritropoietin (EPO), eritrosit hücre üretiminin majör regülatörü olan, yapımı ve sekresyonu doku oksijen seviyesi tarafından regüle edilen ve eritropoietini kodlayan genidir [169]. Eritrosit yapımını stimule edici rolüne ek olarak, pre-klinik çalışmalar eritropoietinin dokuyu metabolik adaptasyona uğratarak iskemi reperfüzyon hasarına karşı apoptozisi inhibe etmek, proliferasyonu stimule etmek yolu ile koruduğunu göstermiştir [170-173]. Ayrıca iskemi reperfüzyon sırasında görülen metabolik adaptasyonda mitokondriyal aldehit

dehidrogenaz-2 (ALDH2)'nin aktivasyonunun sıçan modelinde güçlü kalp koruyucu olduğu, farmakolojik olarak ADLH2 aktivitesinin artırılmasının, koroner by-pass cerrahisi gibi kardiyak iskemi hastalarında iskemi toleransını artırıcı ve koruyucu olabileceği gösterilmiştir [174]. Diğer çalışmalar enerji üreten ve enerjiyi harcayan yolların regülasyonundan sorumlu olan ve aktivasyonu kalbi iskemik hasara karşı koruyucu olan AMP- ile aktive olan protein kinaz (AMPK) üzerine odaklanmıştır [175-176]. AMPK aktivasyonu endojen koruyucu bir mekanizma olarak görülmektedir. İskemi ile yapımı uyarılan makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), AMPK'yı aktive eder böylece glikoz alımı ve kardiyak koruma desteklenmiş olur [175].

2.2.5. İskemi reperfüzyon ve Sindirim Sistemi

2.2.5.1. Midede I/R'a Bağlı Mukozal Hasar Oluşumu ve İyileşme Süreci

Çeşitli zararlı etkenlerin varlığında yüzeysel erozyon veya muskularis mukozayı içine alan derin mukozal lezyonlar görülmektedir. Çölyak arterin 30 dk. klemplenmesi ile oluşturulan iskemi ve klempin alınmasını takiben reperfüzyon periyotlarından oluşan deneysel I/R modeli uygulanan deney hayvanlarında reperfüzyondan 1 saat sonra midede görülen yüzeysel lezyonlar, 3 saat sonra belirginleşmeye başlamaktadır [177-178]. İyileşme süreci lezyon oluşumunu takiben başlamaktadır. Oluşan lezyon alanlarının, reperfüzyonu takiben 12. saatte maksimum düzeye ulaştığı, 3.günde lezyonların azaldığı fakat 12. saatteki lezyonlara göre daha derinleştiği gözlenmiştir. 5.gün ise lezyonlardaki azalmanın en belirgin olduğu gün olarak belirlenmiştir. Bu bakımdan 5.gün iyileşme sürecinde oldukça önemlidir. Reperfüzyonu takiben 10.günde ise derin ülserlerin tamamen iyileştiği rapor edilmiştir [178].

Mukozal lezyonlar, serbest radikal birikimi, besin ulaşımının kesintiye uğraması ya da tamamen engellenmesi sonucu oluşan doku nekrozu sebebiyle veya mukozal iskemi reperfüzyon sonucu gelişen patolojik bir durumdur [1].

İskemik fazda, oksijene bağımlı hücrelerde (ör: mukozadaki epitel hücreleri) anoksik hasar gelişmektedir. Mitokondride enerji yapımının azalması ile başlayan anoksik hasar, hücrelerin enerji içeriğinin azalmasına bağlı olarak, hücrede iyon homeostazisinin bozulmasına, hidrolazların aktivasyonuna ve hücre membranında patolojik porların oluşması ile permeabilite artışına neden olmaktadır ATP yıkımı, glikolitik hız artışı ve muhtemelen parçalanmış lizozomlardan salınan H^+ a bağlı olarak, hücre içi pH azalmakta, ph azalışına paralel olarak iyon homeostazisinin bozulduğu, Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi azalırken, Na^+/Ca^{++} değiştirici mekanizmanın aktivasyonunun arttığı, sonuç olarak sitozolik Na^+ ve Ca^{++} konsantrasyonlarının arttığı bilinmektedir [179].

Sitozolik Ca^{++} konsantrasyonundaki artış, hidrolazları, fosfotazları ve proteazları aktive etmekte, hücre iskeletini oluşturan proteinlerde calpain aracılı proteolizis görülmektedir. Hücre içinde sitozolik Na^+ konsantrasyonunun artması, hücrenin şişmesine neden olmaktadır. Mitokondriyal permeabilite artışına bağlı olarak mitokondri membran potansiyeli değişimi ve mitokondri matriksinde Ca^{++} birikimi görülmektedir. Sitozolik ATP, mitokondriyal ATPaz tarafından yıkılmakta,

bu durum hücrenin sentez yeteneğini azaltmakta ve anoksik tahribat çoğunlukla hücre ölümü (nekroz) ile sonuçlanmaktadır[179].

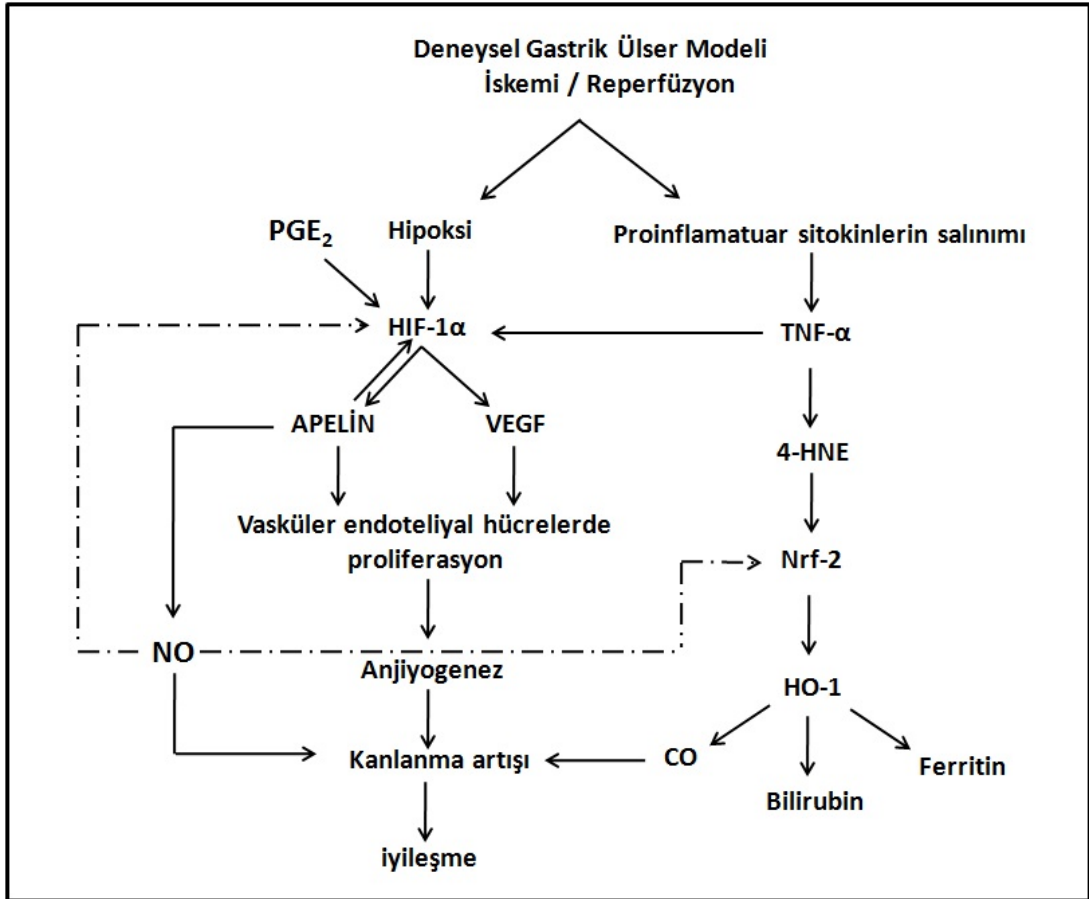
Reperfüzyon fazında, inflamatuvar yolaklar aktive olmaktadır. İnflamatuvar süreçte, makrofajlar, endotel hücreleri, nötrofiller, lenfositler, trombositler, parankimal hücreler gibi çeşitli hücre grupları ile ROS, NO, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler ve mediyatörler etkilidir. Tahrip olmuş hücreler, bu hücrelerden salınan maddeler ve bozulmuş doku matriksinin tetiklediği inflamatuvar yanıt oluşumuna, oksijenlenmeye bağlı olarak görülen metabolik değişimler sonucu aktive olan endotel hücreleri, nötrofiller, makrofajlar ve trombositler gibi hücre grupları katılmaktadır. Aktif makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri trombositler ve tahrip olmuş doku hücrelerinden ortama ROS salınmaktadır. Makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve endotel hücreleri tarafından yapılan sitokinler ve kemokinler, diğer hücrelerin aktive olmalarına neden olmaktadır. Mide mukozal hasarı oluşumunda nekrozlu dokudan lökotrien B (LTB) salınımı, makrofaj ve lökositleri uyarak inflamatuvar yanıtın tetiğini çekmektedir. İnflamatuvar hücrelerin uyarılması TNF- α , interlökin-1 alfa (IL-1 α), interlökin-1beta (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına sebep olmaktadır [1, 180]. Reaktif oksijen türlerinin ve lipid peroksidasyonunun, mukozal lezyon oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Mukozal hasar oluşumu sırasında mide mukozasına infiltre olan nötrofillerin ürettikleri süperoksit anyonları, hücresele lipidleri yıkıma uğratarak malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenol (4-HNE) gibi reaktif kısa zincirli aldehytlerin oluşumuna neden olmaktadır. Mukozal hasar sırasında oluşan 4-HNE lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olup, oksidatif stresin göstergesidir [17].

Reperfüzyonun erken döneminde oluşan hücre tahribatının, iskemik fazda oluşan hücre içi değişikliklere bağlı olduğu bilinmektedir. Örneğin, iskemik fazda mitokondri solunum zincirinde bulunan ve elektron transfer eden enzimler proteolitik parçalanmaya uğramaktadırlar. Reperfüzyon fazında ise yaşamını sürdüren bu hücrelerde O₂'e elektron transferi yapılması sonucu ROS oluşmaktadır. Oluşan bu metabolitler hücre ölümüne neden olmaktadır.

Lezyon oluşumundaki temel sebep, mikrovasküler perfüzyonun bozulması olarak belirtilmiştir. Artmış veya azalmış NO yapımı, artmış endotelin-1 ve kan koagülasyonu mikrovasküler perfüzyonun bozulmasına neden olmakta, reperfüzyon fazında oluşan mikrovasküler fonksiyon bozukluğu nedeniyle anoksik hücre tahribatı gelişmekte ve inflamatuvar yanıtın şiddetlenmesine neden olmaktadır.

Midede ülser oluşumu ve iyileşme süreçleri birbirleri ile ilişkilidir. Fizyolojik şartlarda konsantrasyonu 0,1 – 0,3 μ M olan 4-HNE'nin, oksidatif stres koşullarında birikerek 10 μ M-5 mM'a kadar ulaştığı, yüksek konsantrasyonda DNA ve proteinlerin yapısını bozduğu, lezyon oluşumunu tetiklediği bilinmektedir. 4-HNE'nin sublethal konsantrasyonlarda ise, HO-1, peroxiredoxin-1 gibi antioksidan detoksifiye edici enzimlerin ekspresyonlarını uyarak adaptif yanıt / antioksidan yanıt oluşmasını sağlayan, iyileşme sürecini tetikleyen bir sinyal molekülü olarak görev yaptığı gösterilmiştir [2]. (Şekil 2.2.) 4-HNE, bu stimülasyonu antioksidan genlerin ekspresyonlarından sorumlu Nrf2 isimli transkripsiyon faktörünün nukleusa translokasyonunu uyarak yapmaktadır. Nrf2 aracılı savunma yanıtı adı verilen bu

yolakta, uyaran olmaksızın sitoplazmada Keap-1 isimli proteine bağlı olarak bulunan Nrf-2, ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) birikimine bağlı olarak artan oksidan stres durumunda Keap-1 den ayrılarak nükleusa transloke olur. Nükleusta antioksidan yanıt elementi (ARE) bölgesine bağlanarak antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını uyarmaktadır [2, 17-18, 181-182].



Şekil 2.2. Deneysel I/R ile oluşturulan mukozal lezyonların olası iyileşme mekanizmaları

Hem'in CO, BV ve serbest demire dönüşümünde hız kısıtlayıcı enzim olmasının yanı sıra adaptif yanıtta görevli önemli bir antioksidan enzim olarak tanımlanan HO-1'in primer regülasyonu transkripsiyonal seviyede, Nrf2 aracılığı ile olmaktadır. Bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2 nükleusa transloke olduktan sonra HO-1 enziminin promoter bölgesine bağlanarak ekspresyonunu sağlamaktadır.

Mide ülserlerinin iyileşme süreci çok sayıda büyüme faktörü tarafından modüle edilen karmaşık bir süreç olup, anjiyogenez, ülser iyileşme sürecinin en kritik bileşeni olarak tanımlanan önemli bir fizyolojik olaydır. Mide mukozası iyi kanlanan bir dokudur. Kanlanmayı artıran faktörler, hasarlı bölgeye besin ve oksijen sağlanması açısından iyileşme sürecini olumlu yönde uyarmaktadır.

İnflamatuvar şartlarda arttığı bilinen pro-inflamatuvar sitokinlerden TNF-α'nın, HIF-1α aktivitesini indüklediği, HIF-1α'nın hedef genleri arasında Apelin'e ek olarak anjiyogenik faktörlerin bulunduğu bilinmektedir [20]. Bu faktörler arasında anjiyogenezde temel rol aldığı bilinen VEGF de bulunmaktadır. Endotelial

hücrelerde proliferasyonu, migrasyonu ve tüp oluşumunu uyararak pro-anjiyogenik ajan olarak tanımlanan VEGF, iyileşmenin en temel basamağı kabul edilen anjiyogenezde rol alır [1]. Son yıllarda yapılan çalışmalar Apelin'in de anjiyogenik peptidler arasında olduğunu göstermektedir [21].

Midede mukoza lezyonlarının iyileşme mekanizmalarını açıklamaya yönelik yollar, TNF- α nın indüklediği pro-inflamatuar yolak, VEGF ve Apelin'in dahil olduğu anjiyogenik peptidler aracılığıyla yolak, PG'ler, NO, CGRP gibi vazodilatör etkili moleküllerin görev aldığı vazodilatör yolak gibi ayrı ayrı isimlendirilmiş olsalar da bu yollar birbirleri ile ilişkilidir. Vazodilatör yolağın ürünü olan ve Apelin tarafından yapımı indüklenen NO, vazodilatör etkisine ek olarak, Nrf-2/Keap-1 yolağını aktive ederek Nrf2'nin nükleusa translokasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini uyardığı bilinmektedir [19]. NO'nun HIF-1 aktivitesini artırır, gastrointestinal sistemde koruma ve tamir mekanizmalarında rol alan Trefoil faktör familyasına (TFF) ait genleri uyararak koruyucu peptidler olarak tanımlanan trefoil faktörlerin oluşumunu sağladığı gösterilmiştir [183-184]. TFF1, TFF2 ve TFF3 olarak tanımlanmış bu peptidler, gastrointestinal sistemde mukoza epitelinde sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. Müsine etkileşime girerek mukus bariyerini oluşturmada, mukozal hasar oluşumuna karşı savunma ve tamir mekanizmalarında rol almaktadırlar [184]. Hipoksik şartlarda aktivitesi artan HIF-1'in, mide mukoza bütünlüğünün sağlanmasından ve korunmasından sorumlu olduğu, ayrıca vazodilatör etkili olan PGE₂ tarafından, stabilizasyonunun, nükleer translokasyonunun uyarıldığı ve aktivitesinin modüle edildiği gösterilmiştir [22].

2.3. Apelinerjik Sistem

O'Dowd ve arkadaşları 1993 yılında anjiyotensin tip-1 reseptörüne çok benzerlik gösteren bir gen tanımlamışlardır [185]. APJ reseptörü olarak isimlendirilmiş olan bu reseptörün spesifik selektif ligandı 1998 yılında ve apelin olarak Tatamoto ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [186].

Apelin ve reseptörü organizmada pek çok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır [187-188]. Apelin kardiyovasküler, gastrointestinal ve bağışıklık yanıtlarının düzenlemesi, ayrıca kemik fizyolojisi, vücut sıvı homeostazisi ve embriyonal gelişim ile ilişkilidir [189-190]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar apelinerjik sistemin, yüksek tansiyon, kalp yetmezliği, obezite, glukoz intoleransı, tip 2 diyabet, HIV enfeksiyonu, diabetes insipidus, osteoporoz gibi yüksek prevalansa sahip patolojiler ile de ilişkili olduğunu göstermektedir [189-190].

2.3.1. APJ Reseptörü

377 aminoasitten oluşan, G proteini ile eşleşen, 7 transmembran domaini olan APJ reseptörü ve AT-1 reseptörü arasında yüksek oranda homoloji vardır. Aminoasit içeriği olarak total sekansın %30 (115 aminoasit) ve transmembran bölgesinin de %54 ü anjiyotensin II tip1 (AT-1) reseptörü ile ortaktır [185]. Ayrıca her iki reseptörün dokulardaki ekspresyonları da yüksek oranda benzerlik göstermektedir [191]. Ancak yüksek oranda homoloji göstermelerine rağmen, APJ reseptörünün bilinen tek endojen ligandı olan apelinin AT-1 reseptörüne, AT-1 reseptörünün ligandı olan anjiyotensin II'nin APJ reseptörüne bağlanmadığı gösterilmiştir [192].

Farelerde, sıçanlarda ve insanlarda APJ reseptörünün dağılımı belirlenmiş, buna göre APJ reseptörünün periferal dokularda özellikle akciğer ve kalpte, merkezi sinir sisteminde ise pek çok bölgede fazlaca eksprese olduğu gözlenmiştir [185, 187-188, 191, 193]. Çok sayıda çalışma APJ reseptörünün kardiyovasküler sistemde özellikle endotel hücrelerinde, renal, pulmoner ve adrenal damarlarda, vasküler düz kas hücrelerinde, adipoz doku ve pankreatik adacıklarda eksprese olduğunu göstermektedir [188]. Stres, glukokortikoidler [194], tuz yüklemesi, susuzluk [194] ve yüksek yağlı diyet [195] ile beslenme gibi çeşitli faktörlerin APJ ekspresyonunu artırdığı kaydedilmiştir.

APJ reseptörü hücre içi sinyal kaskadları aracılığı ile hızlı hücrel yanıtın oluşumuna veya nükleer seviyede kronik ya da gecikmiş yanıt oluşumuna katılmaktadır. APJ reseptörü inhibitör G proteini (Gi) ile eşleşmekte [196] ve PKC aracılığı ile Ras'dan bağımsız hücre dışı sinyal ile regüle edilen kinazları ERK aktive etmektedir [197].

APJ reseptörünün uyarılması umbilikal endotel hücreleri için mitojeniktir. Bu etkiyi, PI3K-Akt yolağı ve ERK yolağı aracılığı ile p70s6 kinazı aktive ederek gösterir [198]. Ayrıca Apelinin APJ reseptörüne bağlanması ve devamında PI3K-Akt bağımlı eNOS fosforilasyonu, apelinin indüklediği endotel bağımlı vazodilatasyon mekanizmasında oldukça önemlidir [199].

2.3.2. Apelinerjik Peptidler

APJ reseptörü, sığır mide ekstraktından 36 aminoasitlik peptid olan apelinin izole edinceye kadar yetim reseptör olarak kalmıştır [186]. 77 aminoasitlik bir peptid olan Pre-proapelin'i kodlayan gen insanlarda Xq25-26,1 olup 1726 baz çiftinden oluşmakta ve 3 ekzon içermektedir.

Apelin ile ilgili ilk çalışmalar, apelinin Apelin-36 (apelin 42-77), Apelin-17 (apelin 61-77) ve Apelin-13 (apelin 65-77) gibi farklı izoformları olduğunu göstermiştir. Piroglutaminlenmiş Apelin-13 ([Pyr1]-Apelin-13), N terminalinde glutamat rezidüsü bulunan formdur. Piroglutaminlenme, apelin-13'ü enzim degradasyonuna karşı korumaktadır. Apelinin biyolojik olarak aktif olabilmesi için 12 C terminalindeki aminoasitlerin bulunması gerekmektedir. Apelinin N-terminal sekansı ligand ve reseptör etkileşimi için gereklidir.

Apelinin kısa izoformlarının çoğunlukla güçlü kardiyovasküler etkilerinin olduğu, daha uzun apelin peptidlerinin ise reseptöre daha fazla bağlanma afinitesi gösterdiği [189] ve apelin-36'nın HIV enfeksiyonunu bloke edilmesinde rolü olduğu bilinmektedir. Apelin-36 sınırlı biyolojik aktiviteye sahip olup öncül molekül olarak bulunmakta, ihtiyaç anında proteolize olup, post translasyonel modifikasyonlara uğrayarak, biyolojik olarak daha aktif peptidlere, en çok da [Pyr1]-Apelin-13'e dönüşmektedir.

Lee ve arkadaşları Apelin-13'ün C terminalindeki fenilalanini alanin rezidüsü ile değiştirerek APJ antagonisti elde etmişlerdir [200]. Apelinin doku dağılımı ile ilgili yapılan çalışmalar peptidin sıçan dokusunda pre-propeptid formunda bulunduğunu göstermiştir. İnsanlarda ise preproapelin mRNA'sı merkezi sinir

sisteminde, plasentada, böbrekte, kalpte, akciğerde ve meme bezinde bulunmuştur [186, 201]. Miyokard, kardiyak endotel, büyük damarların, küçük venlerin ve arterlerin endoteli apelinin biyolojik olarak aktif olduğu bölgeler olarak tanımlanmıştır. İnsan dolaşımındaki apelin peptidinin kaynağı ise magnoselüler nöronlar, gastrointestinal sistem ve adipositler olarak tanımlanmıştır. İnsan plazmasında fizyolojik apelin konsantrasyonu 10-1000 fmol/mL olarak tayin edilmiş, apelinin degradasyonunda anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2)'nin rol aldığı, ACE2'nin bu degradasyonu apelinin C terminalindeki fenilalanin rezidüsünü kopararak yaptığı gösterilmiştir [202].

Apelinin kardiyak etkileri incelendiğinde, güçlü inotropik etkili olduğu gözlenmiştir [203]. Apelin inotropik etkisini, intraselüler Ca^{+2} 'u artırarak yapmaktadır. Ca artışı, fosfolipaz C ve PKC aktivasyonuna sebep olmakta, Ca^{+2} taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarının artışı sonucu hücre içi Ca^{+2} artışı görülmektedir. Ca^{+2} iyonunun troponin C'ye bağlantısı, aktin miyozin eşleşmesi ve devamında daha etkili miyokardiyal kontraksiyonlar ile sonuçlanır [191, 203].

2.3.3. Apelinerjik Sistemin Patofizyolojik Roller

2.3.3.1. Apelinerjik Sistem ve Kardiyovasküler Sistem

Yapılan çalışmalar insan kalbine odaklanmış, fakat apelin ve APJ reseptörünün kardiyovasküler sistemdeki rolü henüz netlik kazanmamıştır.

Apelin tanımlanmış en güçlü endojen inotropik ajanların arasında yer almaktadır. İn vitro şartlarda, ekzojen apelin atrial striplerde [204] ve tüm kalpte [203] sub nanomolar konsantrasyonlarda kontraktileti artırmakta ve tek bir sarkomerin kısalmasını %140'a kadar artırmaktadır [205]. Sağlıklı kemirgenlerde, akut apelin infüzyonu miyokardiyal kontraktileti, yükleme şartlarından bağımsız olarak artırmaktadır ve mevcut inotropik ajanlar içinde kronik dozu sol ventrikül hipertrofini uyarmadan kardiyak outputu artırdığı kabul edilen tek ajandır [206].

Son çalışmalar, endojen apelin-AJP reseptörü sinyalizasyonunun kardiyak fonksiyonlara katkıda bulunduğunu doğrulamaktadır. Apelin ve APJ reseptörünün her ikisinden de yoksun fareden elde edilen izole ventriküler miyositlerde sarkomerik fonksiyon bozulması gözlenmiş, miyositlerde kontraktilete azalışı kaydedilmiştir [207].

Apelinin inotropik etkilerinin Ang-II, endotelin-1, katekolaminler ve NO salınımından bağımsız olduğu gösterilmiştir [203]. Her ne kadar bazı veriler tartışmalı olsa da apelin çoğunlukla hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırmanın dışında mekanizmalar aracılığı ile etki etmektedir [208]. Sağlam sıçan kalbinde, apeline verilen inotropik yanıt, sarkolemmal sodyum hidrojen iyon değiştiricisi (NHE)'nin selektif inhibisyonu ile belirgin şekilde azaltılabilmektedir. NHE'nin uyarılması, hücre içi alkalinizasyona ve kardiyak miyoflamentlerin hücre içi kalsiyuma duyarlı olmalarına sebep olmaktadır. Bu ve diğer benzer çalışmalarda apelinin kalsiyum iyonunda geçici değişimlere etki etmediği gösterilmiştir [203]. Ayrıca, apelin/APJ reseptöründen yoksun farelerden elde edilmiş izole kardiyomiyositlerde, kontraktilete fonksiyonda bozulma gözlenirken, hücre içi kalsiyum iyonunda değişim olmadığı gösterilmiştir [207].

Fizyolojik olarak, apelin akut güçlü inotrop etki oluşturmaktadır. Bu etkiyi, PLC, PKC sarkolemmal Na^+/H^+ ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştirici mekanizmaların (NCX) aktivasyonunu sağlayarak yapmaktadır [203].

Kronik kalp yetmezliği olan hastalarda apelinin plazma seviyelerindeki farklılık, miyokardiyal ekspresyon düzeyi ve lokasyonu incelenmiştir [209]. Bu hastalarda ve kalp yetmezliğine sekonder gelişen koroner arter hastalığı (CAD) veya idiyopatik dilate kardiyomiyopati tanısı almış hastalarda apelin ekspresyonunun birkaç kat arttığı gözlenmiş [210], plazma apelin seviyelerine bakıldığında, kalp yetmezliğinin erken dönemlerinde arttığı, ilerleyen dönemlerde ise azaldığı gözlenmiştir [209]. Bu azalmanın endoteldeki fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [210]. Kalp yetmezliğinde apelin seviyeleri gibi APJ reseptörünün yoğunluğu da hastalığın gelişim sürecine göre farklılık göstermektedir. Hastalığın erken dönemlerinde APJ yoğunluğu artarken, ilerleyen dönemde azalmaktadır [211].

Kan basıncının düzenlenmesi konusunda apelin-APJ reseptörünün etkileri tartışmalıdır. Apelin uygulamasından sonra ortalama kan basıncının arttığını [212] ve düştüğünü [199, 213] gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Literatürde birbiriyle çelişkili sonuçlar, araştırmacıların farklı deneysel hayvan modelleri kullanmış olmaları ve apelinin uygulama tarzlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Tartışmalı sonuçlara rağmen, araştırmacıların ortak bulgusu apelinin vasküler etkisinin endotel bütünlüğüne bağlı olmasıdır [213-214].

Apelin *invivo* şartlarda, endotel bütünlüğünün korunduğu durumlarda NO'ya da prostanooid salınımını modüle ederek endotel bağımlı vazodilatasyona sebep olmaktadır [214]. Ancak endotel disfonksiyonu varsa, apelin, düz kas hücrelerine etki ederek vazokonstriktif yanıt oluşturmaktadır [212].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre, hipertansif sıçanlarda gözlenen kardiyovasküler apelin/APJ sistemindeki yetersizlik, uzun süreli yüzme egzersizi uygulanması ile engellenebilir [215]. Bu veri, fiziksel egzersizin kan basıncı düşürücü faydalı etkisinin Apelinergic sistemdeki aşırı ekspresyona bağlı olabileceğini ortaya koymuştur.

Apelinergic sistemin tam rolünü ortaya koymaya yönelik olarak transgenik hayvanların kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. İlk çalışmaların sonuçlarına göre, APJ knockout (KO) fareler embriyonik gelişme ya da histolojik anormallikler göstermezler [216]. Ancak sonraki çalışmalar bu farelerin erişkinliğe kadar kalp dokusu gelişimlerinin normal olduğu fakat yaşlanma ile birlikte veya kronik basınç yüklemesi olduğunda kalp fonksiyonlarının kötüleştiğini göstermektedir. İki hafta süresince devamlı apelin-13 infüzyonu yapılan yaşlı farelerde, yaşlanmaya bağlı kontraktilite azalışında düzelme tespit edilmiştir [217]. Ayrıca bu farelerde Ang-II'ye verilen vazopressor yanıtta artış gözlenmiş ve apelinin kan basıncı regülasyonundaki rolü öne sürülmüştür [216].

2.3.3.2. Apelinergic Sistem, Vasküler Yapı, Anjiyogenez ve Neoanjiyogenez

Apelin çalışılan insan iletim arterlerinde [204], direnç damarlarında [214] ve venlerde [204] vazodilatasyona sebep olmaktadır. Sıçanlarda *i.v* uygulandığında,

ortalama arter basıncını [199-200, 213, 216], sistemik venöz tonusu [213], kardiyak ön yükü ve ard yükü düşürmektedir [206]. Apeline karşı vazodilatasyon endotel bağımlıdır, ancak endoteli sıyrılmış damarlarda, apeline karşı vazokonstriksiyon yanıtı gelişmektedir [204, 212]. Endotel bağımlı vazodilatasyon büyük çoğunlukla nitrik okside bağımlı yollar aracılığı ile gerçekleşmektedir. İn vitro şartlarda, apelin endotelial NO sentazın transkripsiyonunu [218] ve fosforilasyonunu [216] stimule etmekte, plazma nitrit nitrat konsantrasyonlarını artırmaktadır [199]. Ayrıca NO sentazın inhibisyonu, apeline verilen vazodilatör yanıtları azaltmaktadır [214].

Apelin anjiyogenezin önemli bir regülatörüdür. Yüksek seviyede APJ ekspresyonu ilk önce embriyonik damarların endotelinde [193], sonra retinal damarların endotel tabakasında [219] ve matrigel plaklarında gözlenmiştir [220]. APJ ekspresyonu retinal damarlar oluşurken artmakta, damarlar stabil hale geldikten sonra azalmaktadır [219]. Apelin güçlü anjiyogenik bir faktördür. Kidoya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, APJ anjiyogenez süresince kan damarı çapını regüle etmektedir [221].

2.3.3.3. Apelinerjik sistem ve İskemi-Reperfüzyon

Adipoz doku enerji deposu olmasının yanı sıra, günümüzde endokrin organ olarak tanımlanmıştır. Adipoz dokudan salınan peptitler, adipokinler olarak isimlendirilmekte, otokrin, parakrin veya endokrin etkiler ile pek çok biyolojik fonksiyonu değiştirmektedirler. Bu peptitler TNF- α , plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI), IL-6, apelin ve visfatin olarak sıralanabilir [222].

İskemi-reperfüzyon sonucu oluşan hasarın azaltılması özellikle kardiyak iskemi sonrasında hastaların toparlanması ve sağ kalımları açısından önemlidir. Bu durum reperfüzyon hasarı ile ilişkili kurtarıcı kinaz yolağının (RISK pathway) aktivasyonuna bağlıdır. Sağ kalım kinazları olan Akt/Protein Kinaz B (PI3K-Akt) ve p44/42 MAPK yollarının aktivasyonu ile MPTP inhibisyonunu içeren RISK yolları beyaz adipoz dokudan salınan peptitler olan adipokinler tarafından aktive edilebilmektedir [223].

Olgun adipositler tarafından üretilen ve sekrete edilen adipokinlere dahil olan apelin peptidinin, RISK yolağı bileşenlerinden olan P44/42 ve PI3K/Akt yolları ile ve p70S6 kinazı aktive ettiği gösterilmiştir [198]. İskemi reperfüzyon ya da hipoksiyeniden oksijenlenme sonrasında kardiyak miyositlerde apelin/APJ ekspresyonlarının arttığı rapor edilmiş, yüksek doz isoproterenol ile oluşturulmuş miyokard hasarının apelin uygulaması ile hafiflediği gösterilmiştir [224].

Endoplazmik retikulum (ER) stresinin iskemi reperfüzyon süresince arttığı ve apoptozisi indüklediği için iskemi reperfüzyon hasarı oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir [225]. ER stresinin indüklediği apoptozisin azaltılmasının kalbi iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruduğu bilinmektedir. Apelin uygulamasını takiben PI3K/Akt, eNOS, AMPK ve ERK aktivasyonu sonucu ER stresinin indüklediği apoptozisin azaldığı, böylece kalbin iskemi reperfüzyona karşı korunduğu rapor edilmiştir [226].

2.3.3.4. Apelinerjik Sistem ve Böbrek

Böbrek ve kardiyovasküler hastalıklar birbirleri ile ilişkili, ölümcül, yüksek epidemiyeye sahip patolojiler olmalarına rağmen, renal Apelinerjik sistem ve böbrek metabolizmasında apelinin rolü detaylı şekilde araştırılmamıştır.

Malyszko ve arkadaşları, diyaliz hastalarında apelin-36 seviyesini düşük bulmuşlardır [227]. Bu hastalarda apelin seviyeleri düşük olmasına rağmen koroner arter hastalığı (Coroner Artery Disease, CAD) gözlenmiştir. Daha sonra aynı araştırma ekibi, CAD tanısı alan ve böbrek nakli olan hastalarda apelin seviyesinin anlamlı azaldığını göstermişlerdir. Apelin seviyesindeki bu düşüşün CAD varlığı, endotel hasarı ya da inflamasyon sebebiyle olabileceği öngörülmüştür [228].

Sağlıklı hayvanlara apelin uygulandığında, Ang-II'ye bağlı olarak vazokonstriksiyon gözlenen efferent ve afferent renal arteriollerin damar çaplarında artış gözlenmiştir. Endoteldeki APJ reseptörünün aktivasyonu eNOS' un serin 1177 bölgesinden fosforilasyonuna sebep olur, NO salınımı ile birlikte ve Ang-II'nin indüklediği hücre içi Ca^{+2} artışı inhibe edilir [229]. Bu sonuçlar, apelinin pre-postglomerular mikrovasküler yatakta renal hemodinamikleri regüle eden etkileri olduğunu göstermektedir [230].

2.3.3.5. Apelinerjik Sistem, Diyabet, Obezite ve Besin Alımı

Adiposit kökenli hormonlar ve adipokinler (leptin, adiponektin ve resistin) yağ depolama, gelişim, metabolizma, yeme davranışı gibi olayların fizyolojik regülasyonu ve tip-2 diyabet, hipertansiyon gibi obezite ile ilişkili hastalıklarda önemli olduğu gösterilmiştir [222].

Sorhede Winzell ve arkadaşları, APJ reseptörünün pankreatik adacıklarda eksprese olduğunu ve apelin-36 uygulamasının glukozun uyardığı insülin salınımını inhibe ettiğini *in vivo* ve *in vitro* şartlarda göstererek, pankreatik adacıkların apelin için bir hedef olduğunu ortaya koymuşlardır [231]. Bununla beraber apelinin insanda [232], farede ve sıçanda [191, 201] adipositlerde eksprese olduğu gösterilmiştir.

Boucher ve arkadaşları, apelin ekspresyonunun açlıkta güçlü şekilde azaldığını, yeniden beslenme ile apelin miktarındaki azalmanın normal seviyeye ulaştığını, ekspresyon düzeyinin beslenme durumuna ek olarak, aynı zamanda insülinin adipositler üstüne olan doğrudan etkisi ile de değiştiğini göstermişlerdir [232].

Apelin ekspresyonunun direk insülin tarafından regülasyonu PI3K, PKC ve MAPK aktivasyonu ile modüle edilmektedir [232]. Hiperinsülinemiye bağlı deneysel obezite modeli uygulanmış farelerde ve hiperinsülineminin indüklediği obezite tanısı almış hastalarda, yağ hücreleri incelendiğinde, apelin ekspresyonunda aşırı artış ve plazma apelin seviyelerinde yükselme gözlenmiştir. Hipoinsülinemik, streptozotocin tedavisi uygulanan farelerde, insülin eksikliği, adipositlerde apelin ekspresyonu azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Normal ve obez farelere 14 gün boyunca intraperitoneal apelin uygulaması yapıldığında, farelerde besin alımı etkilenmezken, vücut yağ kitlesinde azalma, insülin, leptin ve trigliserit seviyelerinde azalma, adiponektin seviyelerinde ve uncoupling protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir [233].

Apelinin diyabetik kardiyomiyopatide, kardiyovasküler fonksiyonun regülasyonunda rol alıyor olabileceği öne sürülmektedir. Çünkü diyabetik farelere apelin tedavisi uygulandığında, asetilkoline verilen PI3K/Akt/eNOS yolağı aracılı vazodilatör yanıtta artış gözlenmiştir [234]. Bu sonuçlara göre, insülinin adipositlerdeki apelin yapımını regüle ettiği, obezite ile ilişkili çeşitli insülin duyarlılığı durumları ile potansiyel bağlantısından yola çıkılarak apelinin endokrin adipokin olduğu ortaya konmaktadır [232, 235].

2.3.3.6. Apelinerjik Sistem, Merkezi Sinir Sistemi ve Vücut Sıvı Homeostazisi

Apelinerjik sistem, merkezi sinir sisteminin arjinin vazopressin (AVP) sentezi ve salınımı ile ilişkili temel alanlarının yanı sıra hipotalamusun magnoselüler nöronları, sirkumventriküler alanlar ve hipofiz bezi gibi içme davranışının kontrolü ile ilişkili yapılarda eksprese olmaktadır [236-237].

Apelin ve APJ reseptörü beyinde geniş yayılım göstermekte, vücut sıvı homeostazisi ile ilgili alanlar olan supraoptik nükleus ve paraventriküler nükleusta fazla miktarda bulunmaktadır [192, 194, 196]. Bu bölgede apelin sentezi ve sekresyonunun vazopressin tarafından regüle edildiği gösterilmiştir. Bundan başka, beyinde apelin ve APJ reseptörü ile angiotensinojenin büyük oranda beraber bulunması apelinerjik sistemin sıvı homeostazisindeki olası fonksiyonel rolünün göstergesi olarak kabul edilmektedir. APJ knockout farelerin anlamlı derecede daha az su içtikleri ve yabancı tip farelere göre idrarı konsantre etme yeteneklerinin daha az olduğu saptanmıştır [238]. Bu bulgu APJ reseptörünün su alımı ve sıvı tutma mekanizmalarındaki fizyolojik rolünü ortaya koymuştur.

Apelin ve APJ reseptörünün paraventriküler nükleusta bulunması apelinerjik sistemin strese karşı oluşturulan endokrin yanıt ile ilişkili olabileceğinin göstergesidir [192]. Takip eden çalışmalarda, apelinin CRH ve AVP salınımını uyardığı, akut ve kronik stresi takiben sıçanların paraventriküler nükleuslarında APJ reseptör ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [194].

2.3.3.7. Apelinerjik Sistem ve İmmün Sistem

Kandaki mononükleer fagositlerin uyarılmalarını takiben APJ reseptörünü eksprese etmeleri, apelinin aktif T lenfositlerde önemli etkisi olabileceğini ortaya koymuştur [239-240]. CD3 ile aktive edilmiş fare dalak hücrelerine apelin-36 uygulandığında sitokin yapımının etkilendiği gözlenmiştir [196]. APJ reseptörünün de içlerinde bulunduğu pek çok GPCR türü, HIV enfeksiyonu için olası yardımcı reseptör olarak tanımlanmıştır. APJ reseptörü ekspresyonunun NT2N insan beyin hücrelerinde, T hücrelerinde ve CD4 pozitif hücrelerde saptanmış olması, APJ reseptörünün yardımcı reseptör fonksiyonu olabileceğini akla getirmiştir [239, 241]. Apelin APJ reseptörüne bağlandığında, HIV'in CD4 ve APJ reseptörünü beraber eksprese eden insan hücre hattına girişi bloke olmaktadır [242]. Blokajın derecesi, peptidin moleküler ağırlığı ile negatif korelasyon göstermektedir [242-243].

2.3.3.8. Apelinerjik Sistem ve Gastrointestinal Sistem

Apelin ilk olarak mide ekstraktından izole edilmiş [186] ve en yüksek oranda eksprese olduğu bölge midenin fundus bölgesi olarak belirlenmiştir [244]. Histolojik çalışmalar apelinin midede değişik hücre tiplerinde yapıldığını ortaya koymuştur.

Apelin pozitif hücreler daha çok midenin glandular epitel hücrelerinde bulunmakla birlikte, boyanan bazı hücrelerin enteroendokrin hücresi olabileceği rapor edilmiştir [244]. Bu sebeple, apelin lokalizasyonunun fizyolojik rolü hakkında ipucu olabileceği düşünülerek pek çok araştırmacı gastrointestinal sistem üstüne odaklanmıştır.

Apelinin reseptörüne bağlanması sonucu endotel hücre proliferasyonunu uyardığı, hücre içi Ca^{+2} sinyal yolağını kullanmadan, MAPK yolağı aktivasyonu aracılığı ile enteroendokrin hücre hattından kolesistokinin sekresyonunu desteklediği gösterilmiştir [244]. APJ reseptörünün merkezi sinir sisteminde besin alımı ile ilgili alanlarda tespit edilmiş olması, apelin peptidleri ve iştah ilişkisinin yeni bir araştırma konusu olarak belirlenmesine sebep olmuştur. İlk çalışmalarda intraserebroventriküler (icv) olarak [Pyr1]-Apelin-13 uygulandığında besin alımında artış gözlenmiş [245], bir başka araştırmacı grubunun çalışmasına göre intravenöz apelin-13 uygulaması besin alımına etkisiz, aç ve tok sıçanlarda apelin-13'ün icv uygulanması besin alımında azalmaya sebep olmuştur [246].

Apelinerjik sistem sadece gastrointestinal sistem fizyolojisi ile ilgili değil, aynı zamanda inflamatuvar süreçle karakterize olan bazı gastrointestinal hastalıklarla da ilişkilidir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD)'ndan muzdarip hastalarının kolon epitelinde apelin immün boyamasının arttığı tespit edilmiştir [247]. Aynı araştırma grubu bir sonraki çalışmalarında, hipoksi ve inflamasyonun apelin ekspresyonunda artışa sebep olduğunu, muhtemelen hipoksi ile indüklenen faktörlerin artışı ile hücre proliferasyonunu uyardığını göstermişlerdir.

Apelin-apelin reseptör kompleksinin gastrointestinal sistemde hipoksi ve inflamasyon ile indüklendiği gösterilmiştir [24-25]. Cox ve arkadaşları Apelin peptidinin, bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1'in hedef geni olduğunu, hipoksik koşullarda HIF-1 α 'nın Apelin geninin ilk intronuna bağlanarak Apelin ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir [248]. HIF-1 α aktivitesi, hipoksi dışında normoksik koşullarda interferon-1beta (IFN-1 β) ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından artırılmaktadır. Song ve ark.'nın çalışmasında ise proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve IFN- γ 'nın enterik Apelin ekspresyonunu aktive ettiği, bu aktivasyonun Jak/Stat sinyal yolu aracılı Apelin'in promoter aktivitesinin artışı ile gerçekleştiği gösterilmektedir [24]. Daviaud ve ark.'nın çalışması da TNF- α 'nın insanda ve farede adipoz dokuda Apelin ekspresyonunu artırdığını göstermektedir [26]. Bu veriler, hipoksi ile birlikte inflamatuvar uyaranların etkisi ile de Apelin ekspresyonunun arttığının kanıtıdır.

Apelin ve reseptörünün ekspresyonlarının gastrointestinal sistemde hipoksi ve inflamasyon ile indüklendiği gösterilmiştir. Hipoksi ve IFN-1 β , TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler HIF-1 α aktivitesini, HIF-1 α 'nın da Apelin yapımını artırdığı gösterilmiştir. HIF-1 α 'nın aktivasyonuna bağlı olarak ekspresyonu artan Apelin bir yandan vazodilatatör etkili NO yapımını artırırken, bir yandan da vasküler endotel hücrelerinde proliferasyon yaparak anjiyogeneze yol açmaktadır. NO vazodilatatör etkisine ek olarak, HO-1 yolağında yer alan Nrf-2 nin nükleusa translokasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini artırarak gastrointestinal sistemde koruma ve tamir

mekanizmalarında rol alan trefoil faktör familyasına ait genleri uyararak trefoil faktörlerin oluşumunu sağlamaktadır. Hipoksik koşullarda veya proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile aktivitesi artan HIF-1 α 'nın mide mukoza bütünlüğünün sağlanmasından ve korunmasından sorumlu ayrıca vazodilatatör etkiye sahip PGE₂ tarafından stabilizasyonunun, nükleer translokasyonunun uyarıldığı, aktivitesinin artırıldığı gösterilmiştir.

Apelin'in, anjiyogenezi hem invivo hem invitro şartlarda olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir [20]. Hipoksi veya hipoksiden bağımsız yol olarak tanımlanan inflamatuvar uyaranlar etkisi ile ekspresyonu indüklenen Apelin peptidinin endotelial hücre proliferasyonunu uyardığı ve rejeneratif anjiyogeneze rolü olduğu bilinmesine rağmen Apelin'in I/R'a bağlı olarak mide mukozasında meydana gelen değişimlerdeki rolü ile ilgili literatürde bilgi bulunmamaktadır.

2.4. Hipotez

Apelinin mide mukozasında I/R'a bağlı hasar oluşumu ve iyileşme mekanizmalarında rolü vardır.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Deneysel Hayvanlar Ünitesi ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilen çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Ünitesi'nden temin edilen erişkin, erkek 250-300 g ağırlığında 235 adet Wistar sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar tel kafeslerde standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslenmiş, deneye başlamadan önce her sıçan tartılarak, canlı ağırlığı kaydedilmiştir.

3.1. Gruplandırma ve Deneysel Protokolü

Sıçanlar bütün gruplarda 18 saatlik açlık periyodundan sonra deneye alınmıştır. Bu süre içinde su alımı serbest bırakılmıştır. Çalışmamızda, apelin etkisini ortadan kaldırmak için apelin reseptör antagonisti (F13A) kullanılmıştır. Apelin'in mide ülseri oluşumundaki rolünün belirlenmesi için F13A I/R'den hemen önce, apelinin mide ülserinin iyileşmesindeki rolünün belirlenmesi için antagonist I/R'den hemen sonra intravenöz (i.v.) olarak kuyruk veninden uygulanmıştır.

Daha önceki çalışmamızda, F13A'nın 15 µg/kg/gün, 75 µg/kg/gün ve 150 µg/kg/gün dozlarının mide lezyon indeksi ve mide mukozal kan akımı üzerine olan etkileri belirlenmiş etkin F13A dozunun 150 µg/kg/gün olduğuna saptanmış, çalışmamızda 150 µg/kg/gün F13A dozu kullanılmıştır.

3.1.1. Deneysel grupları

Her gruptaki 6 denek immunohistokimyasal parametreler için, 12 denek ise kalan parametreler için kullanılmıştır. Denekler normal yem ve su ile beslenmiştir.

1) Kontrol Grubu (n=18): Hayvanlar xylazine-ketamine (10 mg/kg xylazine+ 90 mg/kg ketamine, i.p) anestezisi altında iken, orta hat kesisi ile mideleri açığa çıkarılarak, mukozal kan akımları ölçülmüştür.

2) Sham Grubu (n=10): Bu gruptaki hayvanlara kuyruk veni aracılığı ile fizyolojik serum uygulanmıştır. Hayvanlar anestezisi altında iken, herhangi bir işlem yapılmadan orta hat kesisi ile çöliak arter açığa çıkarılmış ve mukozal kan akımları ölçülmüştür.

3) İskemi-Reperfüzyon Grubu (n=90): Bu gruptaki 90 deneysel hayvanı kendi içinde 5 ayrı gruba ayrılmıştır.

- a. I/R uygulamasından hemen sonra feda edilen grup (n=18)
- b. I/R uygulamasından sonra 24. saatte feda edilen grup (n=18)
- c. I/R uygulamasından sonra 72. saatte feda edilen grup (n=18)
- d. I/R uygulamasından sonra 120. saatte feda edilen grup (n=18)
- e. I/R uygulamasından sonra 240. saatte feda edilen grup (n=18)

Hayvanlar anestezi altında iken çöliak arterin klemple kapatılması ile 30 dk iskemi ve klemp alındıktan sonra 3 saat reperfüzyon uygulanmıştır. I/R uygulaması sonunda, hayvanlara kuyruk veninden i.v. olarak fizyolojik serum verilmiştir. A grubu hayvanların I/R uygulamasından hemen sonra, b grubu hayvanların I/R uygulamasından 24 saat sonra, c grubu hayvanların I/R uygulamasından 72 saat sonra, d grubu hayvanların I/R uygulamasından 120 saat sonra ve e grubu hayvanların I/R uygulamasından 240 saat sonra, anestezi altında iken mukozal kan akımları ölçülmüştür.

4) F13A + İskemi-Reperfüzyon Grubu (n=18): Bu gruptaki hayvanlara I/R uygulamasından hemen önce 150 µg/kg/gün dozda F13A fizyolojik serum içinde hazırlanarak kuyruk veninden i.v. olarak verilmiştir. I/R uygulamasından hemen sonra anestezi altında hayvanların mukozal kan akımları ölçülmüştür.

5) İskemi-Reperfüzyon + F13A Grubu (n=72): Bu gruptaki deney hayvanları 4 ayrı alt gruba ayrılmıştır.

- a. I/R + F13A uygulanan ve 24. saatte feda edilen grup (n=18)
- b. I/R + F13A uygulanan ve 72. saatte feda edilen grup (n=18)
- c. I/R + F13A uygulanan ve 120. saatte feda edilen grup (n=18)
- d. I/R + F13A uygulanan ve 240. saatte feda edilen grup (n=18)

Hayvanlar anestezi altında iken I/R uygulanmıştır. I/R uygulaması sonunda hayvanlara 150 µg/kg/gün dozda F13A verilmiştir. A grubu hayvanların, I/R uygulamasından 24 saat sonra, b grubu hayvanların I/R uygulamasından 72 saat sonra, c grubu hayvanların I/R uygulamasından 120 saat sonra, d grubu hayvanların I/R uygulamasından 240 saat sonra anestezi altında iken mukozal kan akımları ölçülmüştür.

Bütün gruplarda; kan akımı ölçülen hayvanlar abdominal aortlarından kan alınarak feda edildikten sonra mideleri, buzda bekletilen fizyolojik serum içine alınmıştır. Dışarı çıkarılan midenin lezyon indeksi tesbit edildikten sonra fizyolojik serum ile yıkanarak uygun büyüklükte parçalara ayrılmıştır. EDTA'lı tüpe alınan kandan plazma ayrılarak doku ve plazma numuneleri analiz yapıncaya kadar -80°C de saklanmıştır.

3.2. Parametrelerin Tayini

3.2.1. Mide Mukozal Kan Akımı Ölçümü

Mukozal kan akımı ölçümü için Lazer Doppler Akımölçeri (LDF 100C, Model TSD145, Biopac) kullanılmıştır [249].

Prensip: LDF'nin temel prensibi; dokuya gönderilen monokromatik lazer ışınlarının dokudan yansdıktan sonra toplanan bölümüne ait spektrum değişimlerinin analiz edilmesidir. Akımölçerde yer alan optik fiberlerden biri 635 nm dalga boyundaki lazer ışığını dokuya gönderir ve hareketli kan hücreleri tarafından geri saçılan ışınlar alıcı fiber tarafından toplanır. Dalga boyundaki değişimin büyüklüğü ve frekans dağılımı hareketli hücrelerin hızının değerlendirilmesini sağlar.

Yöntem: Hayvanlar xylazine-ketamine anestezisi altında iken, orta hat kesisi ile mideleri açığa çıkarılmıştır. Büyük kurvatur boyunca kesilen mide, mukozal kan akımını ölçmek için fizyolojik serum ile yıkanmıştır. Kan akımı ölçümünün, hayvanın solunum hareketlerinden etkilenmemesi amacı ile mide özel bir aparata yerleştirilmiştir. Lazer doppler probu bir mikromanipülatör aracılığı ile sabit hale getirilmiş ve mide mukoza yüzeyine 0,5 mm uzaklıkta konumlandırılmıştır. Optik prob ile oksintik mukoza üzerindeki dört farklı noktadan 1'er dakikalık kayıt alınmıştır. MP100 software programı ile voltaj sinyali olarak alınan kayıtların ortalaması bir hayvan için kan akım hızı değeri olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kan perfüzyon ünitesi (BPU) olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Lazer doppler akımölçer sistemi, optik prob ile mide mukozal kan akımı kaydının alınması.

3.2.2. Lezyon İndeksinin Tayini

Yöntem: Kan akımı ölçüldükten sonra deneklerin mideleri çıkarılmıştır. Mideler büyük kurvatur boyunca açılmış ve mukoza yüzeyi üste gelecek şekilde dondurulmuş parafin üzerine tespit edilmiş ve doku üzerini kaplayacak şekilde soğuk serum fizyolojik ilave edilmiştir. Mukoza yüzeyinin fotoğrafı alınarak bilgisayara aktarılmıştır. "Spot Advanced Analiz Programı" kullanılarak mukozal lezyon alanları (sınırları belirgin hemorajik alanlar) ölçülmüştür. Lezyon indeksi mm² olarak ifade edilmiştir [250].

3.2.3. Mide lezyonlarının histolojik olarak değerlendirilmesi

Prensip: Mide lezyonlarının histolojik olarak incelenmesi, standart doku takibi sonrasında alınan kesitlerin hematoxilen-eozin boyası ile görünür hale getirilmesi ve ışık mikroskobu ile incelenmesi esasına dayanmaktadır.

Yöntem: Her bir deney grubuna ait 6 adet sıçan immünohistokimyasal değerlendirmeler için sakrifiye edilmiş ve midelere rutin doku takibi yapılmıştır. Sakrifikasyonun hemen ardından alınan mideler %4'lük formalin içerisinde yaklaşık 25 saat fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası dokular yaklaşık 3 saat boyunca musluk suyunda yıkanmıştır. Daha sonra sırasıyla %70, 80 ve 90'lık etanol serilerinde 24 saat boyunca tutulmuştur. %100'lük etanolde 4 saat tutulduktan sonra ksilol içerisinde yaklaşık 6 dakika şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Şeffaflaştırılan

dokular 3 saat boyunca 56°C'lik etüvde bulunan parafin içerisinde bırakıldıktan sonra parafin içeren kalıplara konmuş ve oda sıcaklığında parafinin donması sağlanmıştır. Parafine gömülü mideler tahta kalıplar üzerine yapıştırılarak bloklar hazırlanmıştır. Bloklar mikrotoma yerleştirilerek 5 mikrometre kalınlığında alınan kesitlerin su banyosuna konulup düzleşmesi sağlandıktan sonra süperfrost lamalar üzerine aktarılmıştır. Kesitler gece boyunca oda ısısında kurutulmuştur. Hematoksilen-eozin boyası ile yapılan boyama işleminden sonra 50X, 100X ve 200X büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.4. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini

Prensip: Ünite enzim aktivitesi, 1dk da oluşan ürün miktarı ile ifade edilmektedir. Tetrametilbenzidin, miyeloperoksidaz enzimi ve H₂O₂'nin bulunduğu ortamda oksitlenir. Oksidasyon ürünü olarak mavi renkli bileşik oluşur. Yöntem, mavi renkli bileşiğin neden olduğu absorpsiyon değişiminin 1 dk süresince 655 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır [3].

Reaktifler ve kimyasallar:

- 1. Fosfat tamponu:** 50 mM phosphate buffer saline (PBS, invitrogen-00-3002), 1 N hydrochloric acid (HCl, Merck-101834) ile pH: 6.0'ya ayarlanır.
- 2. Homojenizasyon tamponu:** %1 oranında hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB, Sigma, H-5882) içerir ve 50 mM PBS ile hazırlanır.
- 3. Reaksiyon tamponları:**
 - * 1 mM hydrogen peroxide (H₂O₂, Sigma-H10009)
 - * 20 mM tetrametilbenzidin solüsyonu (tetramethylbenzidine, Sigma, T-2885-1G ve Dimetilformamid, (Dimethylformamide, Applichem A-3676) ile hazırlanır.)
 - * 80 mM sodium phosphate (NaH₂PO₄, Sigma S-9638)

Yöntem: 1 g doku/10 mL olacak şekilde homojenizasyon tamponu içine konulan mide dokusu homojenize edilmiş, (Pro 200, Pro Scientific Inc.Oxford CT, USA.) ardından 30 saniye buz içinde sonikasyon yapılmıştır (Bandelin Sonopuls, UW 2070). Elde edilen homojenatlar, analiz yapılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Analiz öncesinde homojenat 15.000 rpm'de, 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiş, alınan süpernatanın protein miktarı, protein kiti (Pearce-comasie plus-23236) ile belirlendikten sonra, 50 µl alınarak ve üzerine 790 µl, 80 mM NaH₂PO₄, 100 µl, 1 mM H₂O₂, 60 µl, 20 mM tetrametilbenzidin solüsyonu eklenip, küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometrede 655 nm'de 1 dk süresince okunmuştur. MPO enzim aktivitesi için spektrofotometrede 655 nm'de 1 dk süresince okunan absorpsiyon değişimi belirlenmiştir. Absorpsiyon değişimi, ürünün molar absorpsiyon katsayısına oranlanarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır. MPO enzim aktivitesi, hesaplanan protein değerleri ile normalize edilerek sonuçlar mU/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. 4-Hidroksinonenal- Malondialdehit (4HNE-MDA) Miktarının Tayini

4HNE-MDA miktarı lipid peroksidasyonunu ölçen kolorimetrik kit (OxisResearch-Bioxytech-LPO-586) kullanılarak ölçülmüştür [251].

Prensip: Bu yöntem ile hücrel hasarın, oksidatif stresin göstergesi olan lipid peroksidasyonu ölçülmektedir. Ticari kit içinde bulunan kromojenik ayıraç (N-methyl-2-phenylidole (R1)), MDA ve 4-hydroxyalkenaller ile 45°C'de reaksiyona girer. 1 molekül MDA ya da 4-hydroxyalkenal, 2 molekül R1 ayıracağı ile birleşerek 586 nm'de maksimum absorbanı veren stabil kromofor oluşturur. Renkli bileşimin 586 nm'de ölçülen absorbanı total MDA ve 4HNE miktarını vermektedir.

Reaktifler ve kimyasallar:

1. **Homojenizasyon tamponu:** 20 mM phosphate buffer saline (PBS, invitrogen-00-3002), pH:7.4
2. **0.5 M Butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma-B1378):** Acetonitrile (Merck, 100029) ile hazırlanmıştır.

Yöntem: Mide dokusundan alınan mukoza örnekleri, 1 g doku/10 mL olacak şekilde homojenizasyon tamponu ile homojenize edilmiş, homojenat, hızlıca test tüpüne alınarak, örneklerin oksidasyonunun önlenmesi için, 1 mL doku homojenatına 10 µL 0.5 M BHT (butylated hydroxytoluene)/acetonitrile eklenmiştir. 3000 g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildikten sonra ayrılan supernatan ependorf tüpüne alınmıştır. 600 µL supernatan üretici firmanın talimatları doğrultusunda ticari kit prosedürüne uygun olarak önce 650 µL R1 ajanı ile muamele edilmiş, vorteksledikten sonra 150 µL R2 ajanı ilave edilmiştir. Karışım 45° C de 60 dk inkübe edildikten sonra 15.000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş, temiz supernatan elde edilmiştir. Elde edilen supernatan 586 nm'de okunmuştur. 586 nm'de 4HNE-MDA'nın artan konsantrasyonlarının absorbanları okunarak, 4HNE-MDA standart grafiği elde edilmiştir. Numunelerin 4HNE-MDA içeriği standart grafiğe göre hesaplanmıştır. Sonuçlar protein değerleri ile normalize edilerek, 4HNE-MDA miktarı µM/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.6. Nitrit/Nitrat (NOx)Tayini

Toplam nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) miktarı (NOx) Griess metodunu esas alan ticari kolorimetrik kit (Cayman 780001) aracılığı ile ölçülmüştür [178].

Prensip: Dokuda bulunan total nitrik oksit (NO) miktarı, in vivo son ürünleri NO₂⁻ ve NO₃⁻ miktarının toplamı olarak ifade edilmektedir. Nitrit ve nitrat oranları değişkendir ve mutlak ölçümleri mümkün değildir. Bu nedenle total NO üretimi NO₂⁻ ve NO₃⁻ miktarlarının toplamı olarak ifade edilmektedir. NO ölçümü için kullanılan kit iki aşamalı bir yöntemle total nitrit/nitrat konsantrasyonunu ölçmektedir. İlk basamakta nitrat redüktaz enzimi ile NO₃⁻, NO₂⁻'e dönüştürülür. İkinci basamakta ise ortama eklenen Griess reaktifleri NO₂⁻'i koyu mor renkli bir azot bileşenine çevirir. Renkli bileşenin 540 nm'de ölçülen absorbanı total NO₂⁻ miktarını vermektedir.

Reaktifler ve kimyasallar:

- 1) Homojenizasyon tamponu:** 10 mM phosphate buffer saline (PBS, invitrogen-00-3002) pH:7,4

Yöntem: 1g doku/10 mL olacak şekilde fosfat tamponu içine konulan mide dokusu buz içinde homojenize edilmiştir (Pro 200, Pro Scientific Inc.Oxford CT, USA.). Homojenatlar 10.000 g'de 20 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar 30 kDa'luk, ultrasantrifüj için uygun filtreler kullanılarak 100.000 g'de 1 saat daha santrifüj edilmiştir. NO₃⁻'nin bilinen konsantrasyonlarının 540 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak nitrit standart grafiği elde edilmiştir. Filtre edilen örnekler ile dilüsyon çalışması yapılarak, numunelerin standartlara ait konsantrasyon-absorbans grafiğinin sınırları içinde olduğu doğrulandıktan sonra plate'e alınarak nitrat redüktaz enzimiyle oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat sonunda plate'e Griess reaktifleri eklenmiş ve 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra 540 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Numunelerin NO₂⁻ içeriği standart grafiğine göre hesaplanmıştır. Sonuçlar protein değerleri ile normalize edilerek NO_x miktarı µM/g protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.7. Prostaglandin E₂ (PGE₂)Miktarının Tayini

PGE₂ miktarı spesifik enzim immünoassay (EIA) kiti (Cayman 514010) kullanılarak ölçülmüştür [3].

Prensip: Bu yöntem, sınırlı miktarda PGE₂ antikoru için numunedeki PGE₂ ve PGE₂-asetilkolinesteraz (AChE) konjugatının (PGE₂ tracer) yarışması esasına dayanır. Numunedeki PGE₂ ve PGE₂ traseri, spesifik monoklonal PGE₂ antikoru ile yarışmacı olarak eşleşir. PGE₂ tracer miktarı sabit tutularak numunedeki PGE₂ miktarına yaklaşım yapılmaktadır. Eşleşen antikor-PGE₂ kompleksi kuyucuklardaki poliklonal anti-mouse IgG'ye bağlanır. Yıkamalar ile bağlanmayan kompleksler uzaklaştırılır. Ortama AChE substratını içeren Ellman's ayırıcı eklendiğinde sarı renk oluşur. Kuyucukta oluşan sarı rengin 405 nm'de ölçülen absorbansı, kuyucuğa bağlanan PGE₂ tracer miktarını verir, dolaylı olarak numunedeki PGE₂ miktarının da göstergesidir. Renk yoğunluğu numunedeki PGE₂ konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Reaktifler ve kimyasallar:

- 1. Homojenizasyon tamponu:** 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, invitrogen-00-3002), pH:7.4, 1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA, Sigma EDS-100), 10 µM indomethacin (Sigma-I7378).

Yöntem: 250 mg /mL olacak şekilde homojenizasyon tamponu içine konulan mide mukoza kazıntısı buz içinde homojenize edilmiştir (Pro 200, Pro Scientific Inc.Oxford CT, USA.). Homojenatlar 8.000 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. Süpernatantların protein ölçümü yapılmıştır. PGE₂'nin bilinen konsantrasyonlarının 450 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak PGE₂ standart grafiği elde edilmiştir. Numuneler ile dilüsyon çalışması yapılarak, numunelerin standartlara ait konsantrasyon-absorbans grafiğinin sınırları içinde olduğu doğrulandıktan sonra numuneler kite uygulanmıştır. Numunelerin PGE₂ içeriği standart grafiğine göre hesaplanmıştır. Sonuçlar protein değerleri ile normalize edilerek PGE₂ miktarı pg/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.8. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) Miktarının Tayini

TNF- α miktarı spesifik solid phase Enzyme Linked-Immuno Sorbent Assay (ELISA) kiti (Diacclone-865.000.192) kullanılarak ölçülmüştür [178].

Prensip: Bu yöntem numunedeki TNF- α miktarının spesifik antikolar aracılığı ile saptanması esasına dayanır. Ticari kit ile sunulan plate sıçana spesifik poliklonal TNF- α antikoru ile kaplıdır. Numune kuyucuklara uygulandığında numunede bulunan TNF- α antijeni kuyucuklardaki spesifik poliklonal TNF- α antikoruyla bağlanır. TNF- α 'ya spesifik biyotinli poliklonal deteksiyon antikoru ortama ilave edildiğinde, numunedeki TNF- α antijenine bağlanır. İnkübasyon süresi sonunda yıkama işlemi ile bağlanmamış içerik uzaklaştırılır. Enzim bağlı sekonder antikor ortama ilave edildiğinde (streptavidin-HRP), sekonder antikor deteksiyon antikoruyla bağlanır. Son olarak ortama sekonder antikora spesifik substrat eklendiğinde (TMB), substrat sekonder antikora bağlı enzim ile reaksiyona girerek renkli bileşiğe dönüşür. Renkli bileşiğin 450 nm'de ölçülen absorpsiyonu, numunedeki TNF- α miktarının göstergesidir. Renk yoğunluğu numunedeki TNF- α konsantrasyonu ile orantılıdır.

Reaktifler ve kimyasallar:

1. Homojenizasyon tamponu: 10 mM Tris HCl (Sigma,T5941) pH: 7.5

Yöntem: Mide dokuları 1 g/mL olacak şekilde homojenizasyon tamponunda (10 mM Tris Cl pH: 7,5) homojenize edilmiştir. Homojenatlar 15.000 g'de 20 dk. santrifüj edilerek süpernatant ayrılmış ve protein miktarı belirlenmiştir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda standart çalışması yapılmış, konsantrasyonu bilinen TNF- α standartların verdiği absorpsiyon değerleri ile standart grafiği elde edilmiştir. Numuneler ile dilüsyon çalışması yapılarak, numunelerin standartlara ait konsantrasyon-absorpsiyon grafiğinin sınırları içinde olduğu doğrulanmış, numuneler plate'e uygulanmıştır. Numunelerin TNF- α içeriği standart grafiğine göre hesaplanmıştır. Sonuçlar protein değerleri ile normalize edilerek TNF- α miktarı pg/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.9. Mide dokusundaki Nükleer Faktör Eritroid-2 ile İlişkili Faktör 2 (Nrf-2), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) immunoreaktivitesinin immunohistokimyasal yöntemle Tayini

Prensip: Numunedeki ilgili proteinin immunoreaktivitesinin belirlenmesi, bu proteine spesifik antikor ile protein deteksiyonu esasına dayanmaktadır. Standart doku takibi sonrasında alınan kesitler proteine spesifik primer antikor ile inkübe edildiğinde, primer antikor numunedeki spesifik antijenine bağlanır ve antijen-antikor kompleksi oluşur. Ortama enzim konjuge sekonder antikor eklendiğinde, sekonder antikor, antijen-antikor kompleksine bağlanır. Sekonder antikora konjuge enzimin substratı ortama eklendiğinde ise enzim kromojenden renk oluşumunu katalizleyerek antijen-antikor kompleksinin yerinin belirlenmesini sağlar.

Yöntem: Mide dokusu %4'lük formalin içerisinde yaklaşık 25 saat fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası dokular yaklaşık 3 saat boyunca çeşme suyunda

yıkanmış, daha sonra sırasıyla %70, 80 ve 90'lık etanol serilerinde 24 saat boyunca tutulmuştur. %100'lük etanolde 4 saatlik inkübasyonun ardından doku ksilol içerisinde yaklaşık 6 dakika tutularak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Şeffaflaştırılan dokular 3 saat boyunca 56° C'lik etüvde bulunan parafin içerisinde tutulduktan sonra, parafin içeren kalıplara konulmuş ve oda sıcaklığında parafinin donması sağlanmıştır. Parafine gömülü mideler tahta kalıplar üzerine yapıştırılarak bloklar hazırlanmıştır. Bloklar mikrotoma yerleştirilerek 5 mikrometre kalınlığında alınan kesitlerin su banyosuna konulup düzleşmesi sağlandıktan sonra ++ (double plus) süperfrost özel lamalar üzerine aktarılmış, kesitler gece boyunca oda ısısında kurutulmuştur. İmmünohistokimya yöntemi uygulanmadan önce kesitler 56 ° C'lik etüvde bir gece bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilol serilerinde tutulan kesitler, 5'er dakika sırasıyla %100, 90, 80 ve 70'lik etanol serilerinde bekletilerek dehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda çalkalanmış ve fosfat tamponlu tuz solüsyonunda (PBS, pH 7.4) üç kere 5'er dakika yıkanmıştır. Kesitler, antijenik maskelemenin giderilmesi için mikrodalga fırında 0.01 M'lık sitrik asit tamponu (pH 6.0) içinde 7 dakika boyunca kaynatılmıştır. Tampon 20 dakika oda ısısında soğutulduktan sonra kesitler 10 dakika boyunca distile suda (dH₂O) yıkanmıştır. Ardından kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle çizilerek 3 defa 5'er dakika PBS'te yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için kesitler % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 15 dakika inkübe edilmiştir. Kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'te yıkandıktan sonra oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immünooglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile 7 dakika muamele edilmiştir. Serum uzaklaştırıldıktan sonra antikor dilüe edici solüsyon içerisinde hazırlanan 1:200 anti-VEGF, 1:400 anti-Nrf2 primer antikorları kesitlerin üzerine kapatacak şekilde damlatılmıştır. Kontrol kesitlerine primer antikordakiyle eşit miktarda immünooglobulin içeren fare IgG ya da tavşan serumu uygulanmıştır. Kesitler + 4°C'de nemli ortamda gece boyu inkübe edilmiş, ertesi gün PBS ile üç defa 5'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra kesitler, anti-VEGF ve anti-Nrf2 antikorları için biyotinle işaretlenmiş 1:400 anti-tavşan sekonder antikorları ile 45 dakika muamele edilmiştir. Kesitler PBS ile üç defa 5'er dakika yıkanmıştır. Ardından kesitler streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 25 dakika inkübe edilmiş, tekrar PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanmıştır. Bu işlemlerden sonra kesitlere di-aminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kromojeni uygulanmış ve ışık mikroskobu altında her kesit için eşit süre olacak şekilde kahverengi reaksiyon gözlenene kadar beklenmiştir. Kesitler artan (%70, 80, 90, 100) etanol serilerinden geçirildikten sonra ksilol içinde bekletilmiş ve ardından kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır. Çalışılan tüm proteinler için her deney grubundan 6 farklı mide kesitinde immünohistokimya yöntemi gerçekleştirilmiştir.

Işık mikroskopik gözlemler

İmmünohistokimya yöntemi uygulanan kesitler Axioplan (Zeiss, Almanya) ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Tüm örneklerde pozitif immünoreaktif hücrelerin immünoboyanma yoğunlukları da semikantitatif olarak [0: negatif; (+): zayıf pozitif; +: pozitif; ++: kuvvetli pozitif; +++: çok kuvvetli pozitif] değerlendirilmiştir. Her gruba ait kesitlerden X100 büyütmede fotoğraflar çekilmiştir.

3.2.10. Hemoksijenaz (HO) Enzim Aktivitesinin Tayini

Prensip: Ünite enzim aktivitesi 1dk da oluşan ürün miktarı ile ifade edilmektedir. HO enzim izoformları (HO-1 ve HO-2) hücre ve dokuların mikrozomal fraksiyonlarında bulunur. Bu enzimler, hemi biliverdine dönüştürür. Biliverdin ise BVR (Biliverdin Redüktaz) varlığında bilirubine indirgenir. Tam dönüşümün olabilmesi için ortamda kofaktör olarak NADPH bulunmalıdır. Bu yöntemde, total HO (HO-1 ve HO-2) enzim aktivitesi, 1 dk da oluşan son ürün olan bilirubin'in miktarını ölçme esasına dayanır. Enzim aktivitesi sonucu oluşan bilirubin'in neden olduğu absorbans değişimi, tarayıcı özellikli spektrofotometrede 400-700 nm dalga boyları arasında ölçülür. Bilirubin'in 414 nm (maksimum absorbans) ve 610 nm (minimum absorbans) dalga boyları arasındaki fark alınır. Bu fark, bilirubin'in 414 nm'deki molar absorblama katsayısına oranlanarak, inkübasyon süresi boyunca oluşan bilirubin miktarı tespit edilir [252].

Reaktifler ve kimyasallar:

- 1. Homojenizasyon tamponu:** 10 mM TrisHCl (Sigma,T5941), pH:7.5, 250 mM sükröz (Merck-5737)
- 2. Resüspansiyon tamponu:** 200 mM Tris-HCl (Sigma,T5941) pH:7.5, 20% gliserol (Sigma-G-7757), 0.04% Triton X-100 (10% v/v) (Bohm&Hass Co. T-6878) ve 1 mM EDTA (ADR grup-60708).
- 3. Hemoksijenaz aktivite tamponu:** 25 mM KH₂PO₄ (Sigma-P-5379), 75 mM K₂HPO₄ (Sigma-P-3786), 1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA, Sigma EDS-100), pH: 7.4
- 4. NADPH:** 2.75 mM (Calbiochem-481973) taze hazırlanır.
- 5. BVR:** Sıçan böbrek sitozolik fraksiyonu BVR kaynağı olarak kullanılmıştır. Taze alınan böbrek, 1 g/mL olacak şekilde homojenizasyon tamponu içinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar 15.000 g'de 20 dk. santrifüj edilerek süpernatant ayrılmıştır. Ayrılan süpernatantlar ultra santrifüj tüpüne alınarak 100.000 g'de 1 saat 2. defa santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, böbrek sitozolik fraksiyonudur ve BVR kaynağı olarak kullanılmıştır.
- 6. Hemin solüsyonu:** 1 mM heme (Calbiochem-3741)
- 7. Kloroform:** (Chloroform, Merck-822265)

Yöntem: Mide dokuları 1 g/mL olacak şekilde homojenizasyon tamponunda homojenize edilmiştir. Homojenatlar 15.000 g'de 20 dk. santrifüj edilerek süpernatant ayrılmıştır. Ayrılan süpernatantlar ultra santrifüj tüpüne alınarak 100.000 g'de 1 saat 2. defa santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant sitozolik fraksiyon olarak ayrılmış, kalan pellet ise ayrılan süpernatant hacminde resüspansiyon tamponu ile resuspense edilerek, 30 sn buzda sonike edilmiş ve mikrozomal fraksiyon elde

edilmiştir. HO enzim aktivitesi tayini için numunelerden elde edilen mikrozomal fraksiyonlar kullanılmıştır. Mikrozomal fraksiyonların protein tayinleri yapılmıştır. 150 µL test numunesine, 60 µL 2.75 mM NADPH ve 600 µL reaksiyon tamponu (9 µL 1 mM hemin solüsyonu, 50 µL sıçan böbrek sitozolik fraksiyonu (BVR kaynağı), 541 µL HO aktivite tamponu solüsyonu) eklenerek 37° C de 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda test tüpüne 1200 uL kloroform ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. 15.000 g de 1 dk santrifüjden hemen sonra süpernatant ayrılacak şekilde tarama özellikli spektrofotometrede 400-700 nm arasında tarama yapılmıştır. Bilirubin maksimum absorptansı 414 nm'de minimum absorptansı ise 610 nm'de belirlenmiştir. Her bir numuneye ait maksimum absorptans ve minimum absorptans farkları hesaplanmış, elde edilen fark, 414 nm'de bilirubin molar absorptans katsayısı ($34095 \text{ cm}^{-1}/\text{M}$)'na oranlanarak sureti ile oluşan bilirubin miktarı hesaplanmıştır. 1 dk da oluşan bilirubin miktarı HO enzim aktivitesi olarak tanımlanmış, belirlenen bilirubin miktarı 20 dk olan inkübasyon süresine oranlanarak 1 dk.da oluşan bilirubin miktarı tespit edilmiştir. Sonuçlar protein değerleri ile normalize edilerek bilirubin miktarı nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.11. Mide dokusundaki Apelin, VEGF, HO-1 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Tayini

Prensip: Western blot yöntemi ile protein ekspresyonlarının tayini, ilgili proteine spesifik primer antikor ile inkübasyon sonucu klasik antijen-antikor kompleksi oluşumu ve bu kompleksin enzim konjuge spesifik sekonder antikor tarafından tanınarak görünür hale getirilmesi ve görüntünün hiperfilme aktarılması esasına dayanmaktadır.

Yöntem: Mideden alınan örnekler western blot analizi için analiz gününe kadar sıvı nitrojen tankının içinde saklanmıştır Mide dokusu, tartım sonrasında her 0.2 g doku için 600 µL lysis buffer ve 10 µL proteaz inhibitör kokteyli içeren ependorf tüplerde homojenize edilmiştir. Homojenizasyonu takiben 15.000 g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilen numunelerin süpernatantları alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Numunelerin total protein içeriği Bradford yöntemine göre tesbit edildikten sonra, numuneler, proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları için SureLock-iBlot-BenchPro (Tam otomatik blotlama sistemi) sistemlerine uyumlu %10 lük gradient-NuPage-Bis-Tris jellere yüklenmiştir. Her kuyucuğa 50 µg total protein yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra jeldeki proteinler, 45 dk süresince 200 mV'da SureLock ile elektroforez edilmiştir. 45 dk sonrasında molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler iBlot sistemi ile 7 dakikada nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Membran BenchPro sistemine yerleştirilerek sistemde uygun program seçilmiş (60 dk bloklama, 2 dk 1. Yıkama, 60 dk primer antikor, 32 dk 2. Yıkama, 60 dk sekonder antikor, 32 dk 3. yıkama) membran uygun dilusyonlardaki primer ve sekonder antikor solusyonları ile otomatik olarak muamele olmuştur. BenchPro sisteminden çıkarılan membranlar, ECL ile 5 dk. muamele edilerek, membran görüntüsü hiperfilme aktarılmıştır. Scanner ile taranan hiperfilm, bilgisayar ortamına aktarılmış, protein ekspresyonunun göstergesi olan bant kalınlıkları "image J " bilgisayar paket programı yardımı ile analiz edilmiştir. Her proteinin ekspresyonu, B-aktin protein ekspresyonu ile normalize edilerek VEGF, Apelin ve HO-1 proteinlerinin ekspresyonları hesaplanmıştır.

3.2.12. Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1alfa İmmün Reaktivitesinin Belirlenmesi

Standart doku takibi sonrası immünohistokimyasal tekniklerle HIF-1 α antikoruna ile işaretlenmiş preparatlar özel bir skala yardımı ile Axioplan mikroskopunda (Zeiss, Almanya) değerlendirilmiştir. Her preparatta 10 bölge HIF-1 α ile boyanmış hücre yoğunluğu temel alınarak 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf fakat kontrole göre görülebilir), 2+ (boyanma belirgin), 3+ (boyanma yoğun) şeklinde skorlanmıştır. Değerlendirme yüzde olarak yapılmış, S=skor, Pi= hücrelerin yüzde değeri olmak üzere, HSCORE = $\sum (S_i \cdot P_i)$, eşitliğinden her bir bölge için ayrı HSCORE değeri hesaplanmıştır.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (PASW statistics 18) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar için Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve grupların ikili karşılaştırılmalarında Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Bütün analizlerde $p < 0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

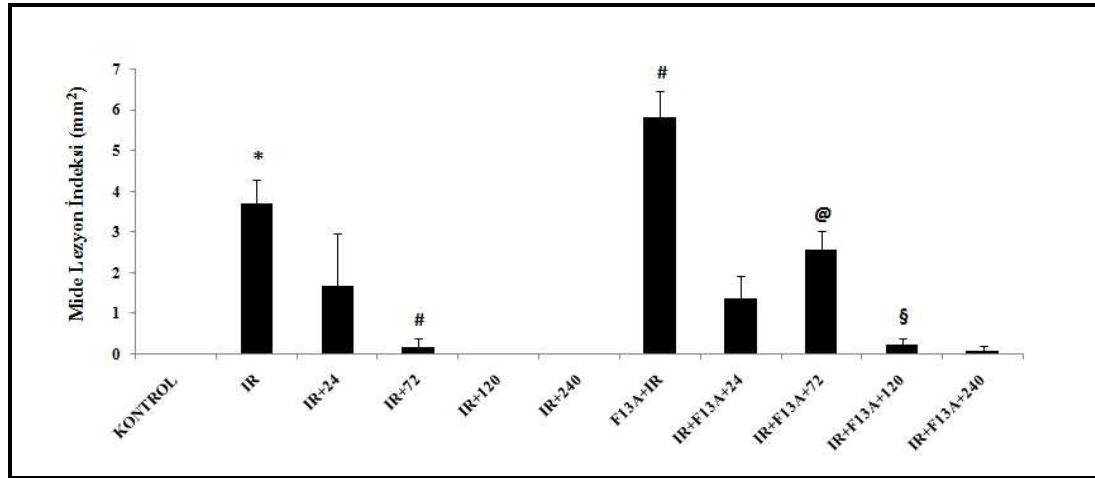
BULGULAR

Çalışmamızın tüm parametreleri istatistiksel açıdan değerlendirilmiş, kontrol ve sham grupları arasında fark tespit edilmemiştir.

4.1. Lezyon İndeksi

30 dk iskemi ve 180 dk reperfüzyonu takiben deneklerde lezyon alanı $3.72 \pm 0.56 \text{ mm}^2$ olarak hesaplanmıştır. I/R uygulaması sonrasında iyileşme sürecinde 24. saatten itibaren lezyon alanı azalmış, 120 ve 240. saatlerde lezyon alanının tamamen iyileştiği gözlenmiştir ($p < 0.05$).

I/R'dan önce uygulanan F13A, I/R grubuna göre lezyon alanında artışa neden olmuştur ($5.84 \pm 0.62 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$). I/R'u takiben iyileşme sürecinde F13A uygulanan 72, 120 ve 240. saat gruplarında, lezyon alanının, F13A uygulaması yapılmayan kontrollerine göre daha fazla olduğu gözlenmiş, iyileşme sürecinde F13A uygulanan 72 ve 120. saat grubunda F13A uygulanmayan kontrolüne göre lezyon alanı anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1.).



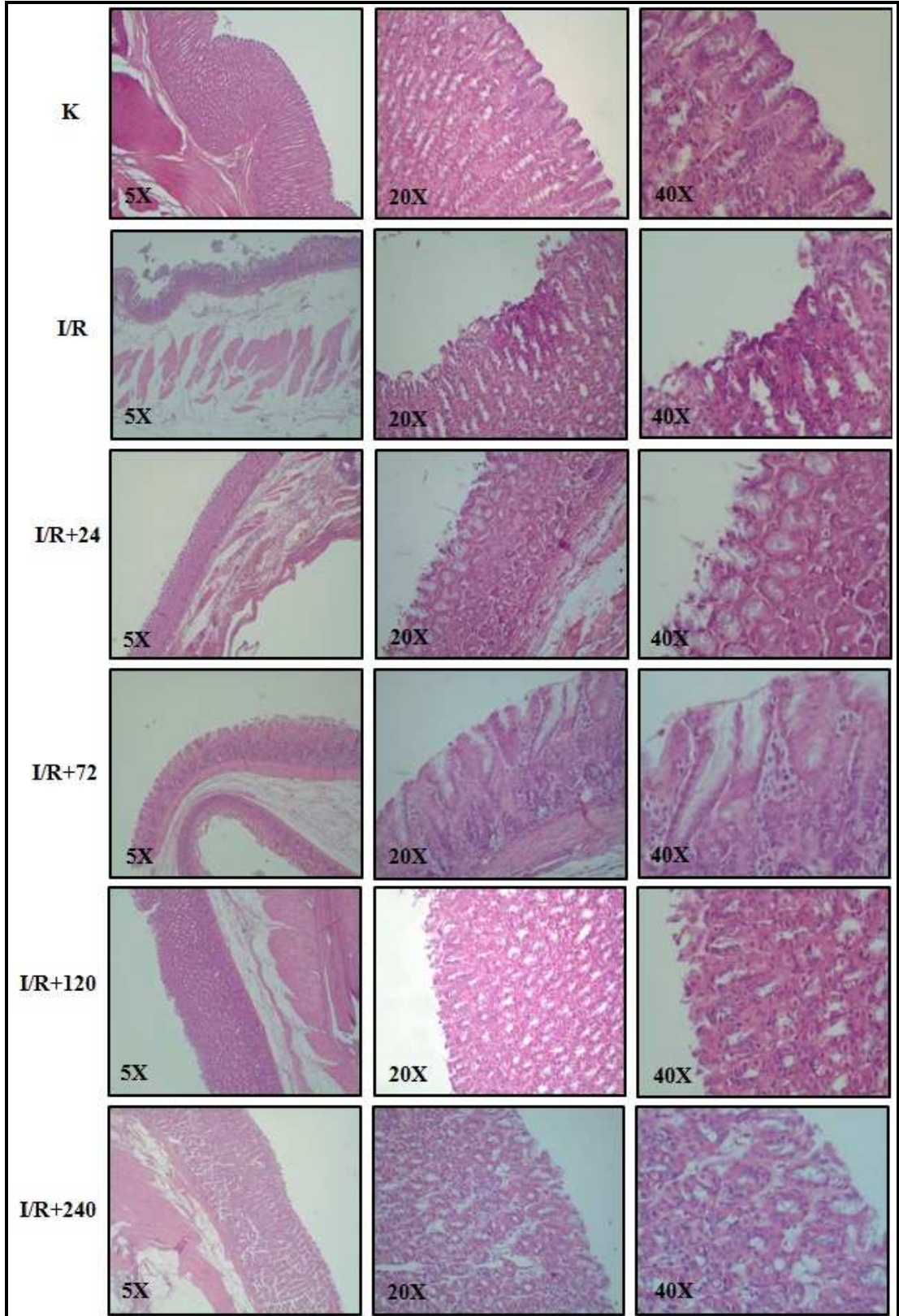
Şekil 4.1. Lezyon İndeksi

- * $p < 0.05$ Kontrol'den fark.
- # $p < 0.05$ I/R'dan fark.
- @ $p < 0.05$ I/R+72'den fark
- § $p < 0.05$ I/R+120'den fark

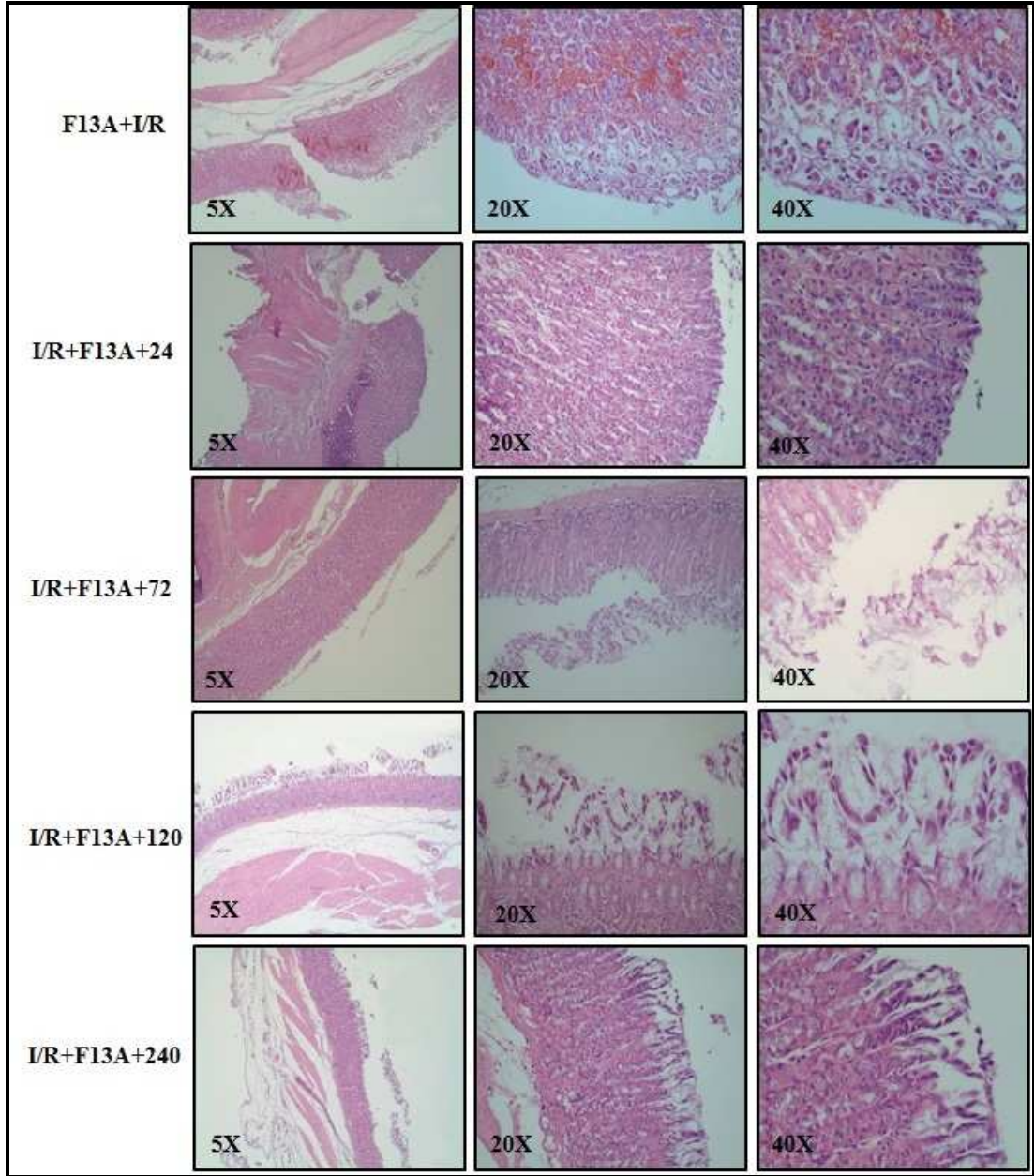
4.2. Mide Lezyonlarının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

Hematoksilen eozin ile boyanmış histolojik preparatlarda, mide dokusundaki lezyonların histolojik görünüşü 10X büyütme ile incelenmiş ve lezyon indeksi bulgularına paralel bulgular elde edilmiştir. I/R uygulamasının, epitel doku bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu gözlenmiştir. I/R'dan sonra iyileşme grubu hayvanlarına ait preperatlarda I/R'u takiben 72 saatte yer yer epitel döküntüsüne rastlanmıştır, 120. ve 240. saatlerde ise, epitel bütünlüğünün tamamen sağlandığı gözlenmiştir.

I/R'dan önce F13A uygulandığında mide mukozasında I/R'a bağlı oluşan tahribatın daha fazla olduğu gözlenmiştir. I/R'u takiben iyileşme sürecinde F13A uygulanması, epitel dokuda ciddi haraplanmaya ve iyileşme sürecinin gecikmesine neden olmuştur. (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2.1. Mide Lezyonlarının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

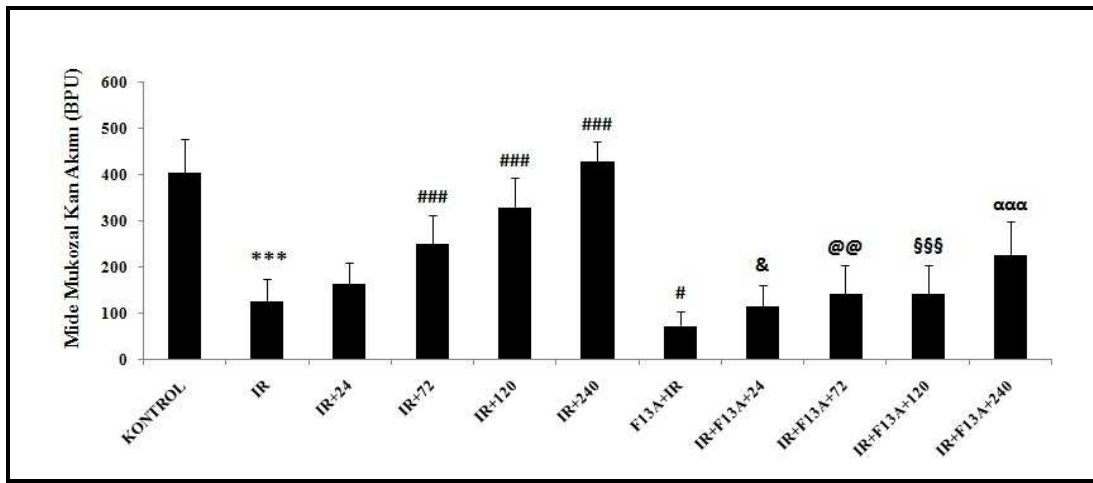


Şekil 4.2.2. Mide Lezyonlarının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

4.3. Mide Mukozal Kan Akımı

Kontrol grubunda 406 ± 72 BPU olarak saptanan mide mukozal kan akımı, I/R uygulanan grupta 126 ± 49 BPU düzeyine düşmüştür ($p < 0.001$). I/R'u takiben 72. ve 120. saatte mukozal kan akımı önemli ölçüde artarak ($p < 0.001$) sırasıyla 252 ± 61 ve 331 ± 62 BPU olarak tespit edilmiş, 240. saatte kontrol grubu seviyesine ulaştığı gözlenmiştir (430 ± 41 BPU $p < 0.001$).

I/R'dan önce uygulanan F13A mukozal kan akımını I/R grubuna göre daha da azaltmıştır (74 ± 30 , $p < 0.05$). Mukozal tahribatın iyileşme sürecinde I/R'u takiben F13A uygulanan tüm grupların mide mukozal kan akımlarında, F13A uygulaması yapılmayan I/R grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı düşüş gözlenmiştir. (I/R'u takiben 24. saatte; 116 ± 46 , $p < 0.05$, 72. saatte; 143 ± 63 $p < 0.01$, 120. saatte; 143 ± 63 $p < 0.001$, 240. saatte; 226 ± 72 $p < 0.001$). (Şekil 4.3.)



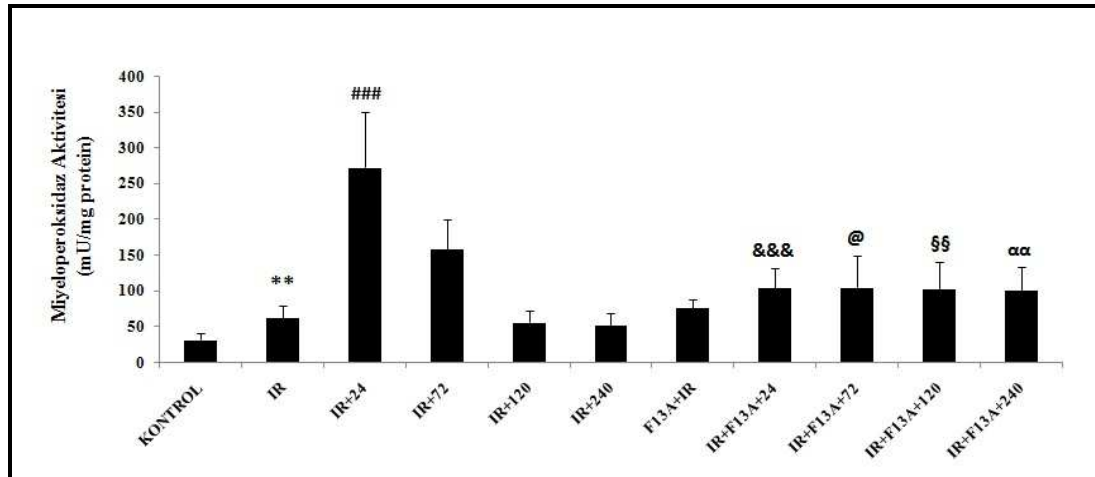
Şekil 4.3. Mide Mukozal Kan Akımı

- *** $p < 0.001$ Kontrol'den fark
$p < 0.05$ I/R'dan fark
$p < 0.001$ I/R'dan fark
& $p < 0.05$ I/R+24'den fark
@@ $p < 0.01$ I/R+72'den fark
\$\$\$ $p < 0.001$ I/R+120'den fark
ααα $p < 0.001$ I/R+240'dan fark

4.4. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi

Mide dokusunda nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan MPO enziminin aktivitesi kontrol grubunda 31.9 ± 8.6 mU/mg protein olarak ölçülmüştür. I/R grubunda enzim aktivitesi 62.2 ± 16.7 mU/mg protein değerine ulaşmıştır ($p < 0.01$). I/R uygulamasından 24 ve 72 saat sonra enzim aktivitesinde I/R grubuna göre anlamlı ölçüde artış gözlenmiş, sırasıyla 273.2 ± 77.9 mU/mg protein, $p < 0.001$ ve 158.6 ± 41.3 mU/mg protein, $p < 0.001$ olarak ölçülmüştür. I/R'dan sonra 120. saatte enzim aktivitesi kontrol seviyesine dönmüştür.

I/R uygulamasından hemen önce verilen F13A, enzim aktivitesinde I/R grubuna göre fark yaratmamıştır. I/R'dan sonra iyileşme sürecinde F13A uygulanan gruplardan 24 ve 72. saat gruplarında, F13A uygulanmayan kontrollerine göre anlamlı ölçüde düşük enzim aktivitesi ölçülürken (104 ± 27.6 mU/mg protein, $p < 0.001$, 105.6 ± 43.6 mU/mg protein, $p < 0.05$), 120 ve 240. saat gruplarında ise, F13A almayan kontrollerine göre daha yüksek enzim aktivitesi tespit edilmiştir (102.6 ± 38.6 mU/mg protein, $p < 0.01$, 100.9 ± 33.0 mU/mg protein, $p < 0.01$). (Şekil 4.4.)



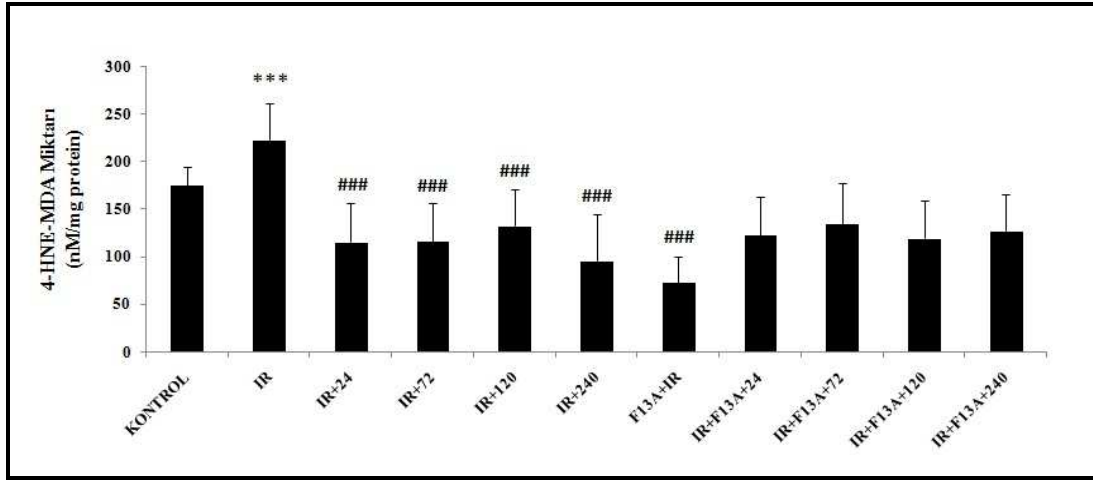
Şekil 4.4. MPO Aktivitesi

- ** $p < 0.01$ Kontrol'den fark
- ### $p < 0.001$ I/R'dan fark
- &&& $p < 0.001$ I/R+24'den fark
- @ $p < 0.05$ I/R+72'den fark
- §§ $p < 0.01$ I/R+120'den fark
- αα $p < 0.01$ I/R+240'dan fark

4.5. 4-Hidroksinonenal-Malondialdehit (4HNE-MDA) Miktarı

I/R uygulanan grupta bulunan hayvanların mide dokusundaki 4HNE-MDA miktarı (223.2 ± 38.6 nM/mg protein), kontrol grubuna göre (175.4 ± 19.8 nM/mg protein) önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.001$). I/R uygulamasına bağlı olarak artan 4HNE-MDA miktarı, mukozal tahribatın iyileşme sürecinde 24. saatten itibaren, 72, 120 ve 240. saatlerde anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla 115.9 ± 40.8 nM/mg protein, 116 ± 40.5 nM/mg protein, 138 ± 38.9 nM/mg protein, 95.7 ± 49.21 p<0,001).

I/R'dan önce F13A uygulaması, I/R'un sebep olduğu 4HNE-MDA miktarındaki artışın tümüyle baskılanmasına neden olmuştur (80.13 ± 24.6 , p<0.001). I/R'u takiben F13A uygulanan gruplar ve F13A uygulanmayan iyileşme süreci grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. (Şekil 4.5.)



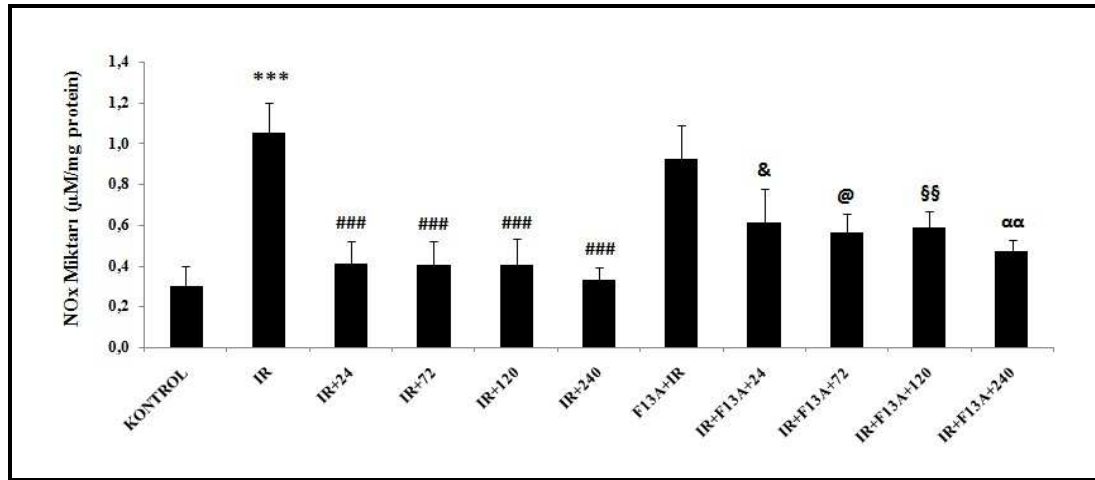
Şekil 4.5. 4HNE-MDA Miktarı

*** p<0.001 Kontrol'den fark
p<0.001 I/R'dan fark

4.6. Nitrit/Nitrat (NOx) Miktarı

Mide dokusunda bulunan NOx miktarı kontrol grubunda 0.297 ± 0.098 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein iken, I/R uygulaması NOx miktarında önemli artışa neden olmuştur (1.050 ± 0.151 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p < 0.001$). I/R uygulamasını takiben iyileşme sürecinde 24. saatten itibaren NOx miktarı anlamlı ölçüde azalarak kontrol seviyesine ulaşmıştır. (I/R'ü takiben 24. saatte; 0.408 ± 0.113 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, 72. saatte ; 0.401 ± 0.116 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, 120. saatte; 0.404 ± 0.126 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, 240. saatte 0.329 ± 0.065 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p < 0.001$).

I/R'dan önce F13A uygulaması, I/R grubuna göre fark yaratmamıştır (0.926 ± 0.163 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein). I/R'ü takiben iyileşme sürecinde F13A uygulaması yapılan tüm gruplarda NOx miktarı, F13A uygulaması yapılmayan kontrollerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur (sırasıyla 0.609 ± 0.168 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p < 0.05$, 0.562 ± 0.091 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p < 0.05$, 0.588 ± 0.081 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p < 0.01$, 0.469 ± 0.059 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p < 0.01$). (Şekil 4.6.)



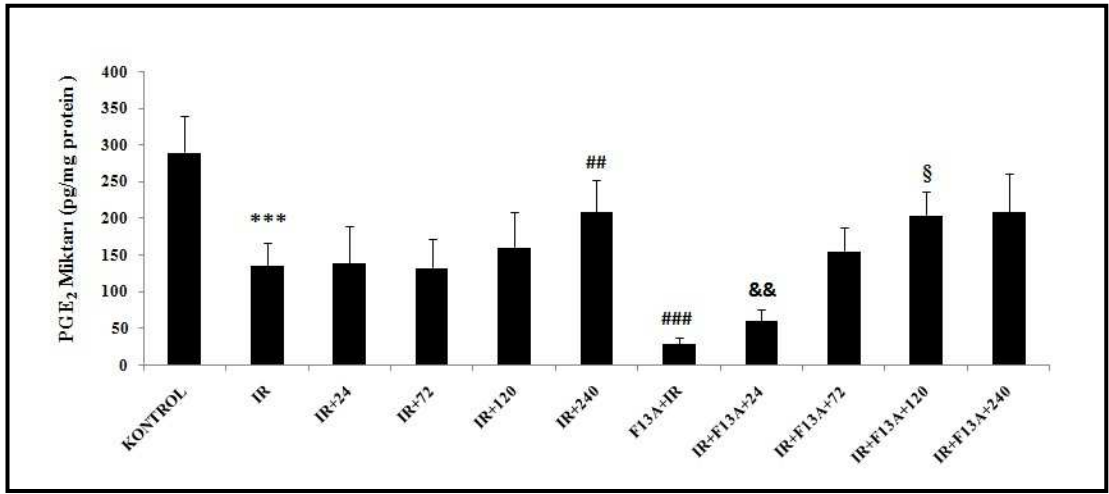
Şekil 4.6. NOx Miktarı

- *** $p < 0.001$ Kontrol'den fark
$p < 0.001$ I/R'dan fark
& $p < 0.05$ I/R+24'den fark
@ $p < 0.05$ I/R+72'den fark
§§ $p < 0.01$ I/R+120'den fark
αα $p < 0.01$ I/R+240'dan fark

4.7. Prostaglandin E₂ Miktarı

I/R uygulanan hayvanların mide dokusundaki PGE₂ miktarının (135.7 ± 31.04 pg/mg protein), kontrol grubuna göre (290.4 ± 50 pg/mg protein) önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.001$). I/R uygulamasından sonra 240. saatte tekrar kontrol seviyesine ulaşmıştır (208 ± 43.2 pg/mg protein, $p < 0.01$).

I/R'a bağlı olarak azalan PGE₂ miktarının, I/R'dan önce F13A uygulaması yapıldığında daha da azaldığı gözlenmiştir (29.7 ± 8.3 pg/mg protein, $p < 0.001$). I/R'u takiben iyileşme sürecinde F13A uygulaması yapılan gruplarda PGE₂ miktarı, F13A uygulaması yapılmayan kontrolleri ile karşılaştırıldığında 24. saatte anlamlı ölçüde düşük iken, 72 ve 240. saatlerde ise anlamlı fark bulunamamıştır. (Şekil 4.7.)



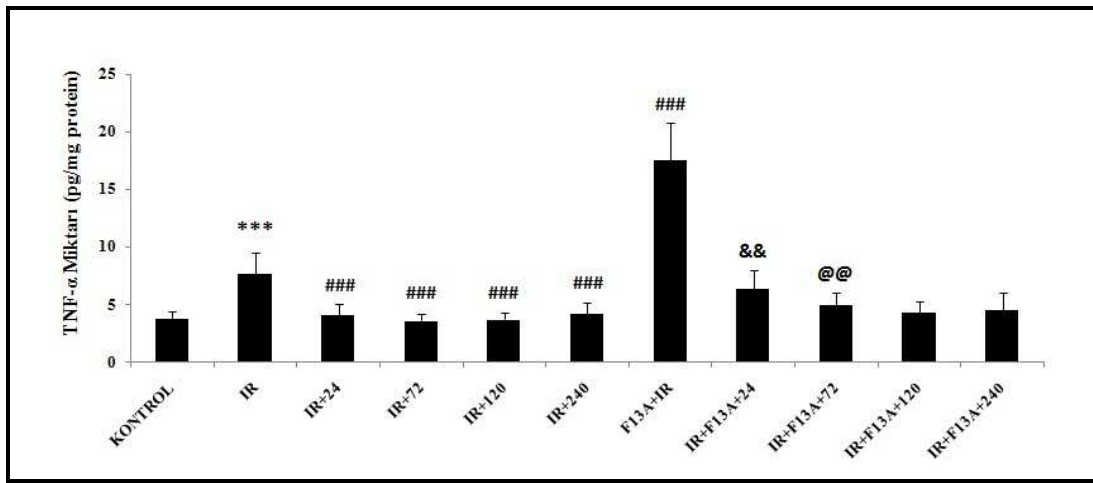
Şekil 4.7. PGE₂ Miktarı

- *** $p < 0.001$ Kontrol'den fark
- ## $p < 0.01$ I/R'dan fark
- ### $p < 0.001$ I/R'dan fark
- && $p < 0.01$ I/R+24'den fark
- § $p < 0.05$ I/R+120'den fark

4.8. Tumor Nekrozis Faktör- α (TNF- α) Miktarı

Mide dokusundaki TNF- α miktarı kontrol grubunda 3.82 ± 0.62 pg/mg protein olarak bulunmuş, I/R uygulaması TNF- α miktarında önemli bir artışa neden olmuştur (7.67 ± 1.86 pg/mg protein, $p < 0.001$). I/R'un neden olduğu artış, iyileşme sürecinde 24. saatten itibaren 72, 120 ve 240. saatlerde anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla 4.06 ± 1.03 pg/mg protein, 3.60 ± 0.62 pg/mg protein, 3.71 ± 0.54 pg/mg protein, 4.18 ± 0.99 pg/mg protein, $p < 0.001$).

F13A, I/R'dan önce uygulandığında, I/R'un sebep olduğu TNF- α artışını daha da artırmıştır (17.58 ± 3.19 pg/mg protein, $p < 0.001$). I/R'u takiben iyileşme sürecinde F13A uygulanan 24 ve 72. saat gruplarında F13A uygulaması yapılmamış kontrollerine göre anlamlı ölçüde TNF- α artışı gözlenmiştir (6.41 ± 1.60 pg/mg protein, 4.96 ± 1.03 pg/mg protein $p < 0.01$). (Şekil 4.8.)



Şekil 4.8. TNF- α Miktarı

- *** $p < 0.001$ Kontrol'den fark
$p < 0.001$ I/R'dan fark
&& $p < 0.01$ I/R+24'den fark
@@ $p < 0.01$ I/R+72'den fark

4.9. Nükleer Faktör Eritroid-2 ile ilişkili Faktör 2 (Nrf2) İmmün Reaktivitesi

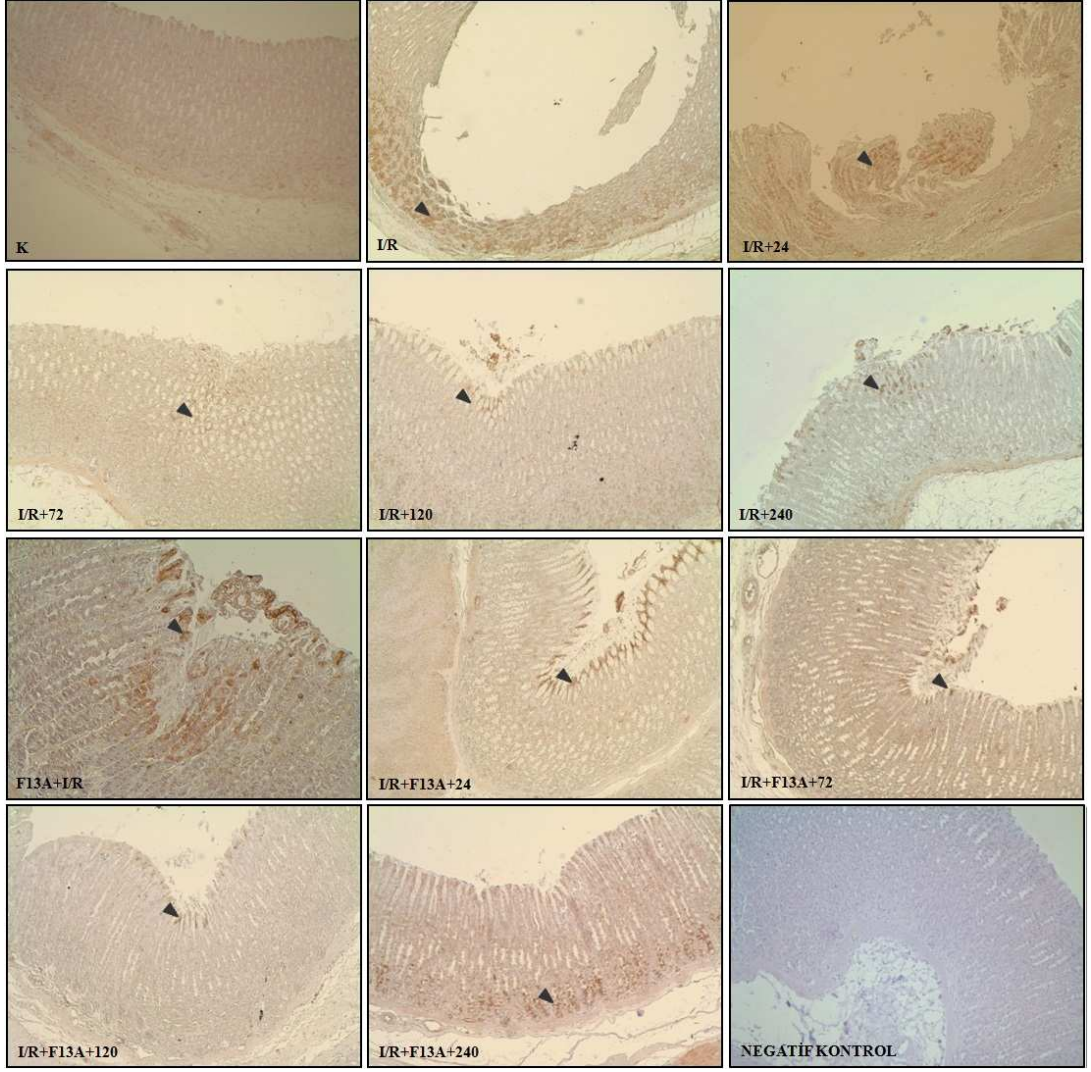
Mide lümen epitelinde Nrf2 reaktivitesi saptanmamış olmasına karşın, midenin bez, endotel ve kas dokusunda yoğun pozitif, stromada ise pozitif reaksiyon gözlenmiştir. I/R ve I/R sonrası kas ve stroma dışındaki diğer bölgelerde Nrf2 ekspresyonunun değişmediği gözlenmiştir. I/R sonrasında kas ve stroma bölgesinde Nrf2 immün reaktivitesinde bir miktar azalma tespit edilmiştir.

F13A verilen ve I/R oluşturulan sıçanlarda bez ve stroma dışındaki bölgelerde Nrf2 ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 4.1. ve Şekil 4.9.)

Mide Bölgeleri	GRUPLAR										
	kontrol	I/R	I/R + 24 saat	I/R + 72 saat	I/R + 120 saat	I/R + 240 saat	F13A + I/R	F13A + I/R + 24 saat	F13A + I/R + 72 saat	F13A + I/R + 120 saat	F13A + I/R + 240 saat
Epitel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bez	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
Endotel	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Kas	++	0	(+)	(+)	0	++	+	0	0	+	+
Stroma	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)

Tablo 4.1. Nrf2 İmmün Reaktivitesinin Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi

- 0 : negatif
(+) : zayıf pozitif
+ : pozitif
++ : yoğun pozitif
+++ : çok yoğun pozitif

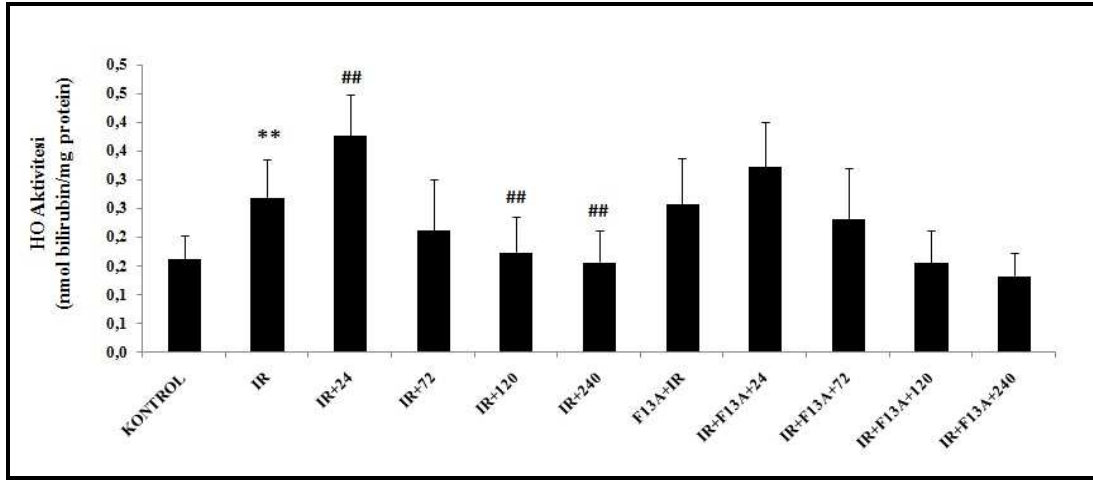


Şekil 4.9. Nrf2 İmmünreaktivitesi Fotoğrafları (Büyütme 100X)

4.10. Hemoksijenaz (HO) Aktivitesi

Total HO enzim aktivitesi kontrol grubunda 0.162 ± 0.041 nmol bilirubin/mg protein olarak ölçülmüş, I/R grubunda enzim aktivitesi 0.269 ± 0.066 nmol bilirubin/mg protein değerine ulaşmıştır ($p < 0.01$). I/R uygulamasından 24 saat sonra, enzim aktivitesinde I/R grubuna göre anlamlı ölçüde artış gözlenirken (0.377 ± 0.071 nmol bilirubin/mg protein, $p < 0.01$), I/R'dan sonra 120. saatte aktivitenin kontrol seviyesine indiği ve 240. saatte kontrol seviyesinde olduğu gözlenmiştir (sırasıyla 0.174 ± 0.063 nmol bilirubin/mg protein, $p < 0.01$, 0.157 ± 0.056 nmol bilirubin/mg protein, $p < 0.01$).

I/R'dan önce verilen F13A, enzim aktivitesinde I/R grubuna göre fark yaratmamıştır. I/R'dan sonra iyileşme sürecinde F13A uygulanan gruplar ile F13A uygulaması yapılmayan kontrolleri arasında anlamlı fark tespit edilememiştir. (Şekil 4.10.)



Şekil 4.10. HO Aktivitesi

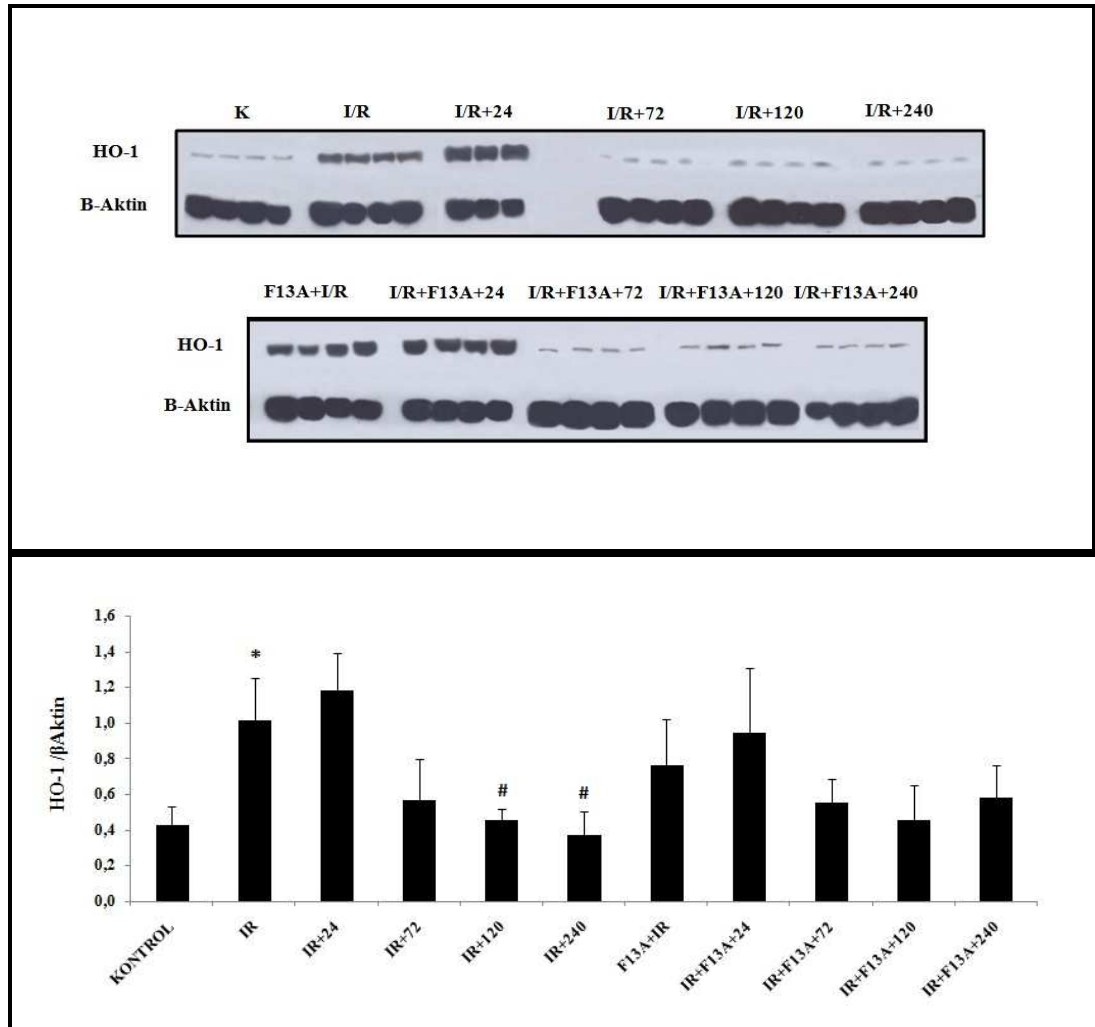
** $p < 0.01$ Kontrol'den fark

$p < 0.01$ I/R'dan fark

4.11. Hemoksijenaz-1 (HO-1) Protein Ekspresyonu

Mide dokusundaki HO-1 protein ekspresyonunun β -Aktin protein ekspresyonuna oranı kontrol grubunda 0.425 ± 0.106 iken, I/R uygulaması HO-1 ekspresyonunda önemli bir artışa neden olmuştur (1.014 ± 0.235 , $p < 0.05$). I/R'un neden olduğu artış, iyileşme sürecinde 72. saatten itibaren azalmaya başlamış, 120 ve 240. saatlerde anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla 0.457 ± 0.062 , 0.373 ± 0.128 , $p < 0.05$).

I/R'dan önce verilen F13A, HO-1 protein ekspresyonunda I/R grubuna göre fark yaratmamıştır. I/R'dan sonra iyileşme sürecinde F13A uygulanan gruplar ile F13A uygulaması yapılmayan kontrolleri arasında anlamlı fark tespit edilememiştir. (Şekil 4.11.)



Şekil 4.11. HO-1 Protein Ekspresyonu

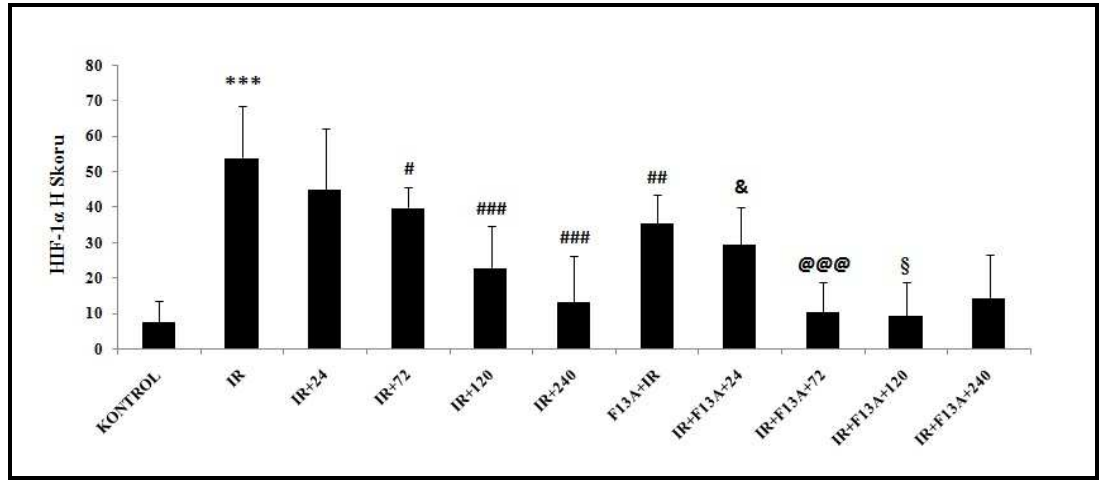
* $p < 0.05$ Kontrol'den fark.

$p < 0.05$ I/R'dan fark.

4.12. Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 α (HIF-1 α) İmmün Reaktivitesi

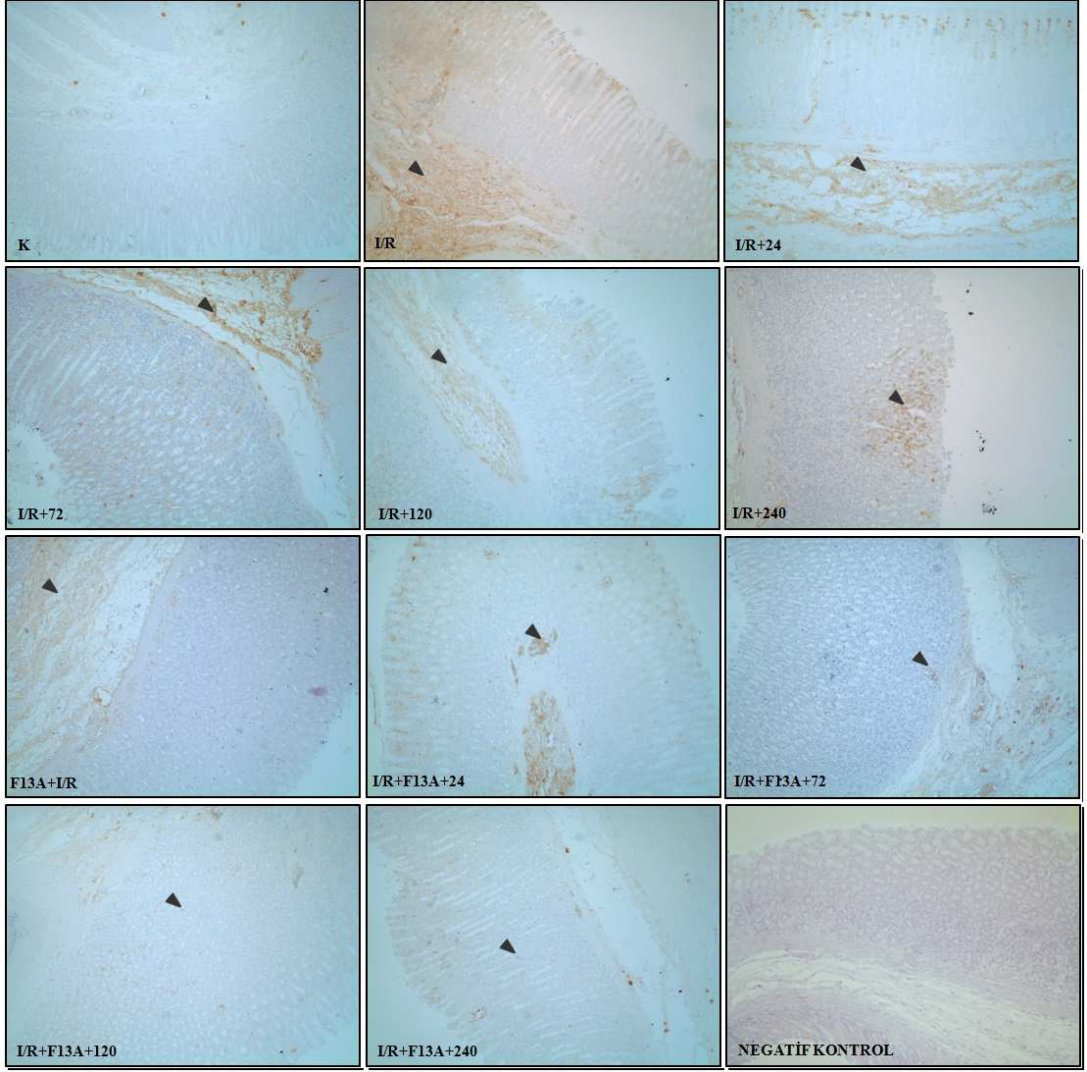
Mideden alınan kesitlerde kontrol grubunda HIF-1 α immün reaktivitesi gözlenen hücre sayısı 7.8 ± 5.9 hücre iken, I/R uygulaması HIF-1 α immün reaktivitesinde anlamlı artışa sebep olmuştur (54 ± 14.5 hücre, $p < 0.001$). I/R'un neden olduğu artış, iyileşme sürecinde 24. saatten itibaren azalmış, I/R'dan sonra 72, 120 ve 240. saatlerde anlamlılık tespit edilmiştir (sırasıyla 40 ± 5.8 , $p < 0.05$, 23 ± 11.8 , $p < 0.001$, 13.5 ± 12.9 $p < 0.001$).

I/R'dan önce F13A uygulaması I/R grubuna göre reaktivitede azalmaya neden olmuştur. (35.5 ± 8 $p < 0.01$). I/R'dan sonra F13A uygulanan 24, 72 ve 120. saat iyileşme gruplarında immün reaktivitenin, F13A uygulaması yapılmayan kontrollerine göre anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (sırasıyla 29.5 ± 10.7 , $p < 0.05$, 10.5 ± 8.6 $p < 0.001$, 9.5 ± 9.3 $p < 0.05$). (Şekil 4.12.1.)



Şekil 4.12.1. HIF-1 α İmmün Reaktivitesi

- *** $p < 0.001$ Kontrol'den fark
- # $p < 0.05$ I/R'dan fark
- ### $p < 0.001$ I/R'dan fark
- & $p < 0.05$ I/R+24'den fark
- @@@ $p < 0.001$ I/R+72'den fark
- § $p < 0.05$ I/R+120'den fark.

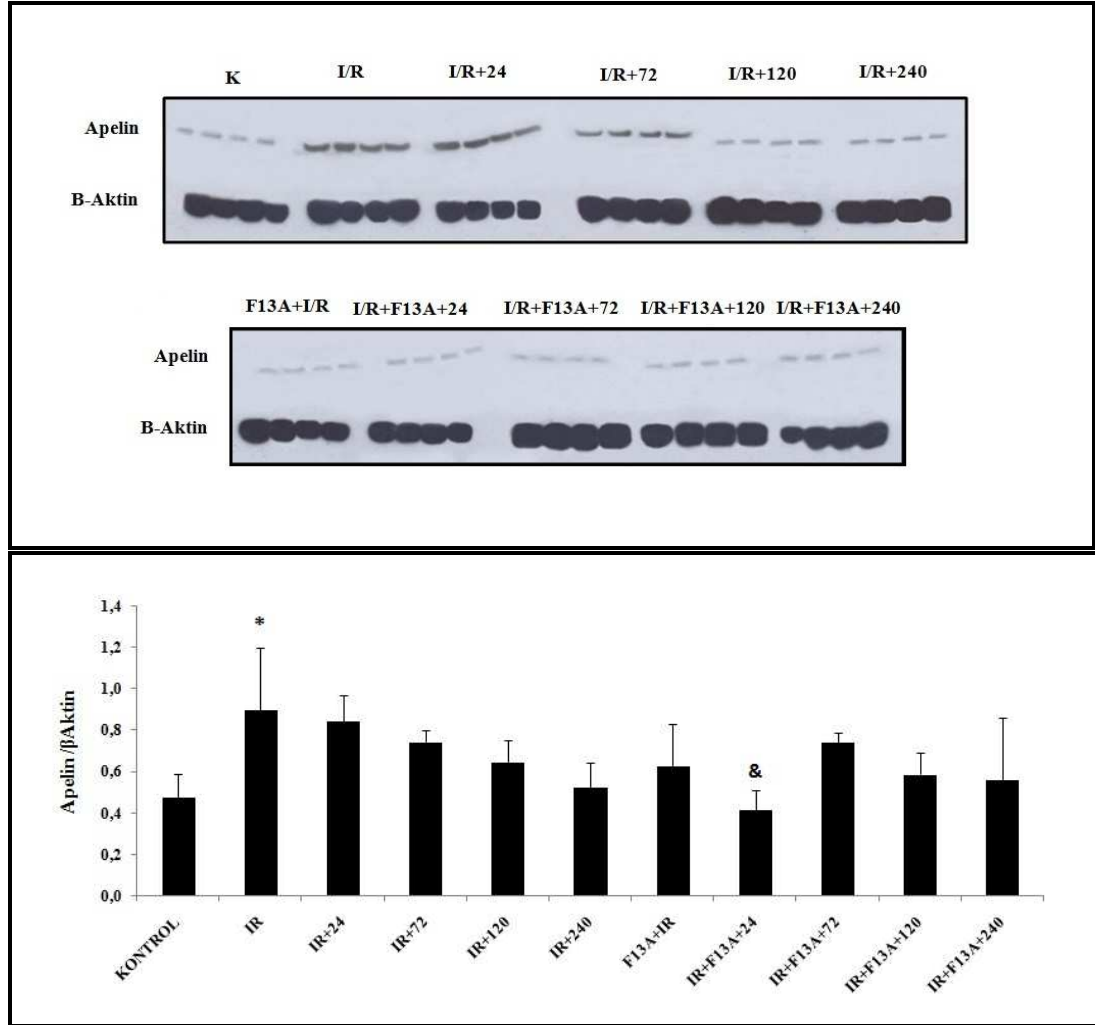


Şekil 4.12.2 HIF-1 α İmmünreaktivitesi Fotoğrafları (Büyütme 100X)

4.13. Apelin Protein Ekspresyonu

Mide dokusundaki apelin proteininin β -Aktin proteinine oranı kontrol grubunda 0.474 ± 0.113 iken, I/R uygulaması apelin proteininin ekspresyonunda önemli bir artışa neden olmuştur (0.899 ± 0.300 pg/mg protein, $p < 0.05$). I/R'un neden olduğu artış, iyileşme sürecinde 24. saatten itibaren 72, 120 ve 240. saatlerde azalmış ancak I/R grubuna göre istatistiksel fark tespit edilememiştir (sırasıyla 0.842 ± 0.127 , 0.744 ± 0.058 , 0.648 ± 0.107 , 0.523 ± 0.123).

I/R'u takiben iyileşme sürecinde F13A uygulanan 24. saat grubunda F13A uygulaması yapılmamış kontrolüne göre anlamlı ölçüde apelin ekspresyonu azalışı gözlenmiştir (0.417 ± 0.094 , $p < 0.05$). (Şekil 4.13.)



Şekil 4.13. Apelin Protein Ekspresyonu

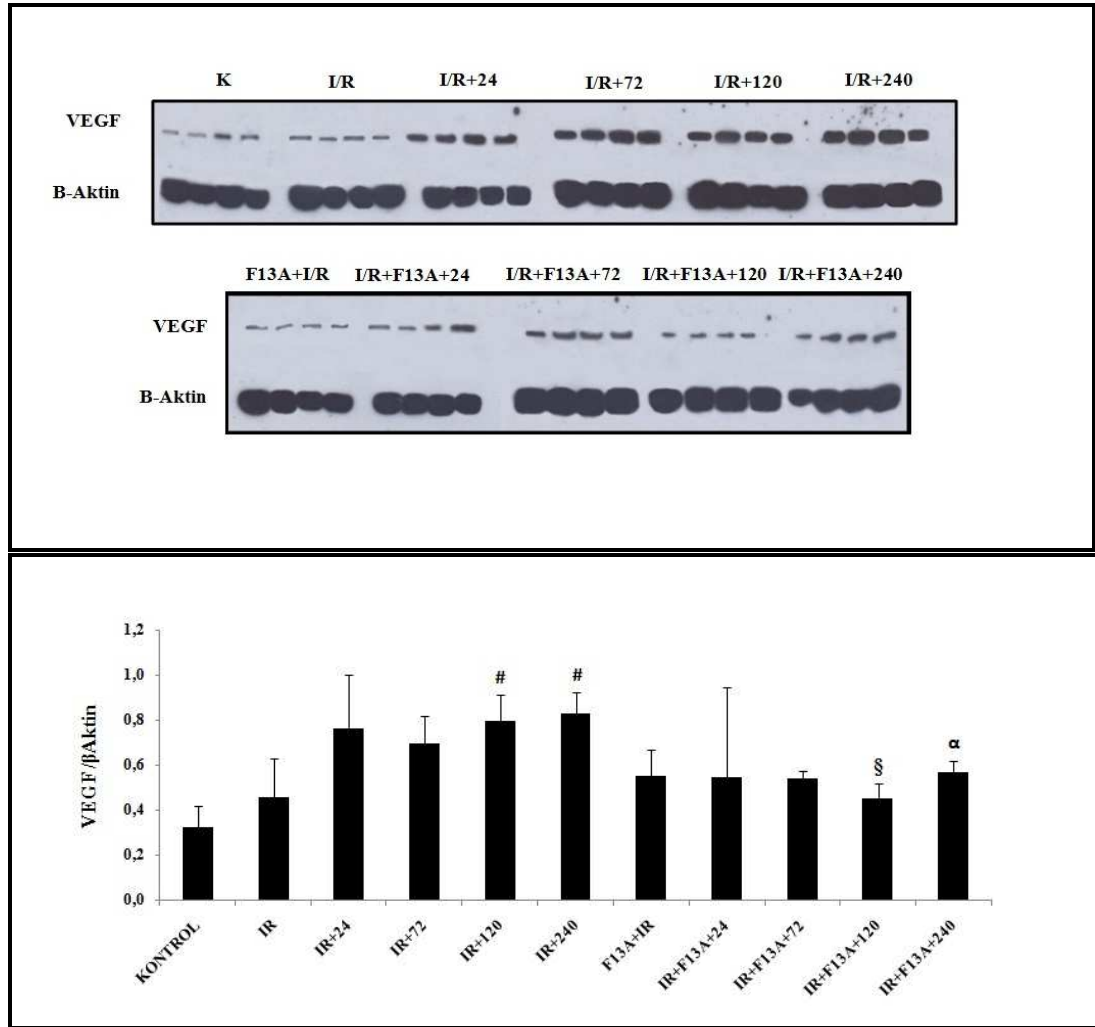
* $p < 0.05$ Kontrol'den fark.

& $p < 0.05$ I/R+24'den fark.

4.14. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Protein Ekspresyonu

Mide dokusundaki VEGF proteininin ekspresyonunda kontrol grubu (0.323 ± 0.095) ve I/R grubu (0.455 ± 0.172) arasında fark tespit edilememiştir. I/R grubu ile karşılaştırıldığında I/R'dan sonra iyileşme gruplarında VEGF ekspresyonunda artış gözlenmiş, 120. ve 240. saatlerdeki artış anlamlı bulunmuştur (sırasıyla 0.796 ± 0.113 , 0.828 ± 0.095 , $p < 0.05$).

I/R'dan sonra iyileşme sürecinde F13A uygulanan gruplarda F13A uygulaması yapılmamış kontrollerine göre azalma eğilimi gözlenmiş, 120. ve 240. saatlerde anlamlı ölçüde azalma tespit edilmiştir (sırasıyla, 0.452 ± 0.065 , 0.569 ± 0.05 , $p < 0.05$). (Şekil 4.15.2).



Şekil 4.14. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Protein Ekspresyonu

- # $p < 0.05$ I/R'dan fark.
§ $p < 0.05$ I/R+120'den fark.
α $p < 0.05$ I/R+240'dan fark.

4.15. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü İmmünreaktivitesi

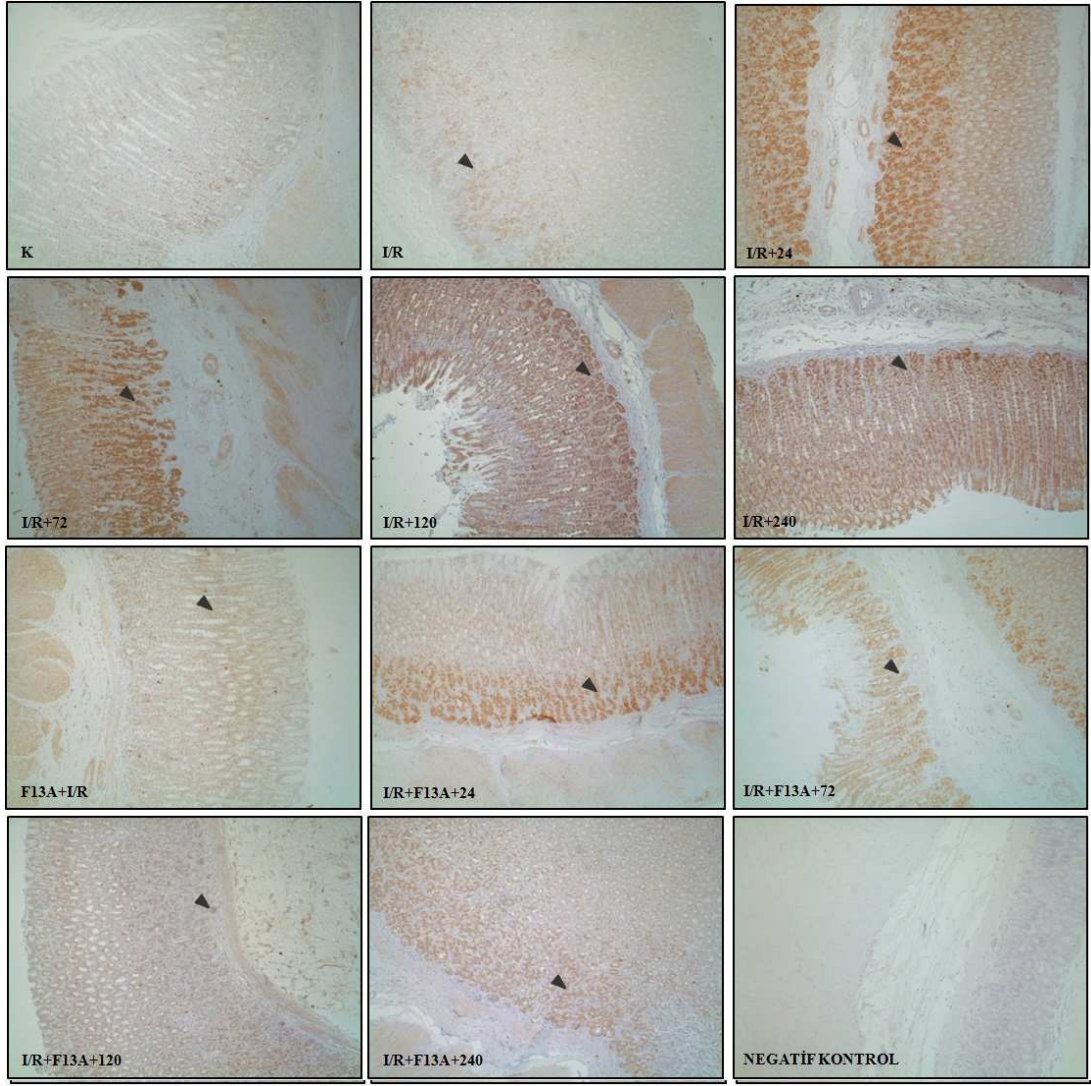
Sıçan midelerinde gerçekleştirilen VEGF immünohistokimyası sonuçlarına göre sıçanların mide lümen epitelinde VEGF reaktivitesi göstermemiştir. Kontrol ve I/R gruplarında VEGF ekspresyonu benzer şekilde, bez ve endotelde pozitif, kas ve stromada zayıf pozitif reaksiyon gözlenmiştir. I/R'dan sonra 24. saatte ise bezler ve stromadaki reaksiyonda artış gözlenmiştir. I/R'dan sonra 72., 120. ve 240. saatte bezlerdeki apelin reaksiyonunda artış saptanmıştır.

F13A verilen ve I/R oluşturulan grupta bezlerdeki reaksiyon artmış, kas ve stromadaki reaksiyon azalmıştır. (Tablo 4.2.)

Mide Bölgeleri	GRUPLAR										
	kontrol	I/R	I/R + 24 saat	I/R + 72 saat	I/R + 120 saat	I/R + 240 saat	F13A + I/R	F13A + I/R + 24 saat	F13A + I/R + 72 saat	F13A + I/R + 120 saat	F13A + I/R + 240 saat
Epitel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bez	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Endotel	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)
Kas	(+)	(+)	(+)	+	+	+	0	(+)	+	++	++
Stroma	(+)	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	+	0

Tablo 4.2. VEGF İmmün Reaktivitesinin Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi

- 0 : negatif
(+) : zayıf pozitif
+ : pozitif
++ : yoğun pozitif
+++ : çok yoğun pozitif



Şekil 4.15. VEGF İmmünreaktivitesi Fotoğrafları (Büyütme 100X)

TARTIŞMA

Apelin'in mide mukozasında I/R'a bağılı hasar oluşumundaki koruyucu etkisini ve iyileşme mekanizmalarındaki rolünü belirlemek amacıyla yapılan çalışmamızda, 30 dakika iskemi ve 180 dakika reperfüzyon modeli uygulanmış, apelinin etkisini ortadan kaldırmak için APJ reseptör antagonisti F13A kullanılmıştır. Çalışmamızın sonucunda, apelinin I/R hasarına karşı mide mukozasını koruduğu gösterilmiş olup, APJ reseptör antagonistinin kullanıldığı gruplarda, mukozal lezyonların tamamen iyileşmesi için geçen sürenin daha uzun olduğu gözlenmiştir.

I/R hasarı hipoksi ve proinflatuar yolakların aktivasyonu ile ortaya çıkan akut mide lezyonları için iyi bilinen bir modeldir. Çöliak arterin kapatılması ile oluşturulan iskemi mitokondrideki ATP yapımının azalması, hücrel iyon homeostazisinin bozulması ve hücre membranının selektif permeabilitesinin bozulması ile anoksik hücre tahribatına neden olmaktadır. Böylece zayıflamış olan mide mukozal bariyeri, asit geri emilimini engelleyemediği için mukoza daha kolay tahrip olabilir hale gelmektedir. Reperfüzyona bağılı olarak dokunun yeniden kanlanması durumunda aktive olmuş hücrelerden salınan çeşitli mediatörler ve reaktif oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunu arttırıp, inflamatuar ve apopitotik süreçleri başlatarak hücre ölümüne ve mukozal hasara neden olmaktadır. Reperfüzyonun başlangıcında yüzeysel oluşan lezyonlar, dokuda nötrofil birikimi ile birlikte ülserleşmiş lezyonlar haline dönüşmektedir.

Qiao ve ark.ları tarafından yapılan çalışmada, midede I/R'a bağılı şiddetli lezyonların reperfüzyonun başlangıç aşamasında olduğu, reperfüzyonun 1. saatinde en fazla miktarda saptandığı bildirilmiştir. Reperfüzyondan sonra süre uzadıkça lezyonlar azalmakta ve 72. saatte tamamen iyileşme gözlenmektedir [253]. Bizim çalışmamızda da lezyon indeksi bulgularımız bu bulgulara paralel nitelikte olup, en fazla lezyon I/R'dan sonra tespit edilmiş, I/R'dan sonra 120. ve 240. saatlerde hasarın tamamen iyileştiği dikkati çekmiştir. Mide mukozasının hasarlanma sonrası kendi kendini tamir etme özelliği çok iyi gelişmiştir. Bu özelliğin, I/R hasarı sonrasında muhtemelen proliferatif hücrelerin miktarının artması ve apopitozisin inhibisyonuna bağılı olabileceğini belirten araştırmacılar bulunmaktadır [253]. Reperfüzyonun başlangıç aşamasında hızlı apopitotik değişiklikler olurken, hücrelerin proliferasyonu baskılanmaktadır. Reperfüzyonun süresi uzadıkça apopitozis azalmakta, hücre proliferasyonu artmakta ve böylece mukoza tamir edilmektedir [253]. Mukozal hasarın iyileşmesinde hücre proliferasyonunun önemli bir yeri vardır. Mide mukozasında hücre proliferasyonunu ve aynı zamanda midenin egzokrin ve endokrin fonksiyonunu etkilediği bilinen apelinin iyileşme sürecinde rol alabileceği düşünülmüştür. Liu ve ark.ları tarafından yapılan bir çalışmada apelinin, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu fosfo-ERK $\frac{1}{2}$ ekspresyonu aracılığı ile arttırdığı ve apopitozisi inhibe ettiği gösterilmiştir [254]. Bu düşünceden yola çıkarak yaptığımız çalışmada, apelin reseptör antagonisti F13A'nın uygulanmasının, I/R'a bağılı hasarlanmanın daha da şiddetlenmesine neden olduğu gösterilmiştir. F13A

iyileşme sürecinde de etki göstermiş, mukoza iyileşmesini geciktirmiş, I/R sonrası 240. saatte bile lezyon tespit edilmiştir. Apelin etkisinin ortadan kaldırılması halinde daha fazla mukozal hasar görülmekte ve hasar iyileşmesi gecikmektedir.

Mide mukozasının hasara karşı korunma mekanizmasında ve iyileşme sürecinde mukozal kan akımı önemli bir yer tutmaktadır. Mukozanın kanlanması, oksijen ve besinin hücrelere ulaşması, zararlı maddelerin de ortamdan uzaklaştırılması için gereklidir. Zararlı etkenle karşılaşılması halinde, mide mukozasından salgılanan bazı mediatörler aracılığı ile mukozal kan akımının arttığı bilinmektedir. Zararlı etkenlerin varlığına bağlı olarak kan akımı artışının sağlanamaması nekroza yol açmaktadır. Bulgularımız, I/R sonrasında % 68,66 oranında azalan mide mukozal kan akımının, iyileşme süresince artarak kontrol grubu düzeyine ulaştığını göstermektedir. F13A, mukozal kan akımındaki I/R'a bağlı azalmayı daha belirgin hale getirmiştir. F13A kullanımı, I/R sonrasındaki iyileşme sürecindeki mukozal kan akımı artışını baskılamıştır. Mide mukozal kan akımının düzenlenmesinde apelinin rolü olduğunu gösteren bu bulgulara dayanarak, apelinin mide mukozasındaki hasarlanma sonrasında kan akımını arttırarak iyileşmeye katkıda bulunduğu söylenebilir. Apelinin iletim arterlerinde, direnç damarlarında ve venlerde endotel bağımlı vazodilatasyona neden olduğu bilinmektedir. Bu etki eNOS fosforilasyonunun ve transkripsiyonunun stimülasyonuna bağlıdır. NOS aktivitesinin inhibisyonu apelinin vazodilatör etkisinin baskılanmasına neden olmaktadır [255-256]. Ayrıca insan meme arterlerinde apelinin prostasiklin aracılığı ile vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir [257]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda apelinin koroner damarlarda da vazodilatasyon yaptığı ve miyokard iskemisine karşı koruyucu etkisinin buna bağlı olduğu ileri sürülmüştür [258]. Apelinin etkisinin, reseptör antagonisti kullanılarak inhibe edilmesi sonucu mukozal kan akımının azalması lezyon iyileşmesinin gecikmesine paralel olup, bu bulgumuz diğer iştah düzenleyici peptidler ile yapılan çalışmalarla uyumludur [259-260].

Mukozal kan akımının azalmasının yanı sıra, nötrofil aktivasyonu ve mukozaya göç eden bu hücrelerin oluşturduğu süperoksit radikali (O_2^-), midede I/R hasarının önemli bir nedenidir [179]. I/R sonucu salgılanan çeşitli mediatörlerin etkisi ile aktive olan nötrofiller mikrovasküler permeabilitenin artışına bağlı olarak mukozaya göç etmektedirler. Hücreler içerdikleri NADPH oksidaz enzimi yardımı ile sentezledikleri reaktif oksijen radikallerini ortama salarak hücrel lipitlerin peroksidasyonuna yol açmakta ve ülserojenik lezyonların oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Nötrofiller azurofilik primer granüllerinde miyeloperoksidaz enzimi içermekte ve bu enzimin aktivitesi dokudaki nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Deneysel I/R hasarı oluşturulmuş mide dokusunda MPO aktivitesinin arttığı çeşitli çalışmalara paralel olarak çalışmamızda da gözlenmiştir. Daha önceki çalışmaları [4] destekler nitelikte, reperfüzyonun 24. saatinde maksimal düzeyde saptanan MPO aktivitesi, azalarak reperfüzyonun 120. saatinde kontrol değerine dönmüştür. F13A, I/R periyodunun hemen arkasından saptanan MPO aktivitesi artışına etki etmemiş, ancak 24. saatteki maksimal nötrofil infiltrasyonunu engellemiştir. Bu durum, apelinin bazı kemotaktik faktörlerin salımını arttırdığını düşündürmüştür. F13A kullanılan gruplarda iyileşme sürecinde dokudaki MPO aktivitesinin azalmaması nötrofil aktivasyonunun ve inflamatuvar sürecin devam ettiğinin bir göstergesidir. F13A kullanılan gruplarda lezyon

iyileşmesinin gecikmesi bu bulgu ile ilişkilendirilebilir. İskemi sonrasında reperfüze edilen mide dokusunda reperfüzyonun 24. saatinde gözlenen maksimal MPO aktivitesinin, F13A kullanımına bağlı olarak baskılandığını gösteren bulgumuz, apelinin, nötrofil infiltrasyonunda görevli adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırıcı özelliğini akla getirmektedir. Apelinin NF-kB/JNK sinyal yolağını kullanarak VCAM-1 ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir. VCAM-1 ve ICAM-1 endotel hücrelerine lökosit adezyonunu arttırmaktadır. Adezyon artışı nötrofil infiltrasyonu ile sonuçlanmaktadır [261]. Bu bulgulardan yola çıkarak, apelin etkisinin önlenmesi sonucu, VCAM-1 ve ICAM-1 ekspresyonunun baskılanması ile dokuya nötrofil göçünün azaldığı sonucuna varılmıştır.

Dokuda lipid peroksitler (4HNE-MDA)'in varlığı oksidatif stresin göstergesidir. Oksidatif strese neden olan serbest oksijen radikallerinin, I/R hasarında anahtar rol oynadığı bilinmektedir [17]. Bizim çalışmamızda da I/R etkisi ile lipid peroksidasyonunun arttığı, reperfüzyonun 24. saatinden itibaren lipid peroksitlerin miktarının azaldığı gözlenmiştir. F13A, lipid peroksitlerin I/R'a bağlı artışını engellemiş ve lezyonların iyileşme sürecinde de herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Zeng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada [262], hipoksi ve reoksijenasyon uygulanmış kardiyomiyositlerde, apelinin reaktif oksijen radikali yapımını ve MDA miktarını azalttığı gösterilmiş olmasına karşın, bulgularımız bu çalışmayı desteklememektedir. Buna karşı çalışmamızda elde ettiğimiz, apelin etkisinin ortadan kaldırılması ile doku MPO aktivitesi ve MDA miktarındaki azalmayı gösteren bulgularımız birbirini destekler niteliktedir.

Mide mukozasındaki nitrit/nitrat konsantrasyonu (NO_x) NOS aktivitesine bağlı NO yapımının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çünkü dokuda NOS etkisi ile yapılan NO hızla nitrit ve nitrata parçalanır [263-264]. Çalışmamızda beklentimize uygun şekilde I/R uygulanan mide dokusunda NO_x miktarının arttığı, iyileşme sürecinde 24. saatten itibaren azaldığı tespit edilmiştir. NOS izoformlarından, eNOS ve nNOS Ca⁺⁺'a bağlı yapısal formlar olup, doku homeostazisinden sorumludur. Ca⁺⁺'a bağlı olmayan indüklenebilir NOS formu ise iNOS'tur [265-266]. Yapısal NOS'lar normal koşullarda dokularda az miktarda (pmol/L düzeyinde) NO sentezi yaparlar. Sindirim sisteminde nNOS ile oluşan NO düz kasların gevşemesini kontrol ederken, trombositler ve endotel hücrelerinde bulunan eNOS, mukozal kan akımı, epitel sekresyonu ve bariyer fonksiyonunu düzenleyerek mukoza bütünlüğünün korunmasında rol oynamaktadır. eNOS kökenli NO'nin lökosit, trombosit ve mast hücre adezyonunun inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir [266]. iNOS izoformunun aktivitesi, sitokinler gibi uyarıcı faktörlerle transkripsiyonel düzeyde regüle edilmektedir. iNOS aracılı NO yapımı nmol/L düzeyinde olup, iNOS I/R gibi sindirim sistemini etkileyen patolojik olaylarda büyük miktarda NO yapımına neden olmaktadır [267-268]. iNOS aracılığı ile yapılan yüksek konsantrasyonda NO, ONOO⁻ radikalini oluşturarak IR hasarının patogenezesinde rol oynamaktadır. Oysaki iyileşme döneminde eNOS aracılığı ile yapılan az miktardaki NO, mukus HCO₃⁻ yapımını arttırıp, mukozal kanlanmayı düzenleyerek ve endotel tabakasına lökosit adezyonunu engelleyerek sindirim sistemi mukozasında oluşan tahribatın ortadan kaldırılmasında önemli rol

oynamaktadır. Aynı zamanda hücre koruyucu ve antiinflamatuvar ajan olarak, midede PG'lerin etkisini güçlendiren bir mediatördür [269].

Apelin özellikle eNOS ekspresyonunu arttırarak vazodilatör etki göstermektedir [270]. Bu nedenle APJ reseptörünün bloke edilmesi sonucu NO yapımında hafif bir azalma gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Apelinin I/R'a bağlı iNOS aracılı NO etkilememesi nedeni ile bu sonucun elde edildiği düşünülmüştür.

Prostaglandinler mide mukozasının savunma mekanizmasında yer alan önemli bir bileşendir. Mide mukozasında nekroza neden olan ülserojenik etkenlere karşı sürekli olarak yapılan PGE₂ ve PGI₂ mukozal bütünlüğünün kalıcılığı için esastır [109, 261]. PGE₂'nin mide asit salgısını inhibe ettiği, mukozal kan akımını arttırdığı, mukus HCO₃⁻ tabakasını güçlendirdiği, epitel tamiratını hızlandırdığı ve mukozal iyileşmeye katkıda bulunduğu bilinmektedir [109]. I/R'a maruz kalan mide dokusunda PGE₂ miktarının azaldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [3]. Bizim çalışmamızda da I/R'a bağlı olarak midenin PGE₂ miktarını azalmış ve iyileşme süresince artarak reperfüzyonun 10. gününde kontrol düzeyine ulaşmıştır. F13A, I/R'a bağlı PGE₂ miktarındaki azalışı daha belirginleştirmiştir. Ancak iyileşme sürecindeki PGE₂ artışı daha hızlı olmuştur. Apelinin PGE₂ yapımına etkisi ile ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Ancak HIF-1 α 'nın COX aktivitesini arttırdığı bilinmektedir. Apelinin HIF-1 α üzerine olan artırıcı etkisi göz önüne alındığında F13A kullanımına bağlı olarak PGE₂ miktarındaki azalışın HIF-1 α ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür.

I/R sırasında inflamasyon cevabını düzenleyen mediyatörler epitel hücrelerinden veya lamina propriada bulunan lenfosit, mast hücreleri gibi hücreler tarafından yapılmaktadır. Bu hücrelerin mukozal savunma mekanizmasının bileşenlerini etkilediği bilinmektedir. IL-1 β ve TNF- α inflamasyonun erken evresinde salınan sitokinlerdir. TNF- α mide mukozası hasarı oluşurken salgılanan bir sitokin olup, mukozal hasarın birçok basamağında anahtar rol oynamaktadır [261, 271]. Mide mukozasında I/R hasarı inflamatuvar bir süreç olup, TNF- α salınımına neden olmaktadır. Bu nedenle I/R'a bağlı olarak mide dokusunda TNF- α düzeyini artmış olarak bulmamız diğer araştırmacıların çalışmalarını destekler niteliktedir [272]. I/R'a maruz kalmış mide dokusunda TNF- α miktarının reperfüzyonun 24. saatinden itibaren kontrol düzeyinde olduğu saptanmıştır. TNF- α 'nın epitel hücre proliferasyonunu artırarak mukozal tamiratı güçlendirdiği gösterilmiştir. Ancak, aşırı miktarda artan TNF- α , hücrelerde apoptotik süreci tetiklemektedir [273] APJ reseptör antagonistinin kullanılması, mide dokusundaki TNF- α 'nın 4.5 kat artmasına neden olmuştur, ancak iyileşme sürecinde azalarak reperfüzyonun 120. saatinden itibaren kontrol düzeyine ulaşmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar apelinin TNF- α miktarını azalttığını ve TNF- α miktarındaki F13A'ya bağlı aşırı yükselmenin, lezyon oluşumuna ve iyileşmenin gecikmesine katkıda bulunmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Hemoksijenazın indüklenebilir formu olan HO-1'in, oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. HO-1 antioksidan etkisi nedeni ile mukozal dokunun rejenerasyonunu sağlamakta ve oksidasyona karşı direnci artırmaktadır. HO-1'in inhibisyonu mide dokusunda lezyonların artışına neden olur

[180]. HO immün reaktivitesi, 4-HNE immün reaktivitesi ile birlikte aynı bölgede bulunmaktadır. Çalışmamızda I/R'a maruz kalan mide dokusunda HO-1 ekspresyonunun ve aktivitesinin, 4-HNE-MDA konsantrasyonundaki artışa eşlik ettiği gözlenmiştir. HO aktivitesindeki artış reperfüzyonun 24. saatinde daha belirgin olarak saptanmıştır. reperfüzyonun 120. saatinden itibaren HO-1 ekspresyonu ve HO aktivitesi kontrol değerine dönmüştür. Apelin reseptör antagonistinin kullanılmasının, I/R uygulanan mide dokusundaki HO-1 ekspresyonu ve HO aktivitesine ilave bir etkisi olmamıştır. Elde ettiğimiz bulgu, apelinin mide mukozası koruyucu etkisinde HO yolağının rolünün olmadığını göstermektedir.

İnflamasyonda rol oynayan sitokinler veya hipoksi tarafından aktivitesi artırılan HIF-1 α 'nın VEGF, apelin gibi genleri regüle ettiği bilinmektedir.

Çalışmamızda, I/R uygulanan mide dokusunda HIF-1 α ekspresyonunun, apelin ekspresyonuna paralel olarak arttığı, iyileşme sürecinde azalarak reperfüzyonun 240. saatinde her iki protein ekspresyonunun kontrol değerine ulaştığı gözlenmiştir. VEGF ekspresyonu ise reperfüzyon sırasında artmış, bu artış, reperfüzyonun 120. ve 240. saatlerinde anlamlı bulunmuştur. F13A uygulanması HIF-1 α ekspresyonundaki I/R'a bağlı artışın daha az olmasına neden olmuştur. Apelinin HIF-1 α ekspresyonunu artırma özelliğine sahip olduğunu gösteren bu bulgumuz literatürle de uyumludur. VEGF ekspresyonunun I/R'dan sonra 120. saatten itibaren ortaya çıkması, iyileşmenin erken döneminde mide dokusundaki reaktif oksijen radikallerinin varlığına bağlı olabilir. Konturek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada reaktif oksijen radikallerinin VEGF yapımını azalttığı gösterilmiştir [260]. F13A'nın apelin ekspresyonuna etkisiz olduğu gözlenmiştir. Mide dokusunda I/R uygulamasından sonra 120. ve 240. saatte gözlenen VEGF ekspresyonundaki artış, F13A uygulaması ile ortadan kalkmıştır. Bu bulguya göre iyileşme sürecinde gözlenen VEGF artışının apelin etkisi ile oluştuğu düşünülebilir. Apelinin etkisinin ortadan kaldırılması VEGF'deki artışı engellemiştir. Buna göre apelinin VEGF aracılığı ile anjiyogenik etki gösterdiği ve mide mukozasındaki I/R hasarının iyileşmesine bu nedenle katkı sağladığı düşünülmüştür.

SONUÇLAR

1. 150 µg/kg/gün dozunda uygulanan APJ reseptör antagonisti F13A'nın I/R'a bağlı hasarın daha da şiddetlenmesine neden olduğu, mukoza iyileşmesini geciktirdiği tespit edilmiştir.
2. Mukozal kan akımında I/R'a bağlı azalmanın, apelinin etkisinin ortadan kaldırılması ile daha belirgin hale gelmesi ve I/R'u takiben iyileşme sürecinde kan akımındaki toparlanmanın F13A varlığında baskılanması, apelinin mukozal kan akımını artırıcı etkisi olduğunu göstermiştir.
3. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, apelinin I/R hasarına karşı mide mukozasını koruyucu ve iyileşmeyi hızlandırıcı etkisinin, mide mukozal kan akımının yanı sıra, mukozal bariyerin bir komponenti olan PGE₂ miktarını artırmasına, yüksek miktarda bulunduğu zaman apoptozisi tetikleyen, proinflatuar bir sitokin olan TNF-α miktarını azaltmasına ve anjiyogeneziste rol oynayan önemli bir faktör olan VEGF miktarını artırmasına bağlı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tarnawski A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci*, 2005; 50 Suppl 1:S24-33.
2. Ueda K., Ueyama T., Yoshida K., Kimura H., Ito T., Shimizu Y., Oka M., Tsuruo Y., Ichinose M. Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008; 295(3):G460-469.
3. Gemici B., Tan R., Ongut G., Izgut-Uysal V.N. Expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric ischemia-reperfusion: role of angiotensin II. *J Surg Res*, 2010; 161(1):126-133.
4. Bulbul M., Tan R., Gemici B., Ongut G., Izgut-Uysal V.N. Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. *Journal of gastroenterology*, 2008; 43(3):202-207.
5. Derin N., Agac A., Bayram Z., Asar M., Izgut-Uysal V.N. Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochem Funct*, 2006; 24(5):437-442.
6. Derin N., Izgut-Uysal V.N., Agac A., Aliciguzel Y., Demir N. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J Physiol Pharmacol*, 2004; 55(3):595-606.
7. Kobayashi S., Nakajima N., Ito Y., Moriyama M. Effects of lansoprazole on the expression of VEGF and cellular proliferation in a rat model of acetic acid-induced gastric ulcer. *Journal of gastroenterology*, 2010; 45(8):846-858.
8. Shujaa N., Zadori Z.S., Ronai A.Z., Barna I., Mergl Z., Mozes M.M., Gyires K. Analysis of the effect of neuropeptides and cannabinoids in gastric mucosal defense initiated centrally in the rat. *J Physiol Pharmacol*, 2009; 60 Suppl 7:93-100.
9. Santin J.R., Lemos M., Klein Junior L.C., Niero R., de Andrade S.F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *J Ethnopharmacol*, 2010; 130(2):334-339.
10. Kitagawa H., Fujiwara M., Osumi Y. Effects of water-immersion stress on gastric secretion and mucosal blood flow in rats. *Gastroenterology*, 1979; 77(2):298-302.

11. Li J., Takeda H., Inazu M., Hayashi M., Tsuji M., Ikoshi H., Takada K., Matsumiya T. Protective effects of Hange-shashin-to on water-immersion restraint stress-induced gastric ulcers. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1998; 20(1):31-37.
12. Harada N., Okajima K., Liu W. Rebamipide decreases the susceptibility of gastric mucosa to acid-induced injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *Dig Dis Sci*, 2005; 50 Suppl 1:S56-62.
13. Hamajima E., Sugiyama S., Hoshino H., Goto H., Tsukamoto Y., Ozawa T. Effects of FK506, an immunosuppressive agent, on genesis of water-immersion stress-induced gastric lesions in rats. *Dig Dis Sci*, 1994; 39(4):713-720.
14. Kitagawa H., Takeda F., Kohei H. A simple method for estimation of gastric mucus and effects of antiulcerogenic agents on the decrease in mucus during water-immersion stress in rats. *Arzneimittelforschung*, 1986; 36(8):1240-1244.
15. Yoshikawa T., Naito Y., Ueda S., Oyamada H., Takemura T., Yoshida N., Sugino S., Kondo M. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. *J Clin Gastroenterol*, 1990; 12 Suppl 1:S65-71.
16. Liu W., Okajima K., Murakami K., Harada N., Isobe H., Irie T. Role of neutrophil elastase in stress-induced gastric mucosal injury in rats. *J Lab Clin Med*, 1998; 132(5):432-439.
17. Siow R.C., Ishii T., Mann G.E. Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Rep*, 2007; 12(1):11-15.
18. Li W., Kong A.N. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*, 2009; 48(2):91-104.
19. Buckley B.J., Marshall Z.M., Whorton A.R. Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 307(4):973-979.
20. Eyries M., Siegfried G., Ciumas M., Montagne K., Agrapart M., Lebrin F., Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*, 2008; 103(4):432-440.
21. Tiam C., Garcia-Pras E., Mejias M., de Gottardi A., Berzigotti A., Bosch J., Fernandez M. Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *J Hepatol*, 2009; 50(2):296-305.

22. Liu X.H., Kirschenbaum A., Lu M., Yao S., Dosoretz A., Holland J.F., Levine A.C. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem*, 2002; 277(51):50081-50086.
23. Ladeiras-Lopes R., Ferreira-Martins J., Leite-Moreira A.F. The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq Bras Cardiol*, 2008; 90(5):343-349.
24. Han S., Wang G., Qi X., Englander E.W., Greeley G.H., Jr. Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008; 295(5):G1068-1078.
25. Han S., Wang G., Qi X., Lee H.M., Englander E.W., Greeley G.H., Jr. A possible role for hypoxia-induced apelin expression in enteric cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008; 294(6):R1832-1839.
26. Daviaud D., Boucher J., Gesta S., Dray C., Guigne C., Quilliot D., Ayav A., Ziegler O., Carpenne C., Saulnier-Blache J.S., Valet P., Castan-Laurell I. TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J*, 2006; 20(9):1528-1530.
27. Brzozowski T., Konturek P.C., Pajdo R., Ptak-Belowska A., Kwiecien S., Pawlik M., Drozdowicz D., Sliwowski Z., Brzozowski B., Konturek S.J., Pawlik W.W. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins. *J Physiol Pharmacol*, 2008; 59 Suppl 2:89-102.
28. Eberhart C.E., Dubois R.N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 1995; 109(1):285-301.
29. Kompanowska-Jeziarska E., Kuczeriszka M. Cytochrome P-450 metabolites in renal circulation and excretion--interaction with the nitric oxide (NO) system. *J Physiol Pharmacol*, 2008; 59 Suppl 9:137-149.
30. Brzozowski T., Konturek P.C., Konturek S.J., Brzozowska I., Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*, 2005; 56 Suppl 5:33-55.
31. Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New biology*, 1971; 231(25):232-235.
32. Robert A. Antisecretory, Antiulcer, Cytoprotective and Diarrheogenic Properties of Prostaglandins. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, 1976; 2:507-520.

33. Wang Y., Flores L., Lu S., Miao H., Li Y.S., Chien S. Shear Stress Regulates the Flk-1/Cbl/PI3K/NF-kappaB Pathway Via Actin and Tyrosine Kinases. *Cellular and molecular bioengineering*, 2009; 2(3):341-350.
34. Konturek S.J., Brzozowski T., Majka J., Dembinski A., Slomiany A., Slomiany B.L. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury. *Scand J Gastroenterol*, 1992; 27(8):649-655.
35. Pajdo R., Brzozowski T., Szlachcic A., Konturek P.C., Ptak-Belowska A., Drozdowicz D., Targosz A., Konturek S.J., Pawlik W.W. Lipoxins, the novel mediators of gastroprotection and gastric adaptation to ulcerogenic action of aspirin. *Current pharmaceutical design*, 2011; 17(16):1541-1551.
36. Tepperman B.L., Soper B.D. Interaction of nitric oxide and salivary gland epidermal growth factor in the modulation of rat gastric mucosal integrity. *Br J Pharmacol*, 1993; 110(1):229-234.
37. deFoneska A., Kaunitz J.D. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010; 26(6):604-610.
38. Lichtenberger L.M. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 1999; 15(6):463-472.
39. Allen A., Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005; 288(1):C1-19.
40. Atuma C., Strugala V., Allen A., Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001; 280(5):G922-929.
41. Darling R.L., Romero J.J., Dial E.J., Akunda J.K., Langenbach R., Lichtenberger L.M. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. *Gastroenterology*, 2004; 127(1):94-104.
42. Werther J.L. The gastric mucosal barrier. *Mt Sinai J Med*, 2000; 67(1):41-53.
43. Tanaka K., Tsutsumi S., Arai Y., Hoshino T., Suzuki K., Takaki E., Ito T., Takeuchi K., Nakai A., Mizushima T. Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. *Mol Pharmacol*, 2007; 71(4):985-993.
44. Oyake J., Otaka M., Matsushashi T., Jin M., Odashima M., Komatsu K., Wada I., Horikawa Y., Ohba R., Hatakeyama N., Itoh H., Watanabe S. Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against

- monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. *Life Sci*, 2006; 79(3):300-305.
45. Modlin I.M., Kidd M., Lye K.D., Wright N.A. Gastric stem cells: an update. *Keio J Med*, 2003; 52(2):134-137.
 46. Leedham S.J., Brittan M., Preston S.L., McDonald S.A., Wright N.A. The stomach periglandular fibroblast sheath: all present and correct. *Gut*, 2006; 55(2):295-296.
 47. Laine L., Takeuchi K., Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 2008; 135(1):41-60.
 48. Guth P.H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. *Yale J Biol Med*, 1992; 65(6):677-688.
 49. Kawano S., Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000; 15 Suppl:D1-6.
 50. Ichikawa Y., Tarnawski A., Sarfeh I.J., Ishikawa T., Shimada H. Distorted microangioarchitecture and impaired angiogenesis in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Gastroenterology*, 1994; 106(3):702-708.
 51. Yoshida M., Wakabayashi G., Ishikawa H., Kawachi S., Tanabe M., Otani Y., Shimazu M., Kubota T., Kitajima M. Arteriovenous shunting blood flow is intravitaly observed in the stomach after thermal injury in rats. *Keio J Med*, 2002; 51(4):193-200.
 52. Deanfield J., Donald A., Ferri C., Giannattasio C., Halcox J., Halligan S., Lerman A., Mancia G., Oliver J.J., Pessina A.C., Rizzoni D., Rossi G.P., Salvetti A., Schiffrin E.L., Taddei S., Webb D.J., Working Group on E., Endothelial Factors of the European Society of H. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*, 2005; 23(1):7-17.
 53. Kliche K., Jeggle P., Pavenstadt H., Oberleithner H. Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Pflugers Arch*, 2011; 462(2):209-217.
 54. Wagner D.D., Olmsted J.B., Marder V.J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *The Journal of cell biology*, 1982; 95(1):355-360.
 55. McEver R.P., Beckstead J.H., Moore K.L., Marshall-Carlson L., Bainton D.F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by

vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of clinical investigation*, 1989; 84(1):92-99.

56. Pries A.R., Kuebler W.M. Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*, 2006(176 Pt 1):1-40.
57. Brandes R.P., Schmitz-Winnenthal F.H., Feletou M., Godecke A., Huang P.L., Vanhoutte P.M., Fleming I., Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000; 97(17):9747-9752.
58. Shasby D.M., Ries D.R., Shasby S.S., Winter M.C. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 2002; 282(6):L1330-1338.
59. Pedram A., Razandi M., Levin E.R. Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide. *The Journal of biological chemistry*, 2002; 277(46):44385-44398.
60. Alghisi G.C., Ponsonnet L., Ruegg C. The integrin antagonist cilengitide activates $\alpha V\beta 3$, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells. *PloS one*, 2009; 4(2):e4449.
61. Lu Q., Rounds S. Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis. *Microvascular research*, 2012; 83(1):56-63.
62. Zhang Y., Chen M., Venugopal S., Zhou Y., Xiang W., Li Y.H., Lin Q., Kini R.M., Chong Y.S., Ge R. Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through $\alpha V\beta 5$ integrin depending on its physical state. *Cell death & disease*, 2011; 2:e153.
63. Ahluwalia A., Li A., Cheng G., Deng X., Tarnawski A.S. Reduced ghrelin in endothelial cells plays important mechanistic role in aging-related impairment of angiogenesis. *J Physiol Pharmacol*, 2009; 60(2):29-34.
64. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, 2004; 25(4):581-611.
65. Schulz E., Anter E., Keaney J.F., Jr. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Current medicinal chemistry*, 2004; 11(9):1093-1104.

66. Haendeler J., Tischler V., Hoffmann J., Zeiher A.M., Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS letters*, 2004; 577(3):427-433.
67. Taylor C.T., Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2010; 30(4):643-647.
68. Gryglewski R.J. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacological reports* : PR, 2008; 60(1):3-11.
69. Holzer P. Afferent nerve-mediated control of gastric mucosal blood flow and protection. *Advances in experimental medicine and biology*, 1991; 298:97-108.
70. Holzer P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Advances in experimental medicine and biology*, 1991; 298:3-16.
71. Li D.S., Raybould H.E., Quintero E., Guth P.H. Calcitonin gene-related peptide mediates the gastric hyperemic response to acid back-diffusion. *Gastroenterology*, 1992; 102(4 Pt 1):1124-1128.
72. Evangelista S. Role of calcitonin gene-related Peptide in gastric mucosal defence and healing. *Curr Pharm Des*, 2009; 15(30):3571-3576.
73. Feng G., Wang Q., Xu X., Liu Z., Li Z., Liu G. The protective effects of calcitonin gene-related peptide on gastric mucosa injury of gastric ischemia reperfusion in rats. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 2011; 33(1):84-89.
74. Peng J., Li Y.J. The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *European journal of pharmacology*, 2010; 627(1-3):1-7.
75. Brain S.D., Williams T.J., Tippins J.R., Morris H.R., MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 1985; 313(5997):54-56.
76. Tanaka S., Tache Y., Kaneko H., Guth P.H., Kaunitz J.D. Central vagal activation increases mucus gel thickness and surface cell intracellular pH in rat stomach. *Gastroenterology*, 1997; 112(2):409-417.
77. Chatzaki E., Lambropoulou M., Constantinidis T.C., Papadopoulos N., Tache Y., Minopoulos G., Grigoriadis D.E. Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 2 in the human stomach: protective biological role by inhibition of apoptosis. *J Cell Physiol*, 2006; 209(3):905-911.

78. Kaneko H., Tache Y., Kusugami K. Importance of medullary thyrotropin-releasing hormone in brain-gut circuits regulating gastric integrity: preclinical studies. *J Gastroenterol*, 2002; 37 Suppl 14:128-132.
79. Filaretova L.P., Filaretov A.A., Makara G.B. Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats. *Am J Physiol*, 1998; 274(6 Pt 1):G1024-1030.
80. Filaretova L., Bagaeva T., Podvigina T., Makara G. Various ulcerogenic stimuli are potentiated by glucocorticoid deficiency in rats. *J Physiol Paris*, 2001; 95(1-6):59-65.
81. Filaretova L., Podvigina T., Bagaeva T., Bobryshev P., Takeuchi K. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. *J Pharmacol Sci*, 2007; 104(3):195-201.
82. Brzozowski T., Konturek P.C., Drozdowicz D., Konturek S.J., Pawlik M., Sliwowski Z., Pawlik W.W., Hahn E.G. Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence. *Inflammopharmacology*, 2005; 13(1-3):45-62.
83. Mard S.A., Neisi N., Solgi G., Hassanpour M., Darbor M., Maleki M. Gastroprotective effect of NaHS against mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion injury in rat. *Dig Dis Sci*, 2012; 57(6):1496-1503.
84. Belcher J.D., Beckman J.D., Balla G., Balla J., Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal*, 2010; 12(2):233-248.
85. Abraham N.G., Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*, 2008; 60(1):79-127.
86. Immenschuh S., Ramadori G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochemical Pharmacology*, 2000; 60(8):1121-1128.
87. Ryter S.W., Alam J., Choi A.M.K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews*, 2006; 86(2):583-650.
88. Willis D., Moore A.R., Frederick R., Willoughby D.A. Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nature Medicine*, 1996; 2(1):87-90.
89. Burnett A.L., Johns D.G., Kriegsfeld L.J., Klein S.L., Calvin D.C., Demas G.E., Schramm L.P., Nelson R.J., Snyder S.H., Poss K.D. Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nature Medicine*, 1998; 4(1):84-87.

90. Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: New insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2003; 200(4):167-186.
91. Chandel N.S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C.E., Simon M.C., Schumacker P.T. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998; 95(20):11715-11720.
92. Cudmore M., Ahmad S., Al-Ani B., Fujisawa T., Coxall H., Chudasama K., Devey L.R., Wigmore S.J., Abbas A., Hewett P.W., Ahmed A. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation*, 2007; 115(13):1789-1797.
93. Dulak J., Deshane J., Jozkowicz A., Agarwal A. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation*, 2008; 117(2):231-241.
94. Bussolati B., Ahmed A., Landis R.C., Di Carlo F., Pemberton H., Haskard D.O., Mason J.C. Bifunctional Role for Vegf-Induced Heme Oxygenase-1 in Vivo: Induction of Angiogenesis and Inhibition of Leukocytic Infiltration. *Rheumatology*, 2004; 43:30-30.
95. Yamaguchi J., Kusano K.F., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., Bosch-Marce M., Masuda H., Losordo D.W., Isner J.M., Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 2003; 107(9):1322-1328.
96. Deshane J., Chen S.F., Caballero S., Grochot-Przeczek A., Was H., Calzi S.L., Lach R., Hock T.D., Chen B., Hill-Kapturczak N., Siegal G.P., Dulak J., Jozkowicz A., Grant M.B., Agarwal A. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, 2007; 204(3):605-618.
97. Poss K.D., Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997; 94(20):10919-10924.
98. Ferrara N., CarverMoore K., Chen H., Dowd M., Lu L., OShea K.S., PowellBraxton L., Hillan K.J., Moore M.W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 1996; 380(6573):439-442.
99. Fernandez M., Bonkovsky H.L. Vascular endothelial growth factor increases heme oxygenase-1 protein expression in the chick embryo chorioallantoic membrane. *British Journal of Pharmacology*, 2003; 139(3):634-640.

100. Grochot-Przeczek A., Lach R., Mis J., Skrzypek K., Gozdecka M., Sroczyńska P., Dubiel M., Rutkowski A., Kozakowska M., Zagorska A., Walczynski J., Was H., Kotlinowski J., Drukala J., Kurowski K., Kieda C., Herault Y., Dulak J., Jozkowicz A. Heme Oxygenase-1 Accelerates Cutaneous Wound Healing in Mice. *Plos One*, 2009; 4(6).
101. Muller W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology*, 2003; 24(6):327-334.
102. Hayashi S., Takamiya R., Yamaguchi T., Matsumoto K., Tojo S.J., Tamatani T., Kitajima M., Makino N., Ishimura Y., Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress role of bilirubin generated by the enzyme. *Circulation Research*, 1999; 85(8):663-671.
103. Wagener F.A.D.T.G., Eggert A., Boerman O.C., Oyen W.J.G., Verhofstad A., Abraham N.G., Adema G., van Kooyk Y., de Witte T., Figdor C.G. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, 2001; 98(6):1802-1811.
104. Abraham N.G., Rezzani R., Rodella L., Kruger A., Taller D., Volti G.L., Goodman A.I., Kappas A. Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004; 287(6):H2468-H2477.
105. Kemp P.J. Hemeoxygenase-2 as an O₂ sensor in K⁺ channel-dependent chemotransduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 338(1):648-652.
106. Bellner L., Martinelli L., Halilovic A., Patil K., Puri N., Dunn M.W., Regan R.F., Schwartzman M.L. Heme Oxygenase-2 Deletion Causes Endothelial Cell Activation Marked by Oxidative Stress, Inflammation, and Angiogenesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2009; 331(3):925-932.
107. Seta F., Bellner L., Rezzani R., Regan R.F., Dunn M.W., Abraham N.G., Gronert K., Laniado-Schwartzman M. Heme oxygenase-2 is a critical determinant for execution of an acute inflammatory and reparative response. *American Journal of Pathology*, 2006; 169(5):1612-1623.
108. Sodhi K., Inoue K., Gotlinger K.H., Canestraro M., Vanella L., Kim D.H., Manthathi V.L., Koduru S.R., Falck J.R., Schwartzman M.L., Abraham N.G. Epoxyeicosatrienoic Acid Agonist Rescues the Metabolic Syndrome Phenotype of HO-2-Null Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2009; 331(3):906-916.

109. Bilban M., Haschemi A., Wegiel B., Chin B.Y., Wagner O., Otterbein L.E. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J Mol Med (Berl)*, 2008; 86(3):267-279.
110. Pae H.O., Lee Y.C., Chung H.T. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide: emerging therapeutic targets in inflammation and allergy. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2008; 2(3):159-165.
111. Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J Exp Med*, 2003; 200(4):167-186.
112. Durante W., Johnson F.K., Johnson R.A. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J Cell Mol Med*, 2006; 10(3):672-686.
113. Morse D., Lin L., Choi A.M., Ryter S.W. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radic Biol Med*, 2009; 47(1):1-12.
114. Mancuso C., Pani G., Calabrese V. Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species. *Redox Rep*, 2006; 11(5):207-213.
115. Mancuso C., Pistrutto G., Tringali G., Grossman A.B., Preziosi P., Navarra P. Evidence that carbon monoxide stimulates prostaglandin endoperoxide synthase activity in rat hypothalamic explants and in primary cultures of rat hypothalamic astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997; 45(2):294-300.
116. Ryter S.W., Alam J., Choi A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, 2006; 86(2):583-650.
117. Morse D., Sethi J. Carbon monoxide and human disease. *Antioxid Redox Signal*, 2002; 4(2):331-338.
118. Mancuso C. Heme oxygenase and its products in the nervous system. *Antioxid Redox Signal*, 2004; 6(5):878-887.
119. Mancuso C., Barone E. The heme oxygenase/biliverdin reductase pathway in drug research and development. *Curr Drug Metab*, 2009; 10(6):579-594.
120. Keshavan P., Deem T.L., Schwemberger S.J., Babcock G.F., Cook-Mills J.M., Zucker S.D. Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. *J Immunol*, 2005; 174(6):3709-3718.
121. Ryter S.W., Choi A.M. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal*, 2005; 7(1-2):80-91.

122. Motohashi H., Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 2004; 10(11):549-557.
123. Jozkowicz A., Huk I., Nigisch A., Weigel G., Dietrich W., Motterlini R., Dulak J. Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid Redox Signal*, 2003; 5(2):155-162.
124. Lin H.H., Chen Y.H., Yet S.F., Chau L.Y. After vascular injury, heme oxygenase-1/carbon monoxide enhances re-endothelialization via promoting mobilization of circulating endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost*, 2009; 7(8):1401-1408.
125. Marti H.H., Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95(26):15809-15814.
126. Bussolati B., Ahmed A., Pemberton H., Landis R.C., Di Carlo F., Haskard D.O., Mason J.C. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood*, 2004; 103(3):761-766.
127. Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Madri J.A., Sessa W.C. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1997; 100(12):3131-3139.
128. Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Kim Y.M., Chung H.T. A molecular cascade showing nitric oxide-heme oxygenase-1-vascular endothelial growth factor-interleukin-8 sequence in human endothelial cells. *Endocrinology*, 2005; 146(5):2229-2238.
129. Foresti R., Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radical Research*, 1999; 31(6):459-475.
130. Taille C., El-Benna J., Lanone S., Boczkowski J., Motterlini R. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280(27):25350-25360.
131. Thorup C., Jones C.L., Gross S.S., Moore L.C., Goligorsky M.S. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *The American journal of physiology*, 1999; 277(6 Pt 2):F882-889.

132. Yellon D.M., Hausenloy D.J. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 2007; 357(11):1121-1135.
133. Ryan S., Taylor C.T., McNicholas W.T. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*, 2005; 112(17):2660-2667.
134. Wallace K.L., Linden J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. *Blood*, 2010; 116(23):5010-5020.
135. Park S.W., Kim M., Brown K.M., D'Agati V.D., Lee H.T. Paneth Cell-Derived Interleukin-17A Causes Multiorgan Dysfunction After Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury. *Hepatology*, 2011; 53(5):1662-1675.
136. Ogawa S., Gerlach H., Esposito C., Pasagianmacaulay A., Brett J., Stern D. Hypoxia Modulates the Barrier and Coagulant Function of Cultured Bovine Endothelium - Increased Monolayer Permeability and Induction of Procoagulant Properties. *Journal of Clinical Investigation*, 1990; 85(4):1090-1098.
137. Ogawa S., Koga S., Kuwabara K., Brett J., Morrow B., Morris S.A., Bilezikian J.P., Silverstein S.C., Stern D. Hypoxia-Induced Increased Permeability of Endothelial Monolayers Occurs through Lowering of Cellular Camp Levels. *American Journal of Physiology*, 1992; 262(3):C546-C554.
138. Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E. Cell death. *N Engl J Med*, 2009; 361(16):1570-1583.
139. Eltzschig H.K., Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*, 2011; 364(7):656-665.
140. Carroll M.C., Holers V.M. Innate autoimmunity. *Adv Immunol*, 2005; 86:137-157.
141. Chen G.Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 2010; 10(12):826-837.
142. Iyer S.S., Pulskens W.P., Sadler J.J., Butter L.M., Teske G.J., Ulland T.K., Eisenbarth S.C., Florquin S., Flavell R.A., Leemans J.C., Sutterwala F.S. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009; 106(48):20388-20393.
143. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C.M., Beck P.L., Muruve D.A., Kubes P. Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science*, 2010; 330(6002):362-366.

144. Powers K.A., Szaszi K., Khadaroo R.G., Tawadros P.S., Marshall J.C., Kapus A., Rotstein O.D. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 2006; 203(8):1951-1961.
145. Cavassani K.A., Ishii M., Wen H.T., Schaller M.A., Lincoln P.M., Lukacs N.W., Hogaboam C.M., Kunkel S.L. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *Journal of Experimental Medicine*, 2008; 205(11):2609-2621.
146. Kuhlicke J., Frick J.S., Morote-Garcia J.C., Rosenberger P., Eltzschig H.K. Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Coordinates Induction of Toll-Like Receptors TLR2 and TLR6 during Hypoxia. *Plos One*, 2007; 2(12).
147. Swirski F.K., Nahrendorf M., Etzrodt M., Wildgruber M., Cortez-Retamozo V., Panizzi P., Figueiredo J.L., Kohler R.H., Chudnovskiy A., Waterman P., Aikawa E., Mempel T.R., Libby P., Weissleder R., Pittet M.J. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*, 2009; 325(5940):612-616.
148. Bamboat Z.M., Ocuin L.M., Balachandran V.P., Obaid H., Plitas G., DeMatteo R.P. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *J Clin Invest*, 2010; 120(2):559-569.
149. Iadecola C., Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 2011; 17(7):796-808.
150. Pacher P., Szabo C. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *Am J Pathol*, 2008; 173(1):2-13.
151. Kreisel D., Sugimoto S., Tietjens J., Zhu J., Yamamoto S., Krupnick A.S., Carmody R.J., Gelman A.E. Bcl3 prevents acute inflammatory lung injury in mice by restraining emergency granulopoiesis. *J Clin Invest*, 2011; 121(1):265-276.
152. Satpute S.R., Park J.M., Jang H.R., Agreda P., Liu M., Gandolfo M.T., Racusen L., Rabb H. The role for T cell repertoire/antigen-specific interactions in experimental kidney ischemia reperfusion injury. *J Immunol*, 2009; 183(2):984-992.
153. Shen X.D., Wang Y., Gao F., Ren F., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W., Zhai Y. CD4 T Cells Promote Tissue Inflammation via CD40 Signaling Without De Novo Activation in a Murine Model of Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Hepatology*, 2009; 50(5):1537-1546.
154. Schroeter M., Jander S., Witte O.W., Stoll G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol*, 1994; 55(2):195-203.

155. Yilmaz G., Arumugam T.V., Stokes K.Y., Granger D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*, 2006; 113(17):2105-2112.
156. Yang Z.Q., Day Y.J., Toufektsian M.C., Ramos S.I., Linden J., French B.A. The infarct-sparing effect of A2A-Adenosine receptor activation is primarily due to its action on CD4+lymphocytes. *Circulation*, 2003; 108(17):126-126.
157. Day Y.J., Huang L., Ye H., Li L., Linden J., Okusa M.D. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4+ T cells and IFN-gamma. *J Immunol*, 2006; 176(5):3108-3114.
158. Shichita T., Sugiyama Y., Ooboshi H., Sugimori H., Nakagawa R., Takada I., Iwaki T., Okada Y., Iida M., Cua D.J., Iwakura Y., Yoshimura A. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med*, 2009; 15(8):946-950.
159. Liesz A., Suri-Payer E., Veltkamp C., Doerr H., Sommer C., Rivest S., Giese T., Veltkamp R. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med*, 2009; 15(2):192-199.
160. Elliott M.R., Chekeni F.B., Trampont P.C., Lazarowski E.R., Kadl A., Walk S.F., Park D., Woodson R.I., Ostankovich M., Sharma P., Lysiak J.J., Harden T.K., Leitinger N., Ravichandran K.S. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 2009; 461(7261):282-U165.
161. Thakar C.V., Zahedi K., Revelo M.P., Wang Z.H., Burnham C.E., Barone S., Bevans S., Lentsch A.B., Rabb H., Soleimani M. Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia. *Journal of Clinical Investigation*, 2005; 115(12):3451-3459.
162. Tang Z., Arjunan P., Lee C., Li Y., Kumar A., Hou X., Wang B., Wardega P., Zhang F., Dong L., Zhang Y., Zhang S.Z., Ding H., Fariss R.N., Becker K.G., Lennartsson J., Nagai N., Cao Y., Li X. Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3beta phosphorylation. *J Exp Med*, 2010; 207(4):867-880.
163. Liang M.H., Chuang D.M. Regulation and function of glycogen synthase kinase-3 isoforms in neuronal survival. *J Biol Chem*, 2007; 282(6):3904-3917.
164. Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouves A., Fitzgerald K.T., Seeballuck F., Godson C., Nielsen J.E., Moynagh P., Pouyssegur J., Taylor C.T. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; 103(48):18154-18159.

165. Li Q., Van Antwerp D., Mercurio F., Lee K.F., Verma I.M. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*, 1999; 284(5412):321-325.
166. Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., Semenza G.L. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 2008; 283(16):10892-10903.
167. Eltzschig H.K., Collard C.D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*, 2004; 70:71-86.
168. Yemisci M., Gursoy-Ozdemir Y., Vural A., Can A., Topalkara K., Dalkara T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrate stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*, 2009; 15(9):1031-1037.
169. Semenza G.L. Life with oxygen. *Science*, 2007; 318(5847):62-64.
170. Brines M.L., Ghezzi P., Keenan S., Agnello D., de Lanerolle N.C., Cerami C., Itri L.M., Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97(19):10526-10531.
171. Cai Z., Manalo D.J., Wei G., Rodriguez E.R., Fox-Talbot K., Lu H., Zweier J.L., Semenza G.L. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 2003; 108(1):79-85.
172. Parsa C.J., Matsumoto A., Kim J., Riel R.U., Pascal L.S., Walton G.B., Thompson R.B., Petrofski J.A., Annex B.H., Stamler J.S., Koch W.J. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest*, 2003; 112(7):999-1007.
173. Fantacci M., Bianciardi P., Caretti A., Coleman T.R., Cerami A., Brines M., Samaja M. Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress induced in vivo by severe chronic hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; 103(46):17531-17536.
174. Chen C.H., Budas G.R., Churchill E.N., Disatnik M.H., Hurley T.D., Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*, 2008; 321(5895):1493-1495.
175. Miller E.J., Li J., Leng L., McDonald C., Atsumi T., Bucala R., Young L.H. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature*, 2008; 451(7178):578-582.

176. Qi D., Hu X., Wu X., Merk M., Leng L., Bucala R., Young L.H. Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion. *J Clin Invest*, 2009; 119(12):3807-3816.
177. Konturek P.C., Duda A., Brzozowski T., Konturek S.J., Kwiecien S., Drozdowicz D., Pajdo R., Meixner H., Hahn E.G. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. *Scand J Gastroenterol*, 2000; 35(5):452-463.
178. Konturek S.J., Brzozowski T., Konturek P.C., Kwiecien S., Karczewska E., Drozdowicz D., Stachura J., Hahn E.G. *Helicobacter pylori* infection delays healing of ischaemia-reperfusion induced gastric ulcerations: new animal model for studying pathogenesis and therapy of *H. pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2000; 12(12):1299-1313.
179. de Groot H., Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplantation proceedings*, 2007; 39(2):481-484.
180. Ueda K., Ueyama T., Yoshida K.I., Kimura H., Ito T., Shimizu Y., Oka M., Tsuruo Y., Ichinose M. Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008; 295(3):G460-G469.
181. Satoh T., Okamoto S.I., Cui J., Watanabe Y., Furuta K., Suzuki M., Tohyama K., Lipton S.A. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; 103(3):768-773.
182. Kim K.M., Jung D.H., Jang D.S., Kim Y.S., Kim J.M., Kim H.N., Surh Y.J., Kim J.S. Puerarin suppresses AGEs-induced inflammation in mouse mesangial cells: A possible pathway through the induction of heme oxygenase-1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010.
183. Ortiz-Masia D., Hernandez C., Quintana E., Velazquez M., Cebrian S., Riano A., Calatayud S., Esplugues J.V., Barrachina M.D. iNOS-derived nitric oxide mediates the increase in TFF2 expression associated with gastric damage: role of HIF-1. *FASEB J*, 2010; 24(1):136-145.
184. Hernandez C., Santamatilde E., McCreath K.J., Cervera A.M., Diez I., Ortiz-Masia D., Martinez N., Calatayud S., Esplugues J.V., Barrachina M.D. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *Br J Pharmacol*, 2009; 156(2):262-272.
185. Odowd B.F., Heiber M., Chan A., Heng H.H.Q., Tsui L.C., Kennedy J.L., Shi X.M., Petronis A., George S.R., Nguyen T. A Human Gene That Shows

Identity with the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome-11. *Gene*, 1993; 136(1-2):355-360.

186. Tatemoto K., Hosoya M., Habata Y., Fujii R., Kakegawa T., Zou M.X., Kawamata Y., Fukusumi S., Hinuma S., Kitada C., Kurokawa T., Onda H., Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998; 251(2):471-476.
187. O'Carroll A.M., Selby T.L., Palkovits M., Lolait S.J. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 2000; 1492(1):72-80.
188. Kleinz M.J., Skepper J.N., Davenport A.P. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 2005; 126(3):233-240.
189. Kleinz M.J., Davenport A.P. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, 2005; 107(2):198-211.
190. Masri B., Knibiehler B., Audigier Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cellular Signalling*, 2005; 17(4):415-426.
191. Medhurst A.D., Jennings C.A., Robbins M.J., Davis R.P., Ellis C., Winborn K.Y., Lawrie K.W.M., Hervieu G., Riley G., Bolaky J.E., Herrity N.C., Murdock P., Darker J.G. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *Journal of Neurochemistry*, 2003; 84(5):1162-1172.
192. Lee D.K., Cheng R., Nguyen T., Fan T., Kariyawasam A.P., Liu Y., Osmond D.H., George S.R., O'Dowd B.F. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *Journal of Neurochemistry*, 2000; 74(1):34-41.
193. Devic E., Rizzoti K., Bodin S., Knibiehler B., Audigier Y. Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of *Xenopus* X-msr and human APJ. *Mechanisms of Development*, 1999; 84(1-2):199-203.
194. O'Carroll A.M., Don A.L.J., Lolait S.J. APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: Regulation by stress and glucocorticoids. *Journal of Neuroendocrinology*, 2003; 15(11):1095-1101.
195. Clarke K.J., Whitaker K.W., Reyes T.M. Diminished Metabolic Responses to Centrally-Administered Apelin-13 in Diet-Induced Obese Rats Fed a High-Fat Diet. *Journal of Neuroendocrinology*, 2009; 21(2):83-89.

196. Habata Y., Fujii R., Hosoya M., Fukusumi S., Kawamata Y., Hinuma S., Kitada C., Nishizawa N., Murosaki S., Kurokawa T., Onda H., Tatemoto K., Fujino M. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1999; 1452(1):25-35.
197. Masri B., Lahlou H., Mazarguil H., Knibiehler B., Audigier Y. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002; 290(1):539-545.
198. Masri B., Morin N., Cornu M., Knibiehler B., Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *Faseb Journal*, 2004; 18(12):1909.
199. Tatemoto K., Takayama K., Zou M.X., Kumaki I., Zhang W., Kumano K., Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory Peptides*, 2001; 99(2-3):87-92.
200. Lee D.K., Saldivia V.R., Nguyen T., Cheng R., George S.R., O'Dowd B.F. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology*, 2005; 146(1):231-236.
201. Kawamata Y., Fukusumi S., Hosoya M., Fujii R., Hinuma S., Nishizawa N., Kitada C., Onda H., Nishimura O., Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2001; 1538(2-3):162-171.
202. Vickers C., Hales P., Kaushik V., Dick L., Gavin J., Tang J., Godbout K., Parsons T., Baronas E., Hsieh F., Acton S., Patane M., Nichols A., Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 2002; 277(17):14838-14843.
203. Szokodi I., Tavi P., Foldes G., Voutilainen-Mylly S., Ilves M., Tokola H., Pikkarainen S., Piuholta J., Rysa J., Toth M., Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circulation Research*, 2002; 91(5):434-440.
204. Maguire J.J., Kleinz M.J., Pitkin S.L., Davenport A.P. [Pyr(1)]Apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart Vasoactive Mechanisms and Inotropic Action in Disease. *Hypertension*, 2009; 54(3):598-U296.
205. Farkasfalvi K., Stagg M.A., Coppen S.R., Siedlecka U., Lee J., Soppa G.K., Marczin N., Szokodi I., Yacoub M.H., Terracciano C.M.N. Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007; 357(4):889-895.

206. Ashley E.A., Powers J., Chen M., Kundu R., Finsterbach T., Caffarelli A., Deng A., Eichhorn J., Mahajan R., Agrawal R., Greve J., Robbins R., Patterson A.J., Bernstein D., Quertermous T. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovascular Research*, 2005; 65(1):73-82.
207. Charo D.N., Ho M., Fajardo G., Kawana M., Kundu R.K., Sheikh A.Y., Finsterbach T.P., Leeper N.J., Ernst K.V., Chen M.M., Ho Y.D., Chun H.J., Bernstein D., Ashley E.A., Quertermous T. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2009; 297(5):H1904-H1913.
208. Karmazyn M., Gan X.T., Humphreys R.A., Yoshida H., Kusumoto K. The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res*, 1999; 85(9):777-786.
209. Chen M.M., Ashley E.A., Deng D.X.F., Tsalenko A., Deng A., Tabibiazar R., Ben-Dor A., Fenster B., Yang E., King J.Y., Fowler M., Robbins R., Johnson F.L., Bruhn L., McDonagh T., Dargie H., Yakhini Z., Tsao P.S., Quertermous T. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation*, 2003; 108(12):1432-1439.
210. Foldes G., Horkay F., Szokodi I., Vuolteenaho O., Ilves M., Lindstedt A., Mayranpaa M., Sarman B., Seres L., Skoumal R., Lako-Futo Z., deChatel R., Ruskoaho H., Toth M. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003; 308(3):480-485.
211. Ronkainen V.P., Ronkainen J.J., Hanninen S.L., Leskinen H., Ruas J.L., Pereira T., Poellinger L., Vuolteenaho O., Tavi P. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *Faseb Journal*, 2007; 21(8):1821-1830.
212. Katugampola S.D., Maguire J.J., Matthewson S.R., Davenport A.P. [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol*, 2001; 132(6):1255-1260.
213. Cheng X., Cheng X.S., Pang C.C. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, 2003; 470(3):171-175.
214. Salcedo A., Garijo J., Monge L., Fernandez N., Luis Garcia-Villalon A., Sanchez Turrion V., Cuervas-Mons V., Dieguez G. Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regul Pept*, 2007; 144(1-3):50-55.

215. Zhang J., Ren C.X., Qi Y.F., Lou L.X., Chen L., Zhang L.K., Wang X., Tang C. Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 2006; 79(12):1153-1159.
216. Ishida J., Hashimoto T., Hashimoto Y., Nishiwaki S., Iguchi T., Harada S., Sugaya T., Matsuzaki H., Yamamoto R., Shiota N., Okunishi H., Kihara M., Umemura S., Sugiyama F., Yagami K., Kasuya Y., Mochizuki N., Fukamizu A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem*, 2004; 279(25):26274-26279.
217. Kuba K., Zhang L., Imai Y., Arab S., Chen M., Maekawa Y., Leschnik M., Leibbrandt A., Markovic M., Schwaighofer J., Beetz N., Musialek R., Neely G.G., Komnenovic V., Kolm U., Metzler B., Ricci R., Hara H., Meixner A., Nghiem M., Chen X., Dawood F., Wong K.M., Sarao R., Cukerman E., Kimura A., Hein L., Thalhammer J., Liu P.P., Penninger J.M. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res*, 2007; 101(4):e32-42.
218. Jia Y.X., Lu Z.F., Zhang J., Pan C.S., Yang J.H., Zhao J., Yu F., Duan X.H., Tang C.S., Qi Y.F. Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides*, 2007; 28(10):2023-2029.
219. Saint-Geniez M., Argence C.B., Knibiehler B., Audigier Y. The msr/apj gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature. *Gene Expr Patterns*, 2003; 3(4):467-472.
220. Kasai A., Shintani N., Oda M., Kakuda M., Hashimoto H., Matsuda T., Hinuma S., Baba A. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 325(2):395-400.
221. Kidoya H., Ueno M., Yamada Y., Mochizuki N., Nakata M., Yano T., Fujii R., Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J*, 2008; 27(3):522-534.
222. Kershaw E.E., Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89(6):2548-2556.
223. Smith C.C., Mocanu M.M., Davidson S.M., Wynne A.M., Simpkin J.C., Yellon D.M. Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br J Pharmacol*, 2006; 149(1):5-13.
224. Jia Y.X., Pan C.S., Zhang J., Geng B., Zhao J., Gerns H., Yang J., Chang J.K., Tang C.S., Qi Y.F. Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Regul Pept*, 2006; 133(1-3):147-154.

225. Boyce M., Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ*, 2006; 13(3):363-373.
226. Tao J.P., Zhu W., Li Y.P., Xin P., Li J., Liu M.Y., Li J.B., Redington A.N., Wei M. Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011; 301(4):H1471-H1486.
227. Malyszko J., Malyszko J.S., Kozminski P., Mysliwiec M. Apelin and cardiac function in hemodialyzed patients: possible relations? *Am J Nephrol*, 2006; 26(2):121-126.
228. Malyszko J., Malyszko J.S., Pawlak K., Wolczynski S., Mysliwiec M. Apelin, a novel adipocytokine, in relation to endothelial function and inflammation in kidney allograft recipients. *Transplantation proceedings*, 2008; 40(10):3466-3469.
229. Zhong J.C., Huang Y., Yung L.M., Lau C.W., Leung F.P., Wong W.T., Lin S.G., Yu X.Y. The novel peptide apelin regulates intrarenal artery tone in diabetic mice. *Regul Pept*, 2007; 144(1-3):109-114.
230. Hus-Citharel A., Bouby N., Frugiere A., Bodineau L., Gasc J.M., Llorens-Cortes C. Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int*, 2008; 74(4):486-494.
231. Sorhede Winzell M., Magnusson C., Ahren B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept*, 2005; 131(1-3):12-17.
232. Boucher J., Masri B., Daviaud D., Gesta S., Guigne C., Mazzucotelli A., Castan-Laurell I., Tack I., Knibiehler B., Carpene C., Audigier Y., Saulnier-Blache J.S., Valet P. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 2005; 146(4):1764-1771.
233. Higuchi K., Masaki T., Gotoh K., Chiba S., Katsuragi I., Tanaka K., Kakuma T., Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*, 2007; 148(6):2690-2697.
234. Zhong J.C., Yu X.Y., Huang Y., Yung L.M., Lau C.W., Lin S.G. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res*, 2007; 74(3):388-395.
235. Li L., Yang G., Li Q., Tang Y., Yang M., Yang H., Li K. Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired

glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2006; 114(10):544-548.

236. Reaux A., De Mota N., Skultetyova I., Lenkei Z., El Messari S., Gallatz K., Corvol P., Palkovits M., Llorens-Cortes C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem*, 2001; 77(4):1085-1096.
237. Reaux A., Gallatz K., Palkovits M., Llorens-Cortes C. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience*, 2002; 113(3):653-662.
238. Roberts E.M., Newson M.J., Pope G.R., Landgraf R., Lolait S.J., O'Carroll A.M. Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice. *J Endocrinol*, 2009; 202(3):453-462.
239. Choe H., Farzan M., Konkel M., Martin K., Sun Y., Marcon L., Cayabyab M., Berman M., Dorf M.E., Gerard N., Gerard C., Sodroski J. The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1998; 72(7):6113-6118.
240. Choe W., Albright A., Sulcove J., Jaffer S., Hesselgesser J., Lavi E., Crino P., Kolson D.L. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol*, 2000; 6 Suppl 1:S61-69.
241. Edinger A.L., Hoffman T.L., Sharron M., Lee B., Yi Y., Choe W., Kolson D.L., Mitrovic B., Zhou Y., Faulds D., Collman R.G., Hesselgesser J., Horuk R., Doms R.W. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 1998; 72(10):7934-7940.
242. Zou M.X., Liu H.Y., Haraguchi Y., Soda Y., Tatemoto K., Hoshino H. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett*, 2000; 473(1):15-18.
243. Cayabyab M., Hinuma S., Farzan M., Choe H., Fukusumi S., Kitada C., Nishizawa N., Hosoya M., Nishimura O., Messele T., Pollakis G., Goudsmit J., Fujino M., Sodroski J. Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, 2000; 74(24):11972-11976.
244. Wang G., Anini Y., Wei W., Qi X., AM O.C., Mochizuki T., Wang H.Q., Hellmich M.R., Englander E.W., Greeley G.H., Jr. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology*, 2004; 145(3):1342-1348.

245. Taheri S., Murphy K., Cohen M., Sujkovic E., Kennedy A., Dhillon W., Dakin C., Sajedi A., Ghatei M., Bloom S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002; 291(5):1208-1212.
246. Sunter D., Hewson A.K., Dickson S.L. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett*, 2003; 353(1):1-4.
247. Han S., Wang G., Qiu S., de la Motte C., Wang H.Q., Gomez G., Englander E.W., Greeley G.H., Jr. Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. *Regul Pept*, 2007; 142(3):131-137.
248. Cox C.M., D'Agostino S.L., Miller M.K., Heimark R.L., Krieg P.A. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Developmental biology*, 2006; 296(1):177-189.
249. Nie S.N., Sun H.C., Wu X.H., Qian X.M. Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. *World Journal of Gastroenterology*, 2004; 10(23):3537-3541.
250. Tan R., Bulbul M., Ongut G., Tosun O., Izgut-Uysal V.N. Prostaglandins, capsaicin-sensitive sensory nerves and neutrophil infiltration, but not nitric oxide, contribute to cold restraint stress-induced gastric adaptation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006; 33(10):946-951.
251. S S.K., Pawlik M.W., Brzozowski T., Konturek P.C., Sliwowski Z., Pawlik W.W., Konturek S.J. Nitric oxide (NO)-releasing aspirin and (NO) donors in protection of gastric mucosa against stress. *J Physiol Pharmacol*, 2008; 59 Suppl 2:103-115.
252. Li L., Rose P., Moore P.K. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 51, 2011, 2011; 51:169-187.
253. Qiao W.L., Wang L., Zhang J.F., Zhang Y.M. Effects of gastric ischemia-reperfusion on gastric mucosal cellular apoptosis and proliferation in rats. *Sheng Li Xue Bao*, 2006; 58(3):237-243.
254. Liu C., Su T., Li F., Li L., Qin X., Pan W., Feng F., Chen F., Liao D., Chen L. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010; 42(6):396-402.
255. Barnes G., Japp A.G., Newby D.E. Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart*, 2010; 96(13):1011-1016.

256. Tatemoto K., Takayama K., Zou M.X., Kumaki I., Zhang W., Kumano K., Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*, 2001; 99(2-3):87-92.
257. Japp A.G., Cruden N.L., Barnes G., van Gemeren N., Mathews J., Adamson J., Johnston N.R., Denvir M.A., Megson I.L., Flapan A.D., Newby D.E. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 2010; 121(16):1818-1827.
258. Japp A.G., Cruden N.L., Amer D.A., Li V.K., Goudie E.B., Johnston N.R., Sharma S., Neilson I., Webb D.J., Megson I.L., Flapan A.D., Newby D.E. Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol*, 2008; 52(11):908-913.
259. Brzozowski T., Konturek P.C., Sliwowski Z., Pajdo R., Drozdowicz D., Kwiecien S., Burnat G., Konturek S.J., Pawlik W.W. Prostaglandin/cyclooxygenase pathway in ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006; 319(1):477-487.
260. Konturek P.C., Brzozowski T., Walter B., Burnat G., Hess T., Hahn E.G., Konturek S.J. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol*, 2006; 536(1-2):171-181.
261. Kwiecien S., Konturek P.C., Sliwowski Z., Mitis-Musiol M., Pawlik M.W., Brzozowski B., Jasnos K., Magierowski M., Konturek S.J., Brzozowski T. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress. *J Physiol Pharmacol*, 2012; 63(2):143-151.
262. Zeng X.J., Zhang L.K., Wang H.X., Lu L.Q., Ma L.Q., Tang C.S. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides*, 2009; 30(6):1144-1152.
263. Yamamoto H., Tanaka A., Kunikata T., Hirata T., Kato S., Takeuchi K. Inducible types of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in adaptive cytoprotection in rat stomachs. *J Physiol Paris*, 1999; 93(5):405-412.
264. Ohta Y., Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res*, 2001; 43(6):535-541.
265. Barrachina M.D., Panes J., Esplugues J.V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Current pharmaceutical design*, 2001; 7(1):31-48.

- 266.** Stanek A., Gadowska-Cicha A., Gawron K., Wielkoszynski T., Adamek B., Cieslar G., Wiczowski A., Sieron A. Role of nitric oxide in physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2008; 8(14):1549-1560.
- 267.** Mashimo H., Goyal R.K. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *The American journal of physiology*, 1999; 277(4 Pt 1):G745-750.
- 268.** Petersson J., Schreiber O., Steege A., Patzak A., Hellsten A., Phillipson M., Holm L. eNOS involved in colitis-induced mucosal blood flow increase. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, 2007; 293(6):G1281-1287.
- 269.** Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Res Ther*, 2008; 10.
- 270.** Sasaki M., Joh T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2007; 40(1):1-12.
- 271.** Tulassay Z., Herszenyi L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 2010; 24(2):99-108.
- 272.** El Eter E., Hagar H.H., Al-Tuwaijiri A., Arafa M. Nuclear factor-kappaB inhibition by pyrrolidinedithiocarbamate attenuates gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2005; 83(6):483-492.
- 273.** Ammori J.B., Zhang W.Z., Li J.Y., Chai B.X., Mulholland M.W. Effects of ghrelin on neuronal survival in cells derived from dorsal motor nucleus of the vagus. *Surgery*, 2008; 144(2):159-167.

ÖZGEÇMİŞ

Burcu GEMİCİ, 1981 yılında Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Balıkesir’de, lise öğrenimini Antalya’da tamamlayarak 1999 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde üniversite eğitime başladı. Lisans eğitimini 2003 yılında tamamladı ve 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı. 2007 yılında yüksek lisans tezini verdikten sonra 2007 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitime başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.