

T1246

**T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İSKEMİ-REPERFÜZYON İLE OLUŞTURULMUŞ MİDE
HASARINA L-KARNİTİN'İN ETKİSİ**

T1246/1-1

**UZMANLIK TEZİ
DR. NARİN DERİN**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. V. NİMET UYSAL**

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 99.01.0103.05 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

ANTALYA, 2001

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Merkez

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1-2
2. GENEL BİLGİLER	
ISKEMİ-REPERFUZYON	3-16
MİDE MUKOZAL BARIYERİ	17-24
KARNİTİN	25-29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30-46
4. BULGULAR	47-55
5. TARTIŞMA	56-63
ÖZET	64-65
İNGİLİZCE ÖZET	66-67
KAYNAKLAR	68-83

KISALTMALAR

SOD	Süperoksit dismutaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
XO	Ksantin oksidaz
XD	Ksantin dehidrogenaz
MDA	Malondialdehid
cNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
ATP	Adenozintrifosfat
AMP	Adenozin monofosfat
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH	Hidroksil radikali
¹ O ₂	Singlet oksijen
L ⁻	Lipid radikali
LOOH	Lipid hidroperoksit
LOO ⁻	Lipid peroksil radikali
LO ⁻	Lipid alkoksil radikali
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
C5 _a	Kompleman 5-a
fMLP	N-formil methionine-leucine-phenylalanine
MPO	Miyeloperoksidaz
HOCl	Hipokloroz asit
PGI ₂	Prostasiklin

Fe ⁺³	Ferrik demir
Fe ⁺²	Ferröz demir
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PLA ₂	Fosfolipaz A ₂
LTB ₄	Lökotrien B ₄
ICAM-1	Intersellüler adezyon molekülü
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü
PECAM-1	Trombosit-endotel hücre adezyon molekülü
IL-8	İnterlökin 8
IL-1	İnterlökin 1
GPx	Glutasyon peroksidaz
CAT	Katalaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG-R	Glutasyon redüktaz
HCO ₃	Bikarbonat
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
VIP	Vazoaktif intestinal peptid
CRH	Kortikotropin salgılatıcı faktör
TRH	Tirotropin salgılatıcı faktör
CGRP	Kalsitonin gen düzenleyici peptid
TBARS	Tiyobarbiturik asit reaktif ürünleri

GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda akut gastrik mukozal hasar ile ilgili çalışmalar lezyonların patogeneğinde reaktif oksijen türlerinin etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Reaktif oksijen türleri inflamasyon, aterosklerozis, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, apoptozis ve iskemi-reperfüzyon hasarında önemli rol oynamaktadır (1-9). Kalp, ince barsak, karaciğer, böbrek ve beyinde gözlenen iskemi-reperfüzyon hasarına, iskemi sırasındaki doku kan akımının azalmasının yanısıra, reperfüzyon sırasında yeniden oksijenlenme ile oluşan serbest oksijen radikallerinin yol açtığı gösterilmiştir (10-15).

Reperfüzyon hasarına neden olan faktörler, aşırı kalsiyum yüklenmesi ve serbest radikal oluşumundaki artıştır (13,14). Sitozolda aşırı kalsiyum birikimi ATP oluşturma yeteneğinin azalmasına, hücre iskeletinde hasara, fosfolipaz A₂ aktivasyonuna ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne neden olur (16). Reoksijenasyondan sonra hipoksantin, ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ürik aside yıkılır. Bu reaksiyonda elektronlar moleküler oksijene transfer olur, sonuçta süperoksit radikali oluşur (13,17,18). Süperoksit radikali SOD ile hidrojen peroksite, hidrojen peroksit ise GPx ve katalazın etkisi ile H₂O'ya dönüşür (3,7,13,19). Bu radikaller hücre membranının lipid komponentine etki ederek lipid peroksidasyonuna yol açarlar (6,7). İskemi-reperfüzyon sırasında bölgeye göç eden nötrofiller de ortama saldıkları süperoksit radikali ve proteazlarla doku tahribatına neden olurlar (4,20-25).

Yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyon hasarının SOD, katalaz, glutatyon gibi antioksidanların uygulanması ile azaldığı tespit edilmiştir (2-4,25, 26). Bunun yanısıra, karnitin türevlerinin de ksantin oksidazı inhibe ederek reaktif oksijen metabolitlerinin sentezini azalttığı, serbest radikal süpürücü etkisi olduğu

gösterilmiştir (27). Diğer yandan L-karnitin, Fenton reaksiyonuna giren demir ile şelasyon yaparak, bu reaksiyonla hidroksil radikali üretimini inhibe eder ve sonuçta lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ve konjuge dien düzeylerini azaltır (28-35). Aynı zamanda L-karnitinin hücre membranını stabilize ettiği bilinmektedir (36,37). L-karnitin, bilinen antioksidan etkileri nedeniyle dejeneratif beyin hastalıklarında, yaşlılıkta, myokard ve iskelet kası iskemisinde kullanılmış ve bu tür vakalarda terapotik etkisinin olduğu tespit edilmiştir (30-32,38,39).

İskemi-reperfüzyon ile ilgili çalışmaların bulguları, mide hasarının oluşumunda serbest oksijen radikallerinin etkili olduğunu göstermektedir (4,6,40,41). Serbest radikal süpürücü etkisi bilinen veya serbest radikal oluşumunu önleyen, dolayısıyla lipid peroksidasyonunu inhibe eden maddeler kullanılarak mide iskemi-reperfüzyon hasarının belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir (2,42-44)

Antioksidan etkisi olan ve vücutta endojen olarak üretilen L-karnitin de iskemi-reperfüzyonun mide mukozasında oluşturduğu hasara karşı koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Bu düşünceden yola çıkılarak, çöliak arterin klempe edilmesi ile mide iskemisi oluşturulmuş ve klempin kaldırılması ile reperfüzyon sağlanmış sıçanların mide mukozasında, serbest radikallerin neden olduğu değişiklikler üzerine L-karnitin etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

İSKEMİ-REPERFÜZYON

Dokuya giden kan akımının bloke olması 'iskemi', aniden kan akımının başlaması, diğer bir deyişle ani oksijen sunumu 'reperfüzyon' olarak tanımlanır. İskemi-reperfüzyon, organizmadaki organ ve sistemlerde farklı derecelerde doku tahribatına yol açar (45,46). Kalp ve böbrek iskemiye çok fazla duyarlı olmasına karşın, akciğer kan akımının fazla olması nedeniyle iskemiye daha az duyarlıdır (12).

Uzamış hipoksizde membran potansiyelinin ve iyon dağılımının değiştiği, intrasellüler volümün arttığı, membran geçirgenliğinin azaldığı ve endotel hücre iskeletinin bozulduğu bilinmektedir. Bu değişiklikler enerji depolarının azalması ve biyoaktif ajanların üretimine bağlıdır (17). İskemi kendi başına doku hasarı ve sonuçta ölüme neden olabilir, fakat oluşan hasarda yeniden oksijen sunumunun (reperfüzyon) rolü daha büyüktür. Granger ve arkadaşları, dört saat süren barsak iskemisinin, üç saat iskemi ve bir saat reperfüzyon uygulanan modelden daha az hasar oluşturduğunu göstermişlerdir (47). Bu hasarın lokal etkiyle sonuçlanmayıp sistemik etkilere de yol açtığı bildirilmiştir (47).

Vasküler homeostaziste esas vital ve dinamik yapıdan kan damarlarının içini döşeyen endotel hücreleri sorumludur. Hipoksi endotel hücrelerinde cNOS ve trombomodulini süprese ederken, adezyon molekülleri ve sitokinlerin oluşumuna neden olur. Endotel hücrelerinin hipoksiye cevabını reperfüzyon şiddetlendirir. Reperfüzyon başladıktan sonra, ciddi ve hızlı endotel disfonksiyonu olur ve morfolojik hücre hasarı gelişir. Uzun iskemiden sonra reperfüzyona eşlik eden morfolojik değişiklikler hücre şişmesi, pinositik veziküllerin kaybı, endotel hücre altındaki bazal membranda yukarı kalkma ve aktive lökositlerin endotel hücre yüzeyine yapışması

olarak gözlenmiştir (17,48). Endotel yüzeyine yapışan nötrofillerin inflamasyon benzeri reperfüzyon cevabında santral rol oynadıkları gösterilmiştir (49,50). Antinötrofil serum ile tedavinin permeabilite artışı ve ödem oluşumunu önleyerek reperfüzyon hasarını azalttığı rapor edilmiştir (20).

Reperfüzyondan sonra ortaya çıkan en önemli patoloji mikrosirkülasyonun bozulmasıdır. Çünkü, vazokonstrüktör ajanlardaki artışa karşın vazodilatatör ajanlar belirgin olarak azalmaktadır. Bu hasar sırasında serbest radikallerin, güçlü vazodilatatör olan NO'nun yararlı etkisini bozarak yüksek sitotoksik etkili peroksinitrit üretimine yol açtığı Kurokawa ve ark 'ları tarafından gösterilmiştir(14).

İskemi – reperfüzyon hasarının mekanizması:

Hipoksi esnasında ATP üretimi durur, fakat kullanımı devam eder. Sonuç olarak, ATP'den yüksek enerjili fosfatların ayrılması ile, AMP ve son olarak adenzin oluşur. Adenzin hızla ekstrasellüler alana difüze olarak inozin ve hipoksantine yıkılır. Normoksik durumlarda hipoksantin ürik asite metabolize olduğu halde, hipoksik durumlarda hipoksantin ürik asite yıkılamaz ve iskemik dokuda birikir (13).

Reperfüzyon hasarında ise iki mekanizma üzerinde durulmaktadır; bunlar aşırı kalsiyum yüklenmesi ve serbest radikal oluşumundaki artıştır (13,14). Reperfüzyonun hücre içi kalsiyum içeriği üzerindeki etkisi ile ilgili ilk çalışma Jennings ve Shen tarafından yapılmıştır (51). Jennings ve Shen reperfüzyonun, kalsiyum fosfatın depolandığı intramitokondrial yoğun cisimciklerin oluşumu ile hücre içine kalsiyum girişinde on katlık bir artmaya neden olduğunu göstermişler ve sitozole aşırı kalsiyum alımı ile mitokondrilerde kalsiyum yüklenmesi sonucu ATP oluşturma yeteneğinin bozulduğunu rapor etmişlerdir (51). Daha sonra Cheung ve arkadaşları ise hipoksi esnasında hücre içi enerjinin azalmasının, enerji bağımlı kalsiyum pompasında

Reperfüzyonun erken reoksijenasyon fazında dokuda serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Nilsson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada parsiyel intestinal iskemi sonrasında reperfüzyonun ilk dakikalarında oksijen radikallerinin üretiminin arttığını göstermişlerdir (15).

Reaktif oksijen metabolitleri:

Stabil moleküllerin çoğunun dış yörüngesinde biri diğerine zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. Bu elektron çiftleri molekülün kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir (9,13,19,48). Serbest radikaller oldukça reaktiftirler ve elektronu çiftlemek için diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimindedirler. Anyonik, katyonik ve nötral karakterde olabilirler. Bir radikal, radikal olmayan bir moleküle reaksiyona girerse başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellikler serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara girebilmesine olanak sağlar.

Yapılan çalışmalarda, serbest oksijen radikallerinin nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, karsinogenezis, radyasyon hasarı ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi biyolojik fenomenlerde rol oynadığı gösterilmiştir (6-9). Serbest oksijen radikallerinin biyolojik moleküllerde geriye dönüşümsüz hasar oluşturduğu bilinmektedir (9).

Reaktif oksijen türleri oksijen atomu veya onların ekivalanları ile ilişkili serbest radikallerdir, bunlar moleküler oksijenden daha reaktiftirler. Reaktif oksijenin O_2^- , H_2O_2 , OH ve 1O_2 olmak üzere dört türü gösterilmiştir (9). Hidrojen peroksit ve singlet oksijen serbest radikal olarak tanımlanmazlar fakat, bu ürünlerin serbest radikallere benzer olduğuna inanılmaktadır (9). Serbest oksijen radikallerinin hepsi aynı derecede toksik değildir. Süperoksit anyon radikali proteinlere saldırmaz fakat, sulu

çözeltilerde hidrojen peroksit oluşturur. Hidrojen peroksit hücre içinde demir ve bakırın katalizlediği bir reaksiyonla hidroksil radikali oluşturabilir. Hidroksil radikali ise yüksek reaktiviteye sahiptir ve kısa ömürlü bir oksiradikaldir. Hidroksil radikali proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler, poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girerek hücre hasarına yol açar (9,13). Diğer biyolojik öneme sahip serbest radikaller LOOH, LOO⁻, LO⁻, bunlar membran lipidleri ile ilişkilidir (9).

Hücrelerin moleküler komponentleri içerisinde reaktif oksijen ürünlerinin en önemli hedefi proteinler, membran lipidleri ve nükleik asitlerdir (9).

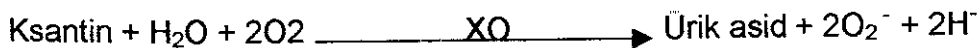
Reaktif oksijen metabolitlerinin oluşum yolları:

• **Oksidatif fosforilasyon:** Mitokondride oksidatif fosforilasyonla ATP oluşurken, moleküler oksijenin dört değerli reaksiyonu ile su oluşur. Ancak, oksijenin yaklaşık %1-5'lik kısmı sitokromlarla katalizlenen bu yoldan dışarı sızarak suya indirgenir ve nonkatalitik univalan indirgenmeye uğrar. Ara ürün olarak süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali salınır (53).

• **Purinlerin yıkımı:** Hipoksi esnasında ATP oluşumu için gerekli oksijen yoktur, ancak ATP'nin kullanımı devam eder ve bunun sonucunda adenozin oluşur. Adenozin ekstrasellüler aralığa geçerek inozin ve hipoksantine yıkılır. Bu aşamadan sonra devreye ksantin oksidaz enzimi girer (13). Öncelikle ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşmesi gerekir (13,52). Bu iki enzim arasındaki fark ise ksantin dehidrogenazın elektron alıcısı olarak NAD kullanmasıdır.



Ksantin oksidaz ise moleküler oksijeni kullanarak süperoksit oluşturur.



Ksantin dehidrogenaz sağlıklı hücrelerde dominant olarak bulunmaktadır.

(13,18). Ksantin oksidaz enzimi lamina propria ve muskularis mukoza kapiller endotelial hücrelerinde tespit edilmiştir (54). Ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü organlar arasında farklılık gösterir. Roy ve arkadaşları ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümünün barsakta hızlı, kalp, böbrek, dalak, karaciğer gibi organlarda yavaş olduğunu göstermişlerdir (55). Hipoksi esnasında hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artış, kalmodulinin regüle ettiği intrasellüler proteazları aktive eder. Aktive proteazlar ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne yol açar (55,56). Endotel hücrelerinde ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü TNF- α , C5_a veya kemotaktik oligopeptit fMLP'nin hücre ile teması sonucunda gerçekleşir (57).

Reoksijenasyondan sonra hipoksantin ürik aside yıkılır ve bu reaksiyonun katalizörü ksantin oksidazdır. Bu reaksiyonda elektronlar moleküler oksijene transfer olur, sonuçta süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşur (13,17,18). İskemi-reperfüzyona uğrayan dokuda serbest radikal üretiminin başlangıç kaynağı ksantin oksidazdır. Allopurinol ile ksantin oksidazın kompetitif inhibisyonu oksijen radikallerinin üretimini azaltır ve nükleotid havuzunu korur (3,13).

• **Solunumsal patlama (respiratory burst):** Nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller, çeşitli uyarılar ile sensitize olarak süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve hipokloroz asit salınımına neden olurlar (18,19). Nötrofillerde radikal oluşumunda primer kaynak NADPH oksidaz veya mitokondrideki elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır (18,19). Nötrofillerin hücre membranındaki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, süperoksit radikali oluşturan önemli bir kaynaktır (23,24). Normalde inaktif formda olan bu enzim, bakteri, mitojen ajan, sitokinler, opsonize partiküller, immün kompleksler, C5_a, formillenmiş peptidler,

lektinler, araşidonik asit metabolizma ürünleri (eikosanoidler) gibi etkenlerle aktive olur, oksijeni hidrojen peroksit ve süperoksit radikaline katalizler. Bu fenomene solunumsal patlama denir (53).



Nötrofillerin primer granüllerinde bulunan MPO enzimi hidrojen peroksit ve klor iyonundan hipokloroz asit oluşumunu katalizler. Hipokloroz asitin kendisi ve bu asitin endojen aminlerle olan reaksiyon ürünleri kuvvetli oksidan ajanlar olup nötrofil toksisitesinden sorumludurlar (4).



Grisham ve arkadaşları nötrofil birikiminin göstergesi olan MPO aktivitesinin iskemi-reperfüzyon grubunda kontrole göre 18 kat arttığını göstermişlerdir (56).

Aktive nötrofillerden oksidatif enzim olan MPO'ın yanısıra hidrolitik enzimler (elastaz, kollajenaz, katepsin, hyaluronidaz) salınır ve doku hasarına katkıda bulunur (19). Aynı zamanda aktive nötrofillerden salınan süperoksit ekstrasellüler sıvıda mevcut kemoatraktanları aktive ederek inflamatuvar cevabı artırır (17-19,59). Yapılan çalışmalarda, antinötrofil serum ve monoklonal antikor tedavisiyle endotelial hücreye nötrofil adezyonunun ve reperfüzyonun neden olduğu kapiller sızıntının azaldığı tespit edilmiştir (20,58).

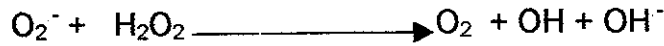
- **Trombosit aktivasyonu ve süperoksit üretimi:**

Bütün aerobik hücrelerde olduğu gibi trombositler de süperoksit üretebilir (59). Leo ve arkadaşları anoksik trombositlerin reoksijenasyonla aktive olduklarını göstermişler ve bu durumu üretilen serbest oksijen radikallerine bağlamışlardır. Aynı çalışmanın devamında serbest oksijen radikali süpürücü ajanlarla trombosit agregasyonunun azaldığını tespit etmişlerdir (60). Anoksi ve reoksijenasyona maruz

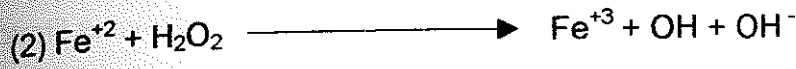
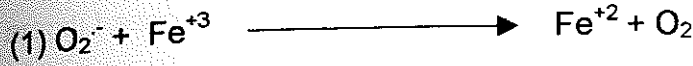
kalan trombositlerden OH ve O₂⁻ radikali salınmaktadır. PGI₂ ve NO, trombosit aktivasyonunu ve damar duvarına yapışmasını inhibe etmekte sinerjistik rol oynar. Anoksik endotelyumda reoksijenasyondan sonra PGI₂ azalır, çünkü serbest oksijen radikalleri siklooksijenazı inhibe eder ve endotelyal hasar nedeniyle NO üretimi azalır. Sonuçta, inhibisyon ortadan kalkacağı için trombositler aktive olur ve ortama serbest oksijen radikalleri salınır (59).

• **Araşidonik asit yolu:** Hücre membranında bulunan potansiyel oksijen radikali kaynağından biri de araşidonik asittir. Bu yolda ara peroksi bileşikleri ve hidroksil radikalleri meydana gelir (19). Bu, lipid peroksidasyonunun ilk ürünleri olan hidro ve endo peroksitler, daha sonra yeni zincirleme reaksiyonları başlatabilecek radikal ürünleri meydana getirebilir (13,19,61).

• **Geçiş metallerinin katalizlediği reaksiyonlar:** Süperoksit radikali değişkendir ve spontan olarak H₂O₂ ve O₂'den oluşur. Süperoksit radikali ve H₂O₂'den yüksek sitotoksik hidroksil radikali üretilir. Bu reaksiyona Haber Weiss reaksiyonu denir (48)



Haber Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır fakat, geçiş metalleri, metal çelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde demir benzeri geçiş metalleri, demir içeren maddeler (transferrin, laktoferrin, hemoglobin, adenozin, 5'difosfat ferrik iyon) mevcuttur. Süperoksit radikali ferrik (Fe⁺³) demiri ferröz (Fe⁺²) demire indirger, aynı zamanda H₂O₂ hidroksil radikaline dönüşür (13,19,48,62-65).



Desferoksamin güçlü bir demir şelatörü olup, Fenton reaksiyonunu inhibe eder ve hidroksil radikalının oluşturduğu hücre hasarını konsantrasyon bağımlı olarak inhibe eder (62,65).

ISKEMİ-REPERFÜZYON HASARI VE NÖTROFİLLER:

Inflamasyona benzer nitelikteki iskemi-reperfüzyon cevabına büyük ölçüde nötrofiller aracılık eder. Reperfüzyonda ortama salınan oksidanlar ve proteazlar, doku hasarına veya ölümüne neden olur. Aynı zamanda inflamatuvar ürünlerin salınımındaki artış dokuda nötrofil aktivasyonuna yol açar. Nötrofillerde oksijen serbest radikalleri üretilir ve degranülasyonla ortama proteazlar, araşidonik asit metabolitleri, inflamatuvar mediatörler salınır (50).

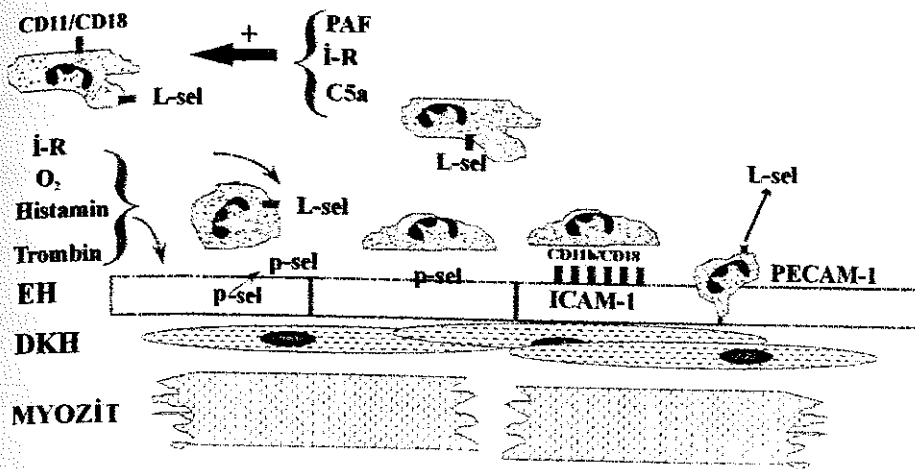
Nötrofil membranı ile ilişkili NADPH oksidaz süperoksit anyon üretir ki bu anyon eriyebilir proinflamatuvar sitokinleri (PAF, C5a, N-formyl peptidler) aktive eder (50).

Oksijen serbest radikal hasarına duyarlı hedef, vasküler endotelyumdur. Oksijen serbest radikalleri endotelial hücrelerden ve diğer kaynaklardan proinflamatuvar mediatörlerin salınımını hazırlar, endotelial adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar. Endotelial hasara oksiradikaller aracılık eder ve bu durum permeabilite artışı, nötrofil adezyonunda artış, antinötrofil ürünlerin (NO ve adenzin) salınımında azalma ile sonuçlanır (50,51).

Serbest oksijen radikalleri, kompleman üretiminin stimülasyonu, endotelial P-selektin ekspresyonu, endotelial yüzeyinde PAF ekspresyonu gibi lökotaktik değişiklikler oluşturur (17,50). Nötrofillerin degranülasyonu ile proteazlar, kollagenazlar, lipooksijenazlar, fosfolipazlar ve MPO salınır. Serin proteaz ve elastaz

nötrofil aracılı hasarda önemli rol oynar (51).

Nötrofil aktivasyonu PLA_2 'yi stimüle eder, LTB_4 ve PAF oluşur (17,51) LTB_4 ve PAF nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonunda, degranülasyonunda ve kemotaksisinde güçlü stimülandır. Aktive nötrofiller prekapiller damarların embolizasyonuna neden olarak mikrovasküler dirence ve akımın engellenmesine katkıda bulunur (50).



Şekil 2: İskemi-reperfüzyon hasarında nötrofil endotel hücre etkileşimi Endotel hücresi (EH), düz kas hücresi (DKH).

Endotelial fonksiyon bozukluğu reperfüzyon hasarının patogeneğinde kritik rol oynar. Bu rol, reperfüzyonun kritik erken fazında ve geç fazında yüzeydeki nötrofiller ile diğer inflamatuvar hücre tiplerinin endotelyuma yaklaşmasını önlemektir. Adezyon molekülleri üç aileden oluşur (50).

a) Selektinler (P-selektin, L-selektin, E-selektin): Reperfüzyonun erken döneminde endotelyum ve nötrofiller arasındaki etkileşim için gerekli glikoproteinlerdir. P-selektin endotelial hücre Weibel-Palade cisimcikleri ve trombositlerin α granüllerinde depolanır. Oksijen radikalleri, trombin, kompleman komponentleri, histamin ve H_2O_2 , P-selektinin endotel yüzeyinde ekspresyonuna yol

açar (49,50). İskemi sonrası, reperfüzyonun 10-20 dakikasında P-selektinin maksimum ekspresyonu oluşur ve sonuçta kana eriyebilir fragmentler dökülür. L-selektin nötrofil yüzeyinde eksprese olarak, erken reperfüzyonda P-selektin için karşı ligand olarak fonksiyon yapabilir. Nötrofil rolingine P-selektin ve sağlam endotelyum aracılık eder. E-selektin ise endotel hücre yüzeyinde geç reperfüzyon döneminde eksprese olur (17,48,50).

b) β_2 integrinler (CD11/CD18 kompleksi): Heterodimerik glikoprotein ailesidir ve nötrofillerin yüzeyinden eksprese olur. 3 farklı α zinciri (CD11_a, CD11_b, CD11_c) ve genel bir β subünit içerir. CD11_b/CD18 kompleksi nötrofillerin sekonder granüllerinde depolanır. Nötrofil rolinginden sonra, bu moleküllerin ekspresyonu başlar (50). CD11_b/CD18 endotel hücresinde en fazla ICAM-1'e bağlanır (49). Bu bağlantı lökositlerin endotelyum boyunca rolingini ve aktivasyonunu artırır (49,50).

c) İmmunglobulin ailesi: ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1'den oluşur (49,50). ICAM-1 nötrofillerdeki CD11/CD18 ile bağlanma özelliğine sahiptir ve vasküler endotelial hücre yüzeyinde eksprese olur. PECAM-1 trombosit, lökosit ve endotel yüzeyinden eksprese olur ve intersellüler bağlantıda yer alır. PECAM-1 nötrofillerin transendotelial migrasyonunda rol oynamaktadır (49,50).

İskemi esnasında dokudan salınan kemotaktik faktörler reperfüze dokuda nötrofil rollingi ve adezyonunu başlatır. Nötrofil aktivasyonu ile sıkı adezyon oluşur. IL-8, C5a, kemotaktik faktörler ve PAF'ın aktivasyonundan sonra nötrofil endotel yüzeyine yapışır (48). PAF ve LTB₄, nötrofil yüzeyinden CD11/CD18'in ekspresyonunu artırırken, IL-1 ve TNF α endotelde ICAM-1 ekspresyonunu artırır (17,50).

Tsao ve Lefer iskemi-reperfüzyonda endotel fonksiyonunu araştırmışlar, reperfüzyonun erken döneminde serbest radikal üretiminin arttığını, SOD'un

azaldığını ve bozulmuş NO salınımını göstermişlerdir (66). Endotelial disfonksiyonun endotelial yapılardaki morfolojik anormalliklerle, intrasellüler vakuolizasyonla ve bazal membran ile subendotelial matriksin ayrılması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (50).

Transendotelial migrasyon endotelial intersellüler bağlantılarda nötrofil CD18 ve integrinler arasındaki etkileşime bağlıdır. Nötrofil yoluyla ekstrasvasküler alana proteazlar (kollajenaz ve elastaz), oksijen metabolitleri (O_2^- , OH^- , H_2O_2), hipokloroz asit ve diğer sitotoksik maddeler salınır, sonuçta doku hasarı oluşur (48).

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN OLUŞTURDUĞU HASAR:

Serbest oksijen radikalleri, özellikle hidroksil radikali, proteinler, nükleik asitler, poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girer. Hücre membranında yüksek konsantrasyonda poliansature yağ asitleri mevcuttur ve serbest oksijen radikalleri hidrojen atomu elde etmek için poliansatüre yağ asitlerinin yan zincirinde bulunan karbonlara saldırır. Böylece karbon merkezli bir L^- oluşur ve bu da genellikle konjuge dien şekline dönüştükten sonra oksijenle reaksiyona girerek LOO^- oluşturur (19,67,68). LOO^- , membranda bulunan komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkararak $LOOH$ ve yeni peroksil radikallerinin oluşmasına neden olur (67-70). Lipid hidroperoksitlerin yıkımı sonucu LO^- , LOO^- gibi radikaller ve MDA, 4-hidroksinonenal gibi aldehitler oluşur, serbest radikaller gibi aldehitler de oldukça toksiktir. Hücre membran komponentlerine etki ederek iyon transportu, enzim aktivitesi, deformabilite gibi membran özelliklerini değiştirebilmeleri yanısıra, DNA'nın nitrojen bazları ile etkileşerek de mutajenik, karsinojenik, genotoksik etki gösterebilmektedirler (70-72). Bu durum hücre yapısında bozukluk ve hücre ölümüne neden olur (13). Ayrıca lipid peroksidleri hiyaluronik asit ve kollajeni yıkarak interstisyel matriks yıkımını

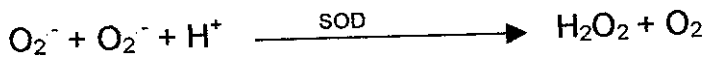
oluşturur (22)

Serbest oksijen radikalleri protein ve nükleik asitlere de saldırarak protein fragmentasyonu, agregasyonu ve proteolitik etkiye duyarlık oluşturur (73,74).

ANTIOKSIDAN SİSTEM

Antioksidan sistem, serbest radikallere karşı organizmanın en önemli silahıdır. Bu sistemi süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler ve antioksidan moleküller (vitamin E, vitamin C, sistein, vitamin A, glutatyon) oluşturur. Oksidan hasar sonucu oluşmuş bozuk yapıları ortadan kaldıran lipolitik enzimler (fosfolipazlar), proteolitik enzimler (proteaz ve peptidazlar) ve DNA tamir enzimleri (nükleazlar) ise sekonder savunma mekanizmasını meydana getirirler (75,76). Sekonder savunmanın görevi oksidan hasara uğrayan hücrel yapıları ortadan kaldırmaktır.

Süperoksit Dismutaz (SOD): SOD süperoksit anyonunu temizleyen primer mekanizma olup, 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından izole edilmiştir (18,19). Süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonuna neden olan bir metalloenzim olan SOD, yapısında taşıdığı metal iyonuna göre üç tiptir (19,26,77).



1) Bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD): Herbiri 16.000 dalton ağırlığında iki polimerden oluşmuştur. Polimerden biri bakır, diğeri çinko içerir. Ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve eritrositlerde bulunur(19, 75,76).

2) Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD): Tetramerik yapıda olup toplam molekül ağırlığı 80.000 daltondur. Her bir alt birimi birer mangan içerir, mitokondri matriksinde lokalizedir (19,78)

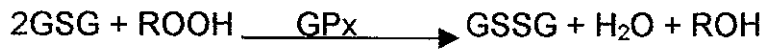
3) Demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD): Bazı bakterilerin (E.coli) periplazmik

bölgelerinde bulunduğu gösterilen Fe-SOD'un dış kaynaklı süperoksit radikallerine karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmektedir (79).

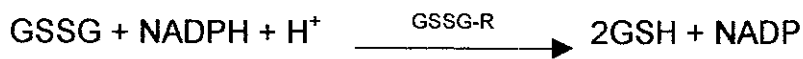
Katalaz (CAT): 240000 dalton molekül ağırlığında, tetramerik yapıda olan ve aktif bölgesinde dört adet ferrihem grubu içeren bir enzimdir (79). Bu enzim esasen sitozolde bulunmaktadır (17). Süperoksit anyonundan oluşan hidrojen peroksiti suya çevirir. Reperfüzyonun dokuda neden olduğu hiperpermeabilite ve mukozal hasarı zayıflatır (13, 19)



Glutasyon peroksidaz (GPx): Hücre mitokondrial matris ve sitozolünde bulunur, organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksidin redüksiyonunu katalize eden GPx'in selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız iki tipi vardır (19,70,80).



Glutasyon Redüktaz (GSSG-R): Glutasyon peroksidazın substrat olarak redükte glutatyon (GSH) ihtiyacı vardır. Glutasyon redüktaz da okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyon (GSH) dönüşüren ve NADPH'a bağımlı olarak çalışan reaksiyonu katalize eder (81,82).



MİDE MUKOZAL BARIYERİ

Davenport ve arkadaşları 1967 yılında yaptıkları çalışmada mide mukozal bariyeri kavramını ortaya atmışlardır (84). Mide mukozal bariyeri iki komponentten oluşmaktadır. Birincisi epitelyal tabakanın üzerini örten ve asit nötralizasyonuna cevap veren mukus jel, ikincisi ise epitelyal tabakanın hızlı rejenerasyon ve tamir yeteneğidir (83). Mide mukozası iyonlara pasif geçirgen olup, bu dokunun geçirgenliği çok düşüktür. Normal şartlarda, mide lümeninden mukozaya asit geçişi çok az düzeydedir, ancak mukozal hasar ve hemorajiye yol açan durumlar asit kaybına neden olur ki bu durum, H^+ iyonunun geri difüzyonuna bağlıdır. Klinik gözlemler peptik ülser patogenezinde mide asitinin önemli rol oynadığını göstermektedir (83,85).

Gastroduodenal mukozadaki koruma mekanizmaları ile ilgili çalışmalar son yirmi yılda yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar, gelişen dünyada yaygın bir hastalık olan peptik ülserin etyolojisinin anlaşılmasında önemlidir. Mide ve duodenumun, kendi dokusunu sindirmesine karşı koymasında ve yüzeysel lezyonların hızlı tamirine katkıda bulunan çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlisi mide mukozal bariyeridir (83-86).

Mide mukozal bariyeri submukozal, epitelyal ve mukus elementlerinin oluşturduğu kompleks bir sistemdir (83,85).

A) Gastroduodenal mukus tabakası:

Gastroduodenal mukus 3 şekilde bulunabilir:

1) Mukus salgılanmadan önce epitelyal hücrelerdeki intrasellüler veziküllerde depolanır.

2) Mukus jel tabakası epitelyal yüzeye sıkıca yapışmış olarak bulunur.

3) Lüminal mukus mobildir ve lüminal içerikle karışmış olarak bulunur.

Epitelyal yüzeye yapışık mukus jel tabakası fiziksel bir bariyer niteliğinde olup, mide salgıları ile epitel hücrelerinin apikal yüzeyinin temasını önleyen hareketsiz tabakadır. Lümendeki mukus ise çözünebilir özelliktedir ve mide korumasında rolü yoktur (83,85,87).

Akut hasarı takiben mukoza reepitelizasyonunda mukoid tabaka kalınlığı koruma ve tamirde önemlidir. Fibrin jel ve mukus boyasıyla boyanan nekrotik hücrelerden oluşan mukoid örtü mukus jel tabakasından 5-10 kat daha kalın olup kolayca mukozadan ayrılır. Mukoid örtü etanole maruz kaldığında ve fiksasyonda kaybolmadığı halde, pepsin ve N-asetil sistein gibi mukoid ajanlarla yıkılır (83,86).

Mukus jel tabakasının kalınlığını nöral, humoral ve parakrin faktörler etkiler. Mukus kalınlığının sistemik olarak enjekte edilen karbakol, sekretin veya topikal uygulanan prostaglandin ile üç katına çıkabildiği gösterilmiştir (85,88). İntrasellüler vezikülde depolanan mukus granüllerden sürekli ekzositozla salınır ve hücrenin apikal yüzeyinden çıkışı patlayıcı tarzdadır (83).

Mukus salgısı visköz jel yapısında olup, protein, lipid, nükleik asit ve musin içerir, bakteriyal ve epitelyal hücrelerden oluşur. Musin %80 karbonhidrat içerir ve glikoprotein yapısında olup, protein, lipid ve nükleik asit düzeyi vizkositeyi etkilemektedir. Mukus geniş aralıktaki pH ve iyonik güç değişikliklerine dirençlidir (83,85,88,89).

B) Mukozal HCO₃ salgılanması:

Midede HCO₃ yüzey epitel hücreleri tarafından salgılanır (83,90). HCO₃ salgılanması doku metabolizmasına bağlıdır. Mide lümenindeki asit ve beslenme HCO₃ salgılanmasını stimüle ederken, stresin neden olduğu sempatik aktivasyon

inhibe eder. HCO_3 , sağlam mide mukozasına yapışan vizkoelastik mukusu alkalinize eder ve lüminal asite karşı ilk savunma mekanizmasını oluşturur. Mukozanın yüksek asidite ve etanol gibi ajanlarla karşılaşması, HCO_3 içeren interstisiyal sıvının pasif difüzyonuna neden olur. HCO_3 'ün pasif difüzyonu hasarlı mukoza üzerindeki fibrin mukoid örtüyü düzenler ve mukozal tamir sürecinde önemlidir (83).

Lüminal asit alkali salgının güçlü stimülanıdır (90). Takeuchi ve arkadaşları tarafından ratlarda alkali salgının stimülasyonu için gerekli mide asiditesinin $\text{pH} < 2$ olması gerektiği gösterilmiştir (91). Asite cevaben artan HCO_3 salgısına mukozal prostaglandinler, sinirsel refleksler ve humoral faktörlerin aracılık ettiği ileri sürülmektedir (83,90,91).

Lokal mukozal prostaglandinler asite maruz kalan mukozanın alkali cevabında önemli mediatördür. Prostaglandin mukozal savunmada anahtar rol oynar ve prostaglandin inhibisyonu ile gastrik mukozal korumanın azaldığı bilinmektedir (88). İnsan ve köpek midesinde asite cevaben bikarbonat salgılanmasındaki artışla, PGE_2 veya immünoprotektif E tipi prostaglandinlerin lümene salınımındaki artışın birlikte olduğu gösterilmiştir (83,91). PGE_2 'nin bikarbonat salgısını artırma mekanizmasında intrasellüler aracılar duodenumda cAMP, midede cGMP'dir. Kalsiyumda bu sürecin intrasellüler mediatörü olarak rol oynar (90).

Duysal nöronların yıkımından sonra asite karşı alkali salınımına cevap azalır. Alkali cevabı olarak transsellüler ve transmembran HCO_3 transportunun yanısıra transmukozal pasif iyon migrasyonunda artış da söz konusudur (83).

Yalancı beslenme mide ve duodenumda HCO_3 salgısını artırmaktadır. İnsan midesinde alkali salgının stimülasyonunun selektif proksimal vagotomi veya muskarinik antagonist ile bozulduğu tespit edilmiştir. Bulgular gastrik cevabın

muskarinik ve mukozal prostaglandin sentezinden bağımsız olduğunu göstermektedir (83,88,90).

Vagal sinirin periferik elektriksel stimülasyonu, bikarbonat salgısını uyarır. VIP, NO duodenal mukozada bikarbonat salgısının güçlü stimulanı olarak bilinmektedir (83,91). Intrahipotalamik CRH uygulamasının da bikarbonat salgısını arttırdığı ve rat midesinde mukozal korumayı güçlendirdiği gösterilmiştir (83). Bunun yanısıra intraserebroventriküler uygulanan TRH'nin duodenal bikarbonat sekresyonunu arttırdığı ifade edilmektedir (83).

Vazopressin veya hemorajik şok mukozal kan akımını azaltarak alkali salgılanmasında azalmaya yol açar (83).

Gastroduodenal epiteldeki bikarbonat salgılanması ve mukus jel lüminal asiti nötralize etmekle görevlidir. Gastroduodenal mukusda yaklaşık %5 musin ve % 90'ın üzerinde aköz faz mevcuttur (83).

Pepsin, lüminal sıvıda $pH < 5$ ise aktive olur. Pepsin oluşumu için prekürsör pepsinojendir, asidik durumlarda aktif enzime dönüşür. İnsan mide sıvısında 7 farklı pepsin (1,2,3,3a,4,5,6) vardır. Pepsin 3 (37,2 kDa) ile pepsin 5 (31,6 kDa) insan mide sıvısında bol miktarda bulunur. Pepsin 1(43,8 kDa) normalde en az bulunan komponenttir fakat, peptik ülserli hastalarda total proteolitik aktivitenin %25'inden sorumludur. Pepsinlerin aktivasyonu için optimum pH farklıdır ve farklı protein ve glikoprotein substratları ile aktive olurlar. Lüminal pepsin düzeylerindeki artış ise mukozal hasara neden olur (91).

C) Epitel tabakasının bütünlüğü :

Normal koşullarda mide mukozasının hidrojen iyonuna karşı permeabilitesi düşüktür. Nedeni, epitel hücrelerinin apikal membranlarında bulunan sıkı

bağlantılardır. Mide mukozal bariyerinin bir bileşeni olan sıkı bağlantılar yüzey epitel hücre tabakasında bulunmaktadır (83,85-87).

Yapılan çalışmalarda nötral pH'da lümen den mukozaya maksimum düzeyde sodyum akımının olduğu gösterilmiştir. Sodyumun H^+ geçişini inhibe ettiğini saptayan araştırmacılar, mide epitelyumundaki kanalların iletkenliği için iki katyonun yarıştığı sonucuna ulaşmışlardır. Bunun yanısıra sodyumun lümen den mukozaya geçişinin asit pH'da çok az olduğunu, lüminal $pH > 10$ iken geçişin birkaç kat arttığı tespit etmişlerdir (83,92).

Hidrofobik epitelyal yüzey, fosfolipid molekülleri içermektedir. Yüzey aktif lipidler mide mukozal yüzeyinde ve mukus salgısında mevcuttur.

D) Mukozal kan akımı:

H^+ mukozaya difüze olduğu zaman, doku asidozisini önlemek için hızla elimine edilir. Bu süreçte mukozal kan akımı santral rol oynamaktadır. Mide kan akımı, mide yapı ve fonksiyonunun korunması için gerekli olup, mukozadaki endojen kimyasal mediatörler, lökotrienler, prostaglandinler gibi sistemik ve metabolik faktörler tarafından düzenlenir (83,93,94). Starlinger ve arkadaşları, tavşan mide mukozasının artan lüminal asite maruz kalması halinde eş zamanlı olarak, mide mukozal kan akımında artış saptamışlar ve intramukozal doku pH'sının normal kaldığını gözlemişlerdir (95). Kan akımını artırmak için vazodilatasyon cevabına intramukozal duysal nöronlardan salınan CGRP ve diğer vazodilatör ajanlar aracılık eder. Duysal sinir sonlarının stimülasyonu gastrik mukozal kan akımını artırır (93).

Ritchie, lüminal asiditeye karşı gastrik mukozal korunmada, kan akımının önemini köpekler üzerinde yaptığı deneylerle göstermiş ve ciddi mukozal hasarın kan akımıyla ters ilişkili olduğunu tespit etmiştir (92).

Hemorajik şokun neden olduğu mukozal iskemide, hızlı intramukozal asidifikasyon ile pH'nın 6.5 olduğu ve mukozada ülserasyon meydana geldiği gösterilmiştir (87). Hemorajik şokta küçük soluk iskemik alanlar ile mukozada superfisial lezyonlar oluşmakta, yeniden kanlanma sırasında lezyonlardan kanama başlamaktadır. Normotansif midede lüminal asit mukozal kan akımının güçlü stimülatörüdür (83,94).

Mukozal iskemi akut gastrik ülserasyon patogeneğinde anahtar rol oynar. Mukozal kan akımındaki artışa sitoprotektif ajan olarak adlandırılan prostaglandinler katkıda bulunur. Mukozayı koruyan prostaglandinlerin lokal veya genel mukozal iskemide azaldığı veya yok olduğu gösterilmiştir (96).

Mukozal kan akımı, H^+ birikimini azaltarak ve yeterli bikarbonat dağılımını sağlayarak koruyucu etki gösterir (83).

Kelly ve arkadaşları mide mukozal bariyerinin yıkılmasının üç aşamada gerçekleştiğini ifade etmişlerdir (86):

- 1) Apikal hücre membranı lümene doğru bombeleşir
- 2) İntersellüler aralıklar genişler
- 3) Epitelyal hücre nekrozu olur ve hücreler dökülür

İntraluminal H^+ azalması, HCO_3 ile nötralizasyona bağlı olmakla birlikte, mide mukozal bariyerinin bozulmasının bir göstergesidir. Nedeni H^+ 'nin mukozadan geri difüzyonudur. İlk kez Davenport tarafından gösterilmiş olan H^+ geri difüzyonunun, epitel tabakasının hidrofobik özelliğinin ve HCO_3 içeren mukus tabakasının kaybına bağlı olduğu ifade edilmiştir (83,84)

Kiviluoto ve arkadaşları, rat mide mukozasının lüminal asite maruz kalması durumunda, subepitelyal mukozal dokuda orta derecede asidifikasyon olduğunu, bu

durumun H^+ 'nin lümeninden mukozaya geri difüzyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir (87). Hemorajinin neden olduğu mukozal iskemi alkali oluşumunu inhibe eder, subepitelyal dokunun derin ve progressif asidifikasyonu mukoza nekrozisi ile sonuçlanır. Mide mukozası bozukluğunda mukozal yüzeydeki alkali zon koruyucu tabakadır. Salınan asiti nötralize ederek, H^+ geri difüzyonunu önler.

ISKEMİ-REPERFÜZYONUN MİDE MUKOZASINA ETKİSİ:

İskemiye takiben reperfüzyon esnasında gastrik mukozada serbest radikaller oluştuğu bilinmektedir (1,2,8,22). Lokal intraarteriel infüzyonla serbest radikal üretiminin stimüle edilmesi midede mukozal hasara neden olmaktadır. Allopurinol ile keantin oksidaz inhibisyonunun veya antioksidanlar ile serbest radikallerin azaltılmasının hemorajik şokta mukozal hasarı azalttığı tespit edilmiştir (2,3). Reaktif oksijen metabolitleri, PGH sentaz için gerekli hidroperoksit aktivatörlerinin önemli kaynağıdır. Kapiller endotelial hücrelerde PGE_2 yapılır. PGE_2 de, mide mukozal kan akımı, bikarbonat ve mukus salgılanmasını düzenleyerek, oksijen radikalleriyle oluşan mukozal hasara karşı önemli savunma mekanizması oluşturmaktadır (97,98). İskemi-reperfüzyon sırasında oluşan OH^- radikali ve H_2O_2 'in mukus glikoprotein salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir (98). Mukusun özellikle reaktif oksijen metabolitleri için fiziksel koruyuculuğunun yanısıra antioksidan etkili olduğu gösterilmiştir (83,89,96,98). Mukus iskemi-reperfüzyonda asit geri difüzyonunu bloke ederek gastrik mukozayı korur (89).

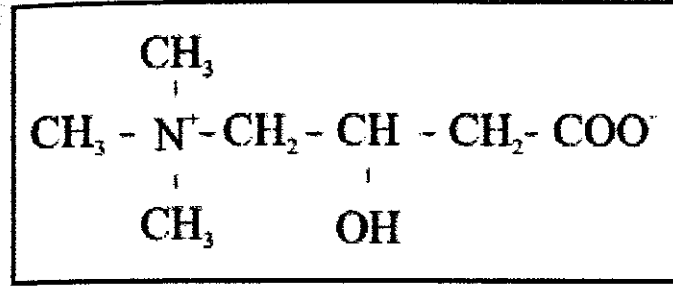
Mide lümenine salgılanan her bir H^+ molekülüne karşı, paryetal hücre bazolateral membranından bir bikarbonat molekülü kana verilir. Mide lümenini örten epitel hücrelerinin serozal yüzeyine komşu olan arteriyoller ve kapillerlere bikarbonat geçişi olur (83)

Ülser oluşturan nedenler intrasellüler asidoziste artışa neden olarak, hücre fonksiyonunu bozar veya hücre ölümüne yol açar. Intrasellüler pH regülasyonu ve pH'nın korunduğu fizyolojik aralık sınırlıdır, dolayısıyla lüminal asite karşı mukozal defans önemli rol oynamaktadır (83).

Sağlam gastrik mukozadaki $\text{Na}^+\text{-H}^+$ değişimi pH regülasyonunda önemlidir, fakat bunun etkisi lüminal asite akut maruz kalma veya bikarbonat miktarının yetersiz olduğu durumlarda görülür. Intrasellüler asidifikasyon ani ve geçici intrasellüler Na aktivitesindeki artışla ilişkilidir, sodyum taşıyan antiport sisteminin fonksiyon bozukluğu sodyum içeri girişini ve pH geri dönüşünü yok eder. Preepitelyal mukus bikarbonat tabakası elimine edilirse bazolateral membran $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiportu aktive olur ve pH'nın kritik regülasyonu başlar (83).

KARNİTİN

İlk olarak 1905 yılında siğir kasında izole edilen karnitinin (3-hydroxy, 4N-trimethylaminobutyricacid) kimyasal yapısı 1927'de ortaya konmuştur (99,100) (Şekil 3).



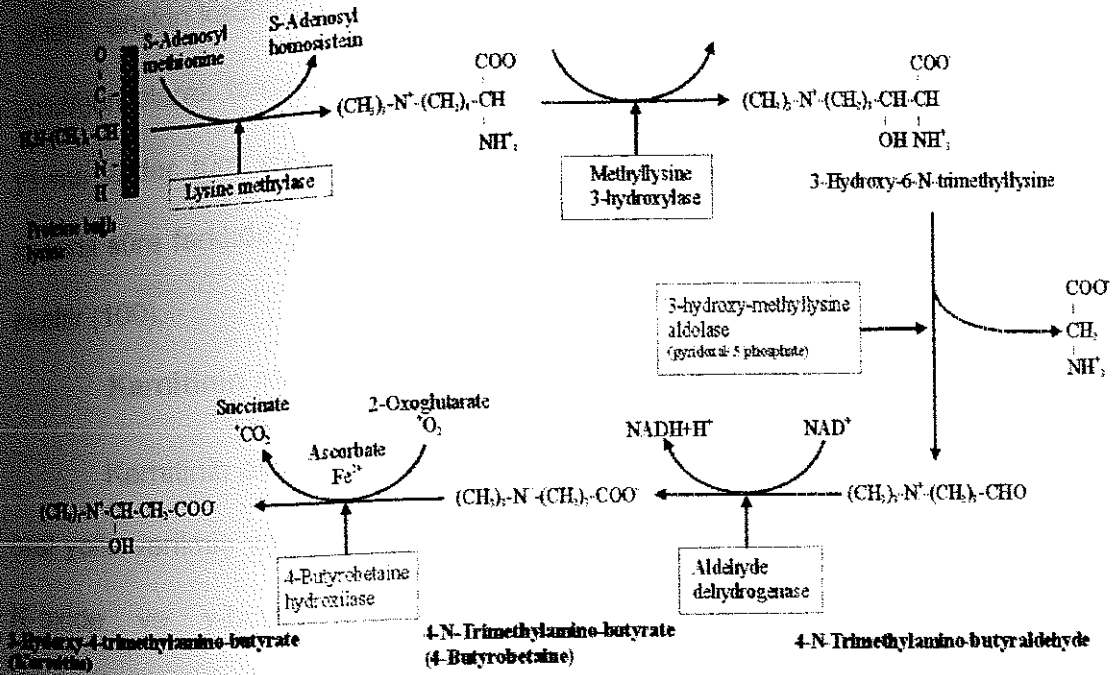
Şekil 3: Karnitinin kimyasal yapısı

Karnitin kaynakları ve absorpsiyonu:

İnsanın ihtiyacı olan karnitin diyetle alınır veya vücutta endojen olarak sentezlenir. Bitkisel gıdaların karnitin içeriği düşük olduğu halde, hayvansal gıdalarda (et, kümes hayvanları, balık ve mandıra ürünleri) yüksektir. Sağlıklı vejeteryan yetişkinlerde, endojen biyosentez normal metabolik karnitin ihtiyacını karşılar (101,102). Gıdalardaki karnitin, serbest karnitindir ve esterifiye formu (kısa ve uzun zincirli açıl karnitin) düşüktür. Diyetteki karnitin suda eriyen vitaminlerle kolay ve tamamen absorbe edilir. Karnitinin günde minimum 8-11 mg alınması gereklidir. Absorbe edilen karnitin miktarı karaciğerde, karnitin sentezini modifiye edebilir (99). İnce barsak mukozasında karnitin aktif transport (<1000µM) ve pasif diffüzyon (>1000µM) olmak üzere iki mekanizma ile absorbe olduğunu gösterilmiştir (100). Anatomik olarak karnitin transportu, duodenum ve jejunumda gösterilmiş ancak ileumda saptanmamıştır (103) Karnitin aktif transportu enerji ve sodyum bağımlıdır ve D-karnitin ile L-asetilkarnitin tarafından inhibe edilir. Karnitin pasif diffüzyonu

Yalnız ince barsakta değil kolonda da mevcuttur. Absorbe olan karnitin, portal kan ile karaciğere taşınır ve sonuçta sistemik dolaşıma katılır (100)

Karnitin sentezi:



Şekil 4: Karnitin biyosentez basamakları

Karnitin yüksek memelilerde esansiyel, intrasellüler bir bileşiktir. Karnitin esansiyel aminoasitler olan L-lysine ve L-methioninden sentezlenir (104,105). Karnitin amino grubu lysinin epsilon amino grubundan, metil grupları ise L-methioninden köken alır (100-102)(Şekil 4). Karnitin tüm sentez basamakları insanda karaciğer, beyin ve böbrekte, sıçanlarda ise karaciğer ve testiste mevcuttur (100-105). Karnitin biyosentezinde demir, askorbik asit, pridoksin ve niyasin kofaktör olarak gereklidir (100-104). Diğer dokular, aktif transport mekanizmasıyla kandan bu bileşiği almak durumundadırlar. Son çalışmalarda gösterilmiştir ki, böbrek ve diğer dokularda karnitin alınımı sodyum bağımlıdır (100). Ekstrasellüler/intrasellüler sodyum gradientine bağlı olarak sodyum ile kotransportu gösterilmiştir (101). Hemen tüm

vücut depoları, (% 98) iskelet ve kalp kasında toplanmıştır. Karaciğer % 1-6 ve ekstraselüler sıvı % 0-6 oranında karnitin içerir (102). Karnitinin serum düzeyleri yaş gruplarında farklılık gösterir. Çocuklarda 25 $\mu\text{mol/L}$ olup, erişkin erkekte 44.2-79.3 $\mu\text{mol/L}$, erişkin kadında ise 28.1-66.4 $\mu\text{mol/L}$ 'dir (105,106). İdrar karnitin miktarı 125 $\mu\text{mol/gün}$ olarak tespit edilmiştir (104). Karnitinin alınması veya sentezinden sonra yıkıma kadar tüm vücutta kalış süresi 66 gün olup, dokulara geçişinden yıkıma kadarki süre farklıdır. Örneğin bu süre kasta 8 gün iken, karaciğer ve böbrekte 11.6 saattir (100).

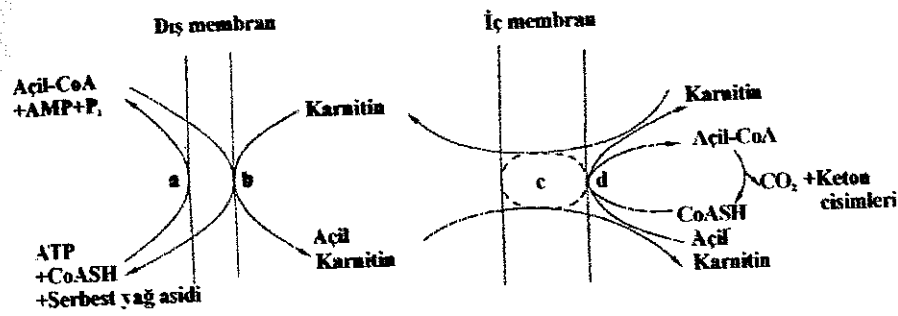
Karnitinin atılımı:

Karnitinin atılım yolu idrardır (100,101). Sıçan ve fare deneylerinde L-karnitin oral yolla verilmiş ve idrarda karnitin metabolitlerinin (trimethylamine, trimethylamine N-oxide ve γ -butyrobetaine) arttığı gösterilmiştir. Normal plazma karnitin konsantrasyonlarında glomerülden filtre olan karnitin % 90'dan fazlası proksimal tübülden reabsorbe edilir ve dolaşıma verilir. Plazma karnitin konsantrasyonu arttığı zaman karnitinin renal reabsorpsiyonu azalır (100). Hem serbest karnitin hem de kısa zincirli açil-karnitin glomerüler filtratla tübüler lümene verilir ve buradan reabsorbe edilir. Normalde idrarda en fazla bulunan açil-karnitin, asetilkarnitindir ve idrardaki asetilkarnitin/serbest karnitin oranı plazmadakinden yüksektir. Çünkü serbest karnitin renal tübüler reabsorpsiyonu açilkarnitinden daha fazladır (100,105)

Karnitinin fonksiyonları:

L-karnitin, bir fizyolojik izomer olarak, toksik olmayan bir maddedir ve LD_{50} değeri yaklaşık olarak aminoasitlerle eşdeğerdir. Uzun zincirli açillerle, karnitin esterleri çok daha toksiktir; örneğin palmitoilkarnitin serbest karnitinden yaklaşık 23 kez daha toksiktir (99).

Karnitin, karaciğer, iskelet ve kalp kasında yağ asidi oksidasyonunu stimüle eder. Karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrial matrikse transportunda ve intramitokondrial açil-CoA/ CoA düzenlenmesinde rol oynar. Karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrial oksidasyonu için gereklidir. Çünkü, karnitin mitokondrial membranda uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrial transportunu aktive eder (107-109)(Şekil5).



Şekil 5: İç mitokondrial membrandan aktive yağ asitlerinin karnitin bağımlı transportu

- Dış mitokondrial membranda Açil CoA sentetaz
- Dış mitokondrial membrandaki dış Karnitin palmitoil transferaz I
- İç mitokondrial membranda Karnitin/ Açilkarnitin translokaz
- İç mitokondrial membranda iç Karnitin palmitoil transferaz II

Karnitinin yukarıda açıkladığımız klasik fonksiyonunun yanısıra tanımlanmış başka fonksiyonları da mevcuttur:

- Kısa zincirli β oksidasyon ürünlerini, peroksisomal açilkarnitin katalizlediği bir reaksiyonla peroksisomdan, mitokondrinin içine göndererek oksidasyonun tamamlanmasını sağlamaya yardımcı olur (109).

- Dallanmış zincirli amino asit metabolizmasında ve sperm metabolizmasında rol alır (109,110).

- Mitojenik stimulasýona karşı, insan lenfositlerinde proliferatif yanıtı arttırır (111,112).
- Polimorfonükleer kemotaksisi arttırır (111,112).
- Clusterin, fetuin veya fibrinojen gibi agregasyon proteinlerinin neden olduğu eritrosit agregasyonunu inhibe eder (113).
- Karnitinin antioksidan etkisi vardır. Deneysel modellerde iskemiden önce karnitin veya karnitin derivelerinin uygulanması oksidan stress ile ilişkili myokard fonksiyon bozukluğunu azaltmıştır (105). Karnitin, oksidan hasardan sorumlu reaktif oksijen metabolitlerinin en önemli kaynağı olan endotelial hücrelerde sitoplazmik kalsiyum düzeyini azaltır ve kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonunu inhibe ederek ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümünün engellenmesine yol açar (30,35,114,115). Karnitinin ksantin oksidaz aktivitesi üzerine direkt inhibitör etkisi de mevcuttur (28).

Karnitin yüksek reaktif oksijen metaboliti olan OH radikalının üretildiği Fenton reaksiyonunda gerekli demir ile şelasyon yaparak bu reaksiyonun inhibisyonuna yol açar (29,30,32,35). Serbest oksijen radikallerinin üretimini bloke eden karnitin, protein ve lipidlerin oksidasyonunu önler ve lipid peroksidasyonunun son ürünleri olan MDA ve konjuge dien düzeylerini azaltır (27,28,38). Karnitin hücre membranını stabilize ederek, serbest radikallere direnç sağlar, oksidan stresle hasarlanan hücre membranının fosfolipid tabakasının tamirini kolaylaştırarak hücreleri oksidatif stresten korur (35).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1) GRUPLANDIRMA VE DENEY PROTOKOLÜ

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Deneysel Hayvanlar Ünitesi ve Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilen çalışmada 104 adet 2 aylık, ortalama 200 g ağırlığında erkek Wistar sıçan kullanılmıştır.

A) GRUPLANDIRMA

Sıçanlar aşağıda belirtildiği şekilde dört gruba ayrılmıştır :

Grup 1: Kontrol grubu (n=26)

Grup 2: Sham opere grup (n=26)

Grup 3: İskemi-reperfüzyon grubu (n=26)

Grup 4: İskemi-reperfüzyon ve karnitin uygulanan grup (n=26)

Her grup için ayrılan 26 sıçandan 6'sında histolojik değerlendirme yapılırken, 10 sıçanda lezyon indeksi saptanmış, mide asit salgısı, PGE₂ ve mukus miktarları, kan ve mide dokusuna ait TBARS düzeyleri ölçülmüş, kalan 10 sıçanda mide dokusu ve kanda SOD, katalaz, GPx aktivitesi ve dokuda MPO aktivitesi saptanmıştır

B) DENEY PROTOKOLÜ

Tüm denekler deneyden 18 saat önce metabolik kafese alınmıştır. Yem alımı engellenirken, su alımı serbest bırakılmıştır. Deney öncesi sıçanlara 1g/kg ürethane intraperitoneal uygulanarak anestezi yapılmıştır.

Kontrol grubu: Sıçanlarda orta hat kesisi ile mide açığa çıkarılmış, özefagogastrik bileşke bağlanarak, duodenumun proksimalinden yapılan küçük bir insizyonla mide içine kanül yerleştirilmiştir. Bu kanül yoluyla 2 kez serum fizyolojik ile yıkanan mideye 2 ml distile su verilerek yarım saat beklenmiştir. Sürenin bitiminde

mide sıvısı ve abdominal aortadan kan alındıktan sonra, mide dışarı çıkarılarak deney sonlandırılmıştır.

Sham opere grup: Sıçanların femoral veni insizyonla açığa çıkarılarak 0.5 ml serum fizyolojik verilmiştir. 5 dakika sonra orta hat kesisi ile çöliak arter izole edilip, mide açığa çıkarılmış ve 1.5 saat bekleme sürecinden sonra, kontrol grubu için belirtilen işlemler benzer şekilde uygulanmıştır.

İskemi-reperfüzyon grubu: Bu gruptaki sıçanlara femoral venden intravenöz yolla 0.5 ml serum fizyolojik verildikten 5 dakika sonra orta hat kesisi ile abdomen açılmıştır. Çöliak arter açığa çıkarılarak klempe edilmiş ve 30 dakika iskemi yapıldıktan sonra klempe alınarak 60 dakika reperfüzyon sağlanmıştır. Bundan sonraki cerrahi işlemler sham opere gruptakine benzer şekilde uygulanarak deney sonlandırılmıştır.

İskemi-reperfüzyon ve karnitin uygulanan grup: Sıçanlara femoral venden intravenöz 100 mg/kg dozda (serum fizyolojik içinde hazırlanmış) L-karnitin (L-Carnitine, Sigma, C-0283) verildikten 5 dakika sonra iskemi-reperfüzyon grubundaki deney protokolü aynen uygulanmıştır.

Dışarı çıkarılan mideler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra uygun büyüklükte parçalara ayrılıp, analiz yapılincaya kadar -80°C 'de saklanmıştır.

II) PARAMETRELERİN TAYİNİ

A) LEZYON İNDEKSİNİN TAYİNİ

Gundersen ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (116).

Yöntem: Deneklerden alınan mideler, küçük kurvatur boyunca açılmış ve mukoza yüzeyi üste gelecek şekilde, fazla gerdirilmeden dondurulmuş parafin üzerine tespit edilerek doku üzerini kaplayacak şekilde serum fizyolojik ilave edilmiştir. Mide mukozası Zeiss Stemi SV 11 marka stereomikroskop altında x20 büyütme ile

incelenmiştir. Mikroskobun görüntü tüpünden koyu bir zemin üzerine yansıtılan görüntüdeki, lezyon alanları Cavalieri Ölçüm Cetveli kullanılarak ölçülmüş ve lezyon indeksi mm^2 olarak ifade edilmiştir

B) MİDE ASİT SALGISININ TAYİNİ

Davis'in uyguladığı yöntemine göre yapılmıştır (117).

Prensip: Mide sıvısının asiditesini serbest ve bağlı HCl miktarı belirler. Mide sıvısındaki HCl'i nötralize etmek için kullanılan NaOH miktarı asit salgısının hesaplanması için esas alınır ve hesaplanan değer total asiditeye denktir

Reaktifler:

1) 0.01 N NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462)

İşlemler: Asit tayini için yarım saatlik bekleme sürecinden sonra alınan 2 ml mide sıvısı, pHmetre (Consort pH Meter P500) ile ölçüm yapılarak pH:7 oluncaya kadar 0,01 N NaOH ile titre edilmiştir. Titrasyonda kullanılan NaOH miktarı esas alınarak 1 saatte salgılanan asit miktarı mEq /saat/2 ml olarak hesaplanmıştır.

C) MUKUS MİKTARININ TAYİNİ

Corne ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (118).

Prensip: Mide mukozal bariyerinin önemli bir komponenti olan mukus miktarının tayini, mukusun yapısındabulunan asidik mukopolisakkaritlerin boyanması esasına dayanır. Alcian blue katyonik bir boya olup, dokudaki polianyonlarla elektrostatik bağ yaparak dokuda tutulur ve asidik mukopolisakkaritlerin boyanmasında spesifik olarak kullanılır. Alcian blue'nin mukoza tarafından bağlanan miktarı mukus miktarı olarak ifade edilir. Dokudaki mukusa bağlı alcian blue MgCl_2 çözeltisi içinde ekstrakte edilir. Ekstraktın içindeki boya, dietileter ile karıştırılarak sıvı faza geçirilip spektrofotometrede okunur.

Reaktifler:

- 1) Tamponlu alcian blue çözeltisi: 0.05 M sodyum asetat (Sodium acetate, Sigma, S-8625), 0.16 M sükröz (Sucrose, Merck, 7653), 1N HCl (Hydrochloric acid, Merck 314) ile pH: 5.8 ayarlanacak), Alcian blue %0.1 (Alcian Blue 8GX, Sigma, A-5268).
- 2) 0.25 M sükröz (Sucrose, Merck, 7653)
- 3) 0.5 M MgCl₂ (Magnesium chloride, Sigma, M-8266).
- 4) Dietileter (Diethylether, Merck, 926).
- 5) Standart : 50-100 µg/ml alcian blue standart çözeltisi

İşlemler: Mide çıkarıldıktan hemen sonra tartılarak, 0.25 M sükröz çözeltisinde yıkanıp 10 ml %0.1'lik tamponlu alcian blue içine konulmuştur. 2 saat 37°C'lik su banyosunda inkübe edilmiş, inkübasyonun 15 ve 45. dakikalarında mide 0.25 M sükröz ile yıkanıp inkübasyona devam edilmiştir. 2 saatin sonunda 0.25 M sükröz ile yıkanan mide 10 ml 0.5 M MgCl₂ içine alınıp, 37°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra doku uzaklaştırılarak, MgCl₂ çözeltisi bir tüp içinde 10 ml dietileter ile karıştırılmıştır. Altta kalan su fazı alınarak, spektrofotometrede (Schimadzu UV 1600) 605 nm dalga boyunda absorbansı belirlenmiştir. 50-100 µg/ml alcian blue çözeltisi standart olarak kullanılmış, mukus miktarı gram doku başına µg olarak hesaplanmıştır.

D) MUKOZAL PGE₂ MİKTARININ TAYİNİ

Cockrell ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (119).

Reaktifler:

- 1) Kloroform (Chloroform, Merck, 2431)
- 2) Asetonitril (Acetonitril, Merck, Art. 80001)
- 3) Benzen (Benzene-d₆, Sigma, B-9381).

4) Asetik asit (Acetic acid, Sigma, 23F-6090)

5) Azot gazı (HABAŞ)

6) Standart: 50-100-200 pM PGE₂ (Sigma kat no: P4172) standart çözeltileri

İşlemler: Çıkarılan midelerden, aynı bölgeden olmak üzere, buz üzerinde mukoza kazıntıları alınmış ve analiz yapıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Analiz öncesinde mukoza kazıntıları tartılmış, dokuların üzerine 2 ml kloroform konularak 1 dakika süreyle 3500 rpm'de homojenize edilmiştir (Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatör). Homojenizasyondan sonra +4°C'de, 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek üst sıvı alınmış, doku üzerine tekrar 2 ml kloroform eklenip, homojenize edilmiştir. Aynı koşullarda santrifüj edilip, alınan üst sıvı öncekinin üzerine ilave edildikten sonra, elde edilen ekstrakt azot gazı altında uçurulmuştur.

Analiz yöntemi: Kloroformu uçurulmuş ekstrakt içeren tüplere, 1 ml PGE₂ analizi için hazırlanmış solvent [su (%76.7), asetonitril (%23.0), benzen (%0.2), asetik asit (%0.1)] konularak 30 saniye vortekslenmiş ve 0.45 µm'lik filtreden süzülüp analize hazır hale getirilmiştir.

PGE₂ analizi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC; Varian 5000 model) ile yapılmıştır. Analiz için SP C18 (15 cm x 4 mm boyutunda, 3 µm partikül büyüklüğü olan ters faz) kolon kullanılmıştır. Kolondan geçecek solvent (mobil faz) hızı 1 ml/dakika, ısı 28°C, UV ışığın dalga boyu 254 nm olacak şekilde gerekli ayarlamalar yapılmıştır. Standart olarak 50-100-200 pM PGE₂ çözeltileri kullanılmış ve üstte belirtilen koşullarda PGE₂'nin kolondan çıkış zamanı (RT); 2.11±0.071 dakika olarak tespit edilmiştir. Kromatografik ayrışımın miktar analizi Varian 4290 model integratör ile yapılmıştır. Bunun için integratörde tespit edilen standart PGE₂'ye ait tepenin alanı esas alınarak, mide dokularındaki PGE₂ miktarı pM olarak hesaplanmıştır.

E) TBARS TAYİNİ

Stocks ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (120).

Prensip: Lipid peroksidasyon ürünlerinin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu kompleksin 532 nm dalga boyunda maksimum absorptans vermesi ve bu absorptansın spektrofotometrik ölçümü esasına dayanır.

1) Eritrosit TBARS Tayini

Reaktifler:

- 1) Fosfat NaCl tamponu (pH: 7.4) : 0.5 M KH_2PO_4 (Potassium phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 0.5 M K_2HPO_4 (Potassium phosphate, Sigma, P-8281), 0.15 M NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400).
- 2) Triklorasetik asit (Trichloroacetic acid, Sigma, T-4885), %94.3'lük stok çözeltiden %56'lık olarak hazırlanır.
- 3) Tiyobarbitürik asit (Thiobarbituric Acid, Sigma, T-5500), 5 g TBA ve 25 ml 1N NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462), distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.
- 4) Standart : 1012.5 nmol/L Tetraetoksipropan (1, 1, 3, 3-tetraethoxy-propane, Sigma, T-9889), stok standart çözeltisinden distile su ile sulandırılarak hazırlanır

İşlemler: Plazması ayrılmış eritrosit paketi 3 kez fosfat NaCl tamponu ile yıkandıktan sonra yine aynı tampon ile 7 kez dilüe edilmiş ve 3 ml'si ayrı bir tüpe alınarak üzerine 2 ml TCA çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, 3 ml süpernatant alınarak üzerine 1ml TBA çözeltisi eklenmiş ve hızlı bir şekilde 15 dakika süre ile kaynatma işlemi yapılmıştır. Kaynatma işleminin ardından tüpler musluk suyu altında soğutulmuş, mevcut bulanıklığın kaybolması için 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, 532 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapılmıştır (Schimadzu UV 1600). 7 kez sulandırılmış eritrosit paketinden

Siyanmethemoglobin yöntemine göre hemoglobin tayini yapılarak TBARS düzeyleri nmol/g Hb olarak hesaplanmıştır.

Hemoglobin ölçümü:

Tietz ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (121).

Prensip: Alkali pH'da potasyum ferrosiyanür varlığında, hemoglobin ve sulfhemoglobin dışındaki hemoglobin deriveleri methemoglobine oksitlenir.

Methemoglobin ise potasyum siyanür ile birlikte siyanmethemoglobin bileşimini oluşturur. Son bileşiğin maksimum absorbands verdiği 546 nm dalga boyundaki renk şiddeti hemoglobin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Reaktifler:

1) Drabkin ayırıcı: 140 mg KH_2PO_4 (Potassium phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 200 mg potasyum ferrisiyanid (Potassium ferricyanide, Sigma, P-8131), 50 mg potasyum cyanide (Kaliumcyanid 96-98%, Merck, 4965) ve %30'luk 2 ml triton X (Triton X-100, Sigma, Lot 31H0585) karışımı üzerine 1100 ml distile su eklenerek hazırlanır.

2) Standart : 5 g/dl hemoglobin standart çözeltisi (Hemoglobin, Sigma, H-7379).

İşlemler: 5 ml drabkin ayırıcı üzerine, fosfat NaCl tamponu ile 7 kez sulandırılmış eritrosit paketinden 50 μl eklenerek 15 dakika oda ısısında ve karanlıkta bekletilmiştir.

Bu sürenin sonunda tüplerin absorbandsları 546 nm'de köre karşı okunmuştur.

2) Doku TBARS Tayini

Reaktifler:

1) Homojenizasyon sıvısı (pH 7.4): 0.05 mol/L K_2HPO_4 (Potassium phosphate, Sigma, P-8281), 0.05 mol/L KH_2PO_4 (Potassium phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 150 mmol/L KCl (Kalium chlorid, Merck, 4935), 5 mmol/L EDTA

Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium salt, Sigma, ED4SS), Triton-X (Triton X-100, Sigma, Lot 31H0585) %0.8

2) Trikloroasetik asit (Trichloroacetic Acid, Sigma, T-4885), %94.3'lük stok çözeltiden %55'lik olarak hazırlanır.

3) Tiyobarbitürik asit (Thiobarbituric Acid, Sigma, T-5500), 5 g TBA ve 25 ml 1N NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462), distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

4) Standart : 1012.5 nmol/L Tetraetoksipropan (1, 1, 3, 3-Tetraethoxy-propane, Sigma, T-9889), stok standart çözeltisinden distile su ile hazırlanır.

İşlemler: Mide dokusu 2 ml homojenizasyon sıvısı içerisinde Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9000 rpm de 30 saniye süreyle homojenize edilmiştir.

Homojenize edilen dokuların üzerine 5 ml daha homojenizasyon sıvısı eklenerek bu homojenattan tüplere 3 ml alınmış, üzerine 2 ml TCA çözeltisi ilave edildikten sonra,

4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatandan 3 ml alınarak üzerine 1 ml TBA eklenmiş ve zaman kaybetmeden 15 dakika kaynatılmıştır.

Kaynatma işleminin ardından tüpler musluk suyu altında soğutulmuş ve 532 nm'de köre karşı okuma yapılmıştır (Schimadzu UV 1600). Homojenattaki protein miktarı

ölçülerek doku TBARS düzeyleri nmol/g protein olarak ifade edilmiştir.

Protein ölçümü:

Lowry yöntemine göre yapılmıştır (122).

Prensip: Alkali ortamda proteinlerin Cu^{+2} ile reaksiyona girerek oluşturdukları bakır peptid komplekslerinin, folin reaktifi mevcudiyetinde tirozin ve triptofan kalıntıları ile birleşerek renkli bileşikler oluşturmaları ve bunların spektrofotometrik olarak saptanması esasına dayanır.

Reaktifler:

1) 1N NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462).

2) D reaktifi : 10 ml Na₂CO₃ anhidroz (Natrium carbonat Wasserfrei reinst, Merck, 6398) %2, 0.1 ml CuSO₄ (Kupper (II)-sulfat-Pentahydrat, Merck, 2787) %1'lik, 0.1 ml Natrium tartarat (di-natrium tartarat, Merck, 6662)

3) Folin reaktifi %1 (Folin&Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma, F-9252).

4) Standart : Bovin serum albümin (Albümin Bovine, Sigma, A-8022), 1 mg/ml'lik çözeltisi.

İşlemler: 0.1 ml süpermatan veya standart çözelti üzerine 0.1 ml NaOH ve 1 ml D reaktifi eklenerek 20 dakika karanlıkta ve oda ısısında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, tüm tüplere 0.1 ml folin reaktifi eklenerek yine karanlıkta ve oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Bunu takiben tüplerin üzerine 2'şer ml distile su konularak absorbanları 500 nm dalga boyunda köre karşı okunarak değerlendirilmiştir (Schimadzu UV 1600).

F) ANTIOKSİDAN ENZİMLER

1) SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Misra ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (123).

Prensip: Epinefrinin otooksidasyonu sonucu adrenokrom oluşumu Cu/Zn-SOD ile inhibe edildiğinden, adrenokromun maksimum absorban verdiği 480 nm dalga boyundaki absorban değişikliği Cu/Zn SOD inhibisyonu ile ilişkilidir.

a) Eritrosit Cu/Zn-SOD Aktivitesinin Tayini

Reaktifler:

1) Fosfat NaCl tamponu (pH:7.4): 0.5 M KH₂PO₄ (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 0.5 M K₂HPO₄ (Potassium phosphate, Sigma, P-8281),

0.15 M NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400).

2) Na₂CO₃ (Natriumcarbonat, Merck, 6398) / NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat, Merck, 6323) tamponu (0.3 M, pH 10.2).

3) EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium Salt, Sigma, ED4SS): 0.75M.

4) Epinefrin (Epinephrine Hydrochloride, Sigma, E-4642), 3.6 mM, pH 2 : taze hazırlanır.

5) Standart : 0.625, 1.25, 2.5 Ü Süperoksit dismutaz (Superoxide dismutaz, Sigma, S-2515) standart çözeltileri kullanılmıştır.

İşlemler: Kanın plazması ayrıldıktan sonra 3 kez fosfat NaCl tamponu ile yıkanan eritrosit paketine 1/5 oranında distile su eklenip vortekslenerek hemolizat hazırlanmıştır. Hazırlanan hemolizat, bikarbonat tamponu ile 200 kez dilüe edilerek SOD aktivitesinin tayini için kullanılmıştır. Tüplere 550 µl bikarbonat tamponu, 400 µl EDTA konulduktan sonra, kontrol tüpüne 750 µl bikarbonat tamponu, numune tüpüne 750 µl hemolizat ve standart tüpüne 750 µl standart çözelti ilave edilmiştir. Tüplere en son 500 µl adrenalin eklenip karıştırıldıktan sonra 480 nm'de absorbans değişimi 3 dakika boyunca izlenmiştir (Schimadzu UV 1600). Ölçüm yapılırken ortam ısı 30°C'ye ayarlanmıştır. İlk dilüsyondan siyanmethemoglobin metodu ile hemoglobin tayini yapılarak SOD aktivitesi hesaplanmıştır.

Aktivitenin Hesaplanması: Kontrol tüpünde enzim olmadığından epinefrinin adrenokroma oksitlenmesi inhibe edilemez, diğer bir deyişle kontrol tüpündeki inhibisyon yüzdesi sıfır kabul edilir. Numune tüpündeki inhibisyon yüzdesi ise SOD konsantrasyonu ile orantılıdır. Standardın inhibisyon yüzdesi ile numunenin inhibisyon yüzdesi oranlanıp U (ünite) olarak enzim aktivitesi hesaplanmış, ilk hemolizatın hemoglobin değerine bölünerek, SOD aktivitesi U/g Hb olarak belirtilmiştir.

b) Mide Dokusunda SOD Aktivitesinin Tayini

Reaktifler:

- 1) Fosfat tamponu (pH 7.4): 50 mM KH_2PO_4 (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 50 mM K_2HPO_4 (Potassium phosphate, Sigma, P-8281).
- 2) Na_2CO_3 (Natriumcarbonat, Merck, 6398) / NaHCO_3 (Natriumhydrogencarbonat, Merck, 6323) tamponu (0.3 M, pH 10.2).
- 3) EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium Salt, Sigma, ED4SS): 0.75 M.
- 4) Epinefrin (Epinephrine Hydrochloride, Sigma, E-4642), 3.6 mM, pH:2 taze hazırlanır.
- 5) Standart : 0.625, 1.25, 2.5 Ü Süperoksit dismutaz (Superoxide dismutase, Sigma, S-2515) standart çözeltileri kullanılmıştır

İşlemler: Mide dokuları 2 ml fosfat tamponu içerisinde Tri-R Stir-R marka K13 model homojenizatörde 9000 rpm'de 30 saniye homojenize edilmiştir. Homojenize edilen dokuların üzerine 2 ml daha fosfat tamponu ilave edilerek 4 ml'lik homojenat oluşturulmuş, bu homojenattan 1.5 ml alınarak 25000 rpm'de, $+4^\circ\text{C}$ 'de, 60 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant alınarak bikarbonat tamponu ile 1/50 oranında dilüsyon yapılmış ve bu dilüsyon ölçüm için kullanılmıştır. Tüplere 550 μl bikarbonat tamponu, 400 μl EDTA, konulduktan sonra, kontrol tüpüne 750 μl bikarbonat tamponu, numune tüpüne 750 μl homojenat ve standart tüpüne 750 μl standart çözeltili ilave edilmiştir. Tüplere en son adrenalin eklenip karıştırıldıktan sonra 480 nm'de absorbans değişimi 3 dakika boyunca izlenmiştir (Schimadzu UV 1600). Ölçüm yapılırken ortam ısı 30°C 'ye ayarlanmıştır.

İlk homojenattan Lowry yöntemiyle protein ölçümü yapılarak aktivite tayini eritrositteki gibi hesaplanmıştır.

2) KATALAZ AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Aebi ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (124).

Prensip: H_2O_2 , katalazın etkisiyle O_2 ve H_2O 'ya parçalanırken 240 nm'de reaksiyon karışımındaki absorbans azalması izlenerek katalaz aktivitesi hesaplanmaktadır.

a) Eritrositte Katalaz Aktivitesinin Tayini

Reaktifler:

- 1) Fosfat NaCl tamponu (pH:7.4): 0.5 M KH_2PO_4 (Potassium phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 0.5 M K_2HPO_4 (Potassium phosphate, Sigma, P-8281), 0.15 M NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400).
- 2) Fosfat tamponu (50 mM/L, pH 7): 50 mM/L KH_2PO_4 (Potassium phosphate monobasic anhydrous, Sigma P-5379), 50 mM/L $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ (Dinatriumhydgenphosphat-Dihydrat, Merck, 6576).
- 3) H_2O_2 (Hydrogen peroxide solution % 35, Merck, 8600) 30 mM, 50 mM/L fosfat tamponu içerisinde ve taze olarak hazırlanır.

İşlemler: Kanın plazması ayrılıp, eritrositler 3 kez fosfat NaCl tamponuyla yıkandıktan sonra elde edilen eritrosit paketine 1/5 oranında distile su eklenerek hemolizat elde edilmiştir. Hemolizat fosfat tamponu ile 1/500 oranında dilüe edilerek ölçüm için kullanılmıştır. Bu son hemolizattan 1 ml alınarak üzerine 0.5 ml H_2O_2 ilave edilmiş ve 240 nm'de 25°C'de absorbans değişimi 15 saniye süre ile izlenmiştir (Schimadzu UV 1600) İlk dilüsyondan syanmethemoglobin yöntemi ile hemoglobin ölçümü yapılarak katalaz aktivitesi hesaplanmıştır.

Aktivitenin hesaplanması: Eritrositte katalaz aktivitesinin tayini için birinci derece reaksiyon sabiti (k) kullanılmıştır.

$k = 2.3/\Delta t \times \log (A_0/A_{15})$ formülü üzerinden, dilüsyonlar (2500 kez) ve hemoglobin değeri hesaba katılarak katalaz aktivitesi k/g Hb olarak değerlendirilmiştir.

b) Mide Dokusunda Katalaz Aktivitesinin Tayini

Reaktifler:

- 1) Fosfat tamponu (pH 7.4): 50 mM KH_2PO_4 (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 50 mM K_2HPO_4 (Potassium phosphate, Sigma, P-8281).
- 2) Fosfat tamponu (50 mM/L, pH 7): 50 mM/L KH_2PO_4 (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma P-5379), 50 mM/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Dinatriumhydgenphosphat-Dihydrat, Merck, 6576).
- 3) H_2O_2 (Hydrogen peroxide solution % 35, Merck, 8600) 30 mM, 50 mM/L fosfat tamponu içerisinde ve taze olarak hazırlanır.

İşlemler: Mide dokuları 2 ml bifosfat tamponu (pH:7.4) içinde Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9000 rpm'de 30 saniye homojenize edilmiştir, üzerine 2 ml daha bifosfat tamponu ilave edilerek 4 ml'lik homojenat elde edilmiştir. Bu homojenattan 1.5 ml alınıp 3000 rpm'de, $+4^\circ\text{C}$ 'de, 15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, oluşan süpernatanın 20 μl 'si, 1 ml fosfat tamponu içine ilave edildikten sonra, 240 nm'de 25°C 'de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (Schimadzu UV 1600). İlk elde edilen homojenattan Lowry yöntemi ile protein miktarı ölçülmüş ve katalaz aktivitesi yukarıda belirtildiği şekilde hesaplanarak k/g doku proteini şeklinde ifade edilmiştir.

3) GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Paglia ve Valentina'nın birleşik enzim metodu modifiye edilerek yapılmıştır (125).

Prensip: Redükte glutatyon glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen bir

glutasyonu t-butil hidroperoksit (t-BOOH) kullanılarak okside edilir. Bunu takiben ortama eklenen glutatyon redüktaz ortama ilave edilen NADPH'ı kullanarak okside glutatyonu yeniden redükler, oluşan NADPH absorbansındaki azalma ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanır.

4) Eritrositte Glutatyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Reaktifler:

1) Fosfat Tamponu (50 mM, pH:7.2) 50 mM KH_2PO_4 (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 50 mM K_2HPO_4 (Potassium phosphate, Sigma, P-8281).

2) Reaksiyon Karışımı: 0.3 M EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium Salt, Sigma, ED4SS), 0.1 mM NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Sigma no. N-2385), 0.5 Ü Glutatyon Redüktaz (Sigma no. G-3664), NaN_3 0.5 mM (Sodium azide Sigma no. S-8032). Bu maddeler 15 ml fosfat tamponu içinde çözüldü.

3) Redükte glutatyon (GSH) : 0.0015 g glutatyon 2 ml tamponda çözüldü.

4) t-butil hidroperoksit (t-BOOH): 54,78 µl/100 ml olacak şekilde hazırlandı.

5) Stabilize edici çözelti: 2.7 mM EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium Salt, Sigma, ED4SS) ve 0.7 mM 2-merkaptoetanol (Sigma no.6250) ile hazırlandı.

İşlemler: Stabilize edici çözelti ile eritrosit paketinden %1 gHb içerecek şekilde hemolizat hazırlanmıştır. Tüplere 750 µl reaksiyon karışımı, 50 µl hemolizat, 100 µl t-BOOH, numune tüplerinin birine 100 µl GSH, diğer numune tüpüne ise 100 µl distile su ilave edilmiştir. 340 nm'de, 3 dakika süreyle numunelerin absorbans değişimleri izlenmiştir.

Aktivitenin Hesaplanması: GSH (+) ve GSH (-) tüplerin ΔOD 'si bulundu. Daha

sonra bu değer aşağıdaki formüle yerleştirilerek gHb başına düşen enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

Se-GSH-Px Aktivitesi (U/g Hb): $[\text{GSH}(+)\Delta\text{OD} - \text{GSH}(-)\Delta\text{OD}/311 \times \text{g Hb}] \times 10^5$

311 = 6.22 (1 molar maddenin absorbansı) x 50 (Hemolizat hacmi)

b) Mide Dokusunda Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Reaktifler:

1) Fosfat Tamponu (50 mM, pH:7.2) 50 mM KH_2PO_4 (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 50 mM K_2HPO_4 (Potassium phosphate, Sigma, P-8281).

2) Reaksiyon Karışımı: 0.3 M EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium Salt, Sigma, ED4SS), 0.1 mM NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Sigma no. N-2385), 0.5 Ü Glutasyon Redüktaz (Sigma no. G-3664), NaN_3 0.5 mM (Sodium azide Sigma no. S-8032) Bu maddeler 15 ml fosfat tamponu içinde çözüldü.

3) Redükte glutasyon (GSH) : 0.0015 g glutasyon 2 ml tamponda çözüldü

4) t-butil hidroperoksit (t-BOOH): 54,78 $\mu\text{l}/100$ ml olacak şekilde hazırlandı.

5) Stabilize edici çözelti : 2.7 mM EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium Salt, Sigma, ED4SS) ve 0.7 mM 2-merkaptoetanol (Sigma no.6250) ile hazırlandı.

İşlemler: Yaklaşık 200 mg mide dokusu 500 μl fosfat tamponu içinde homojenize edilip, homojenatlar $+4^\circ\text{C}$ 'de 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir (MR 1822 Heraeus Biofuge Marka santrifüj) Elde edilen süpernatantlardan Se-GPx aktivitesi ve protein miktarı saptanmıştır. Tüplere 750 μl reaksiyon karışımı, 50 μl süpernatant 100 μl t-BOOH, numune tüplerinin birine 100 μl GSH, diğer numune tüpüne ise 100 μl distile su ilave edilmiştir. Hemolizatlarda olduğu gibi 340 nm'de, 3'er dakika süreyle

renklerin absorbans değişimleri izlenmiştir.

Aktivitenin hesaplanması: Aktivite aşağıdaki formülde değerler yerine konarak g
protein başına hesaplanmıştır.

Se-GSH-Px Aktivitesi (U/g protein): $[GSH(+)\Delta OD - GSH(-)\Delta OD / 311 \times g \text{ protein}]$
 $\times 10^3$

311 = 6.22 (1 molar maddenin absorbansı) \times 50 (Hemolizat hacmi)

6) MYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Murakami ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (40).

Prinip: MPO tarafından oksitlenen H_2O_2 'in O-dianisidine'i redüklemesi ve bu redüklenmiş ürünün spektrofotometrik olarak absorbans değişiminin izlenmesi esasına dayanır.

Reaktifler:

- 1) Fosfat tamponu (50 mM, pH 6): 50 mM Na_2HPO_4 (Dinatrium-hidrojen fosfat, Merck, 1.06574.100), 50 mM NaH_2PO_4 (Sodiumdihydrogen phosphate, Merck, 8370), 1 N HCl (Hydrochloric acid, Merck 314) ile pH:6'ya ayarlanır.
- 2) Homojenizasyon tamponu: %1 oranında HTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma, H-5882) içerir ve fosfat tamponu ile hazırlanır.
- 3) Reaksiyon tamponu : %0.0005 H_2O_2 (Hydrogen peroxide solution % 35, Merck, 8600) ve ml'sinde 1.25mg O-dianisidine dihydrochloride (Sigma, Some-3252) içerir ve fosfat tamponu (50 mM, pH:6) ile hazırlanır
- 4) 1 Ü MPO standardı (Myeloperoxidase, Sigma, M-6908).

İşlemler: 5 ml homojenizasyon tamponu içine konulan mide dokusuna 3 kez 10 saniyelik sürelerle buz içinde sonikasyon yapılmıştır (Branson Sonifier-250). Elde edilen homojenatlar analiz yapılincaya kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklanmıştır. Analiz öncesinde homojenat, 8000 rpm'de, $+4^{\circ}C$ 'de, 30 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan

süpernatandan 0.1 ml alınmış ve üzerine 0.55 ml reaksiyon tamponu ilave edilip
nenin kuvvet alt üst edilerek 460 nm'de 6.5 dakika süreyle köre (fosfat tamponu)
kayı absorbans değişimi izlenmiştir. Ölçüm esnasında oda ısı 25°C'ye
ayarlanmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatandan Lowry yöntemi ile protein
ölçümü yapılarak MPO aktivitesi hesaplanmıştır.

Aktivitenin hesaplanması: 1Ü MPO'daki absorbans değişimi numunenin absorbans
değişimi ile oranlanarak, MPO aktivitesi U/g protein olarak hesaplanmıştır.

H) HISTOLOJİK İNCELEME

Işık mikroskobu çalışması için her gruptan 6 hayvanın mideleri kullanılmıştır.
Her hayvandan alınan mide dokusu örnekleri %10'luk nötral formaldehidde (pH 7.2)
teşpit edilmiş, bunu ethanol serilerinde dehidrasyon, ksilolde şeffaflandırma ve
parafine gömme işlemleri takip etmiştir. Doku blokları lüminal yüzeye dik olarak 6 µm
kalınlığında seri kesilmiş, her üç kesitten biri alınarak her sıçandan 12 kesit
toplanmıştır. Bu kesitlere histolojik detayın belirlenmesi için hematoksilin-eosin
boyama tekniği uygulanarak histolojik ve morfometrik çalışma yapılmıştır (126). Bütün
kesitler, PZO ışık mikroskobunda değerlendirilerek, fotoğraflandırılmıştır.

I) İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

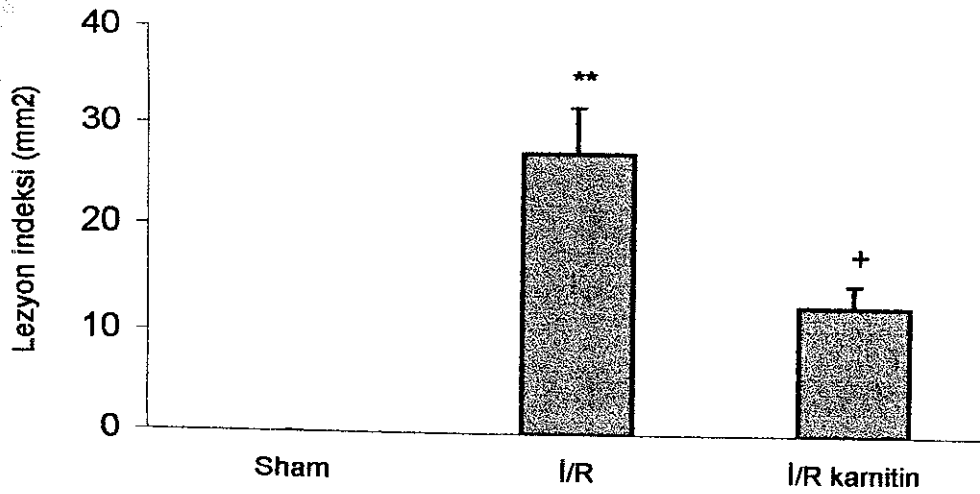
Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Sonuçların
değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış, gruplar arası
değerlendirme Tukey testi ile yapılmıştır. P<0.05 üzeri değerler istatistiksel olarak
önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonrasında kontrol grubu ile sham opere grup arasında önemli fark bulunmadığından, gruplar arası karşılaştırmada sham opere grup kullanılmıştır.

1. Mide mukozasında lezyon indeksi:

Sham opere grupta mide mukozasının görünümü tamamen normal iken, iskemi-reperfüzyon sonrasında mide mukozasında $27.28 \pm 4.75 \text{ mm}^2$ lezyon tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Karnitin uygulanması iskemi-reperfüzyona bağlı hasarı belirgin şekilde azaltmış ($12.71 \pm 2.06 \text{ mm}^2$) ve bu azalış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$)(Şekil 6).



Şekil 6: Mide mukozasında lezyon indeksi

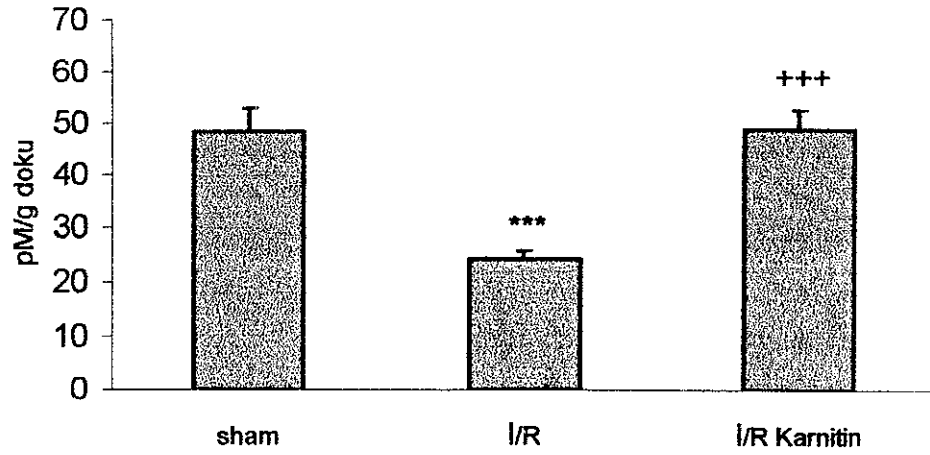
** $p < 0.01$ Sham opere grup ile iskemi-reperfüzyon grubunun karşılaştırılması

+ $p < 0.05$ iskemi-reperfüzyon grubu ile iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunun karşılaştırılması

2. Mukozal PGE₂ miktarı:

Mide mukozasının PGE₂ miktarı sham opere sıçanlarda $48.08 \pm 4.63 \text{ pM/g}$ doku iken, iskemi-reperfüzyon PGE₂ miktarında belirgin azalışa neden olmuştur ($24.00 \pm 1.66 \text{ pM/g}$ doku) ($p < 0.001$). Karnitin verilmesi, iskemi-reperfüzyona bağlı

azalmayı önlemiş ve iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunda PGE₂ miktarı sham opere gruptan farksız bulunmuştur (48.73 ± 3.94 pM/g doku, şekil 7).



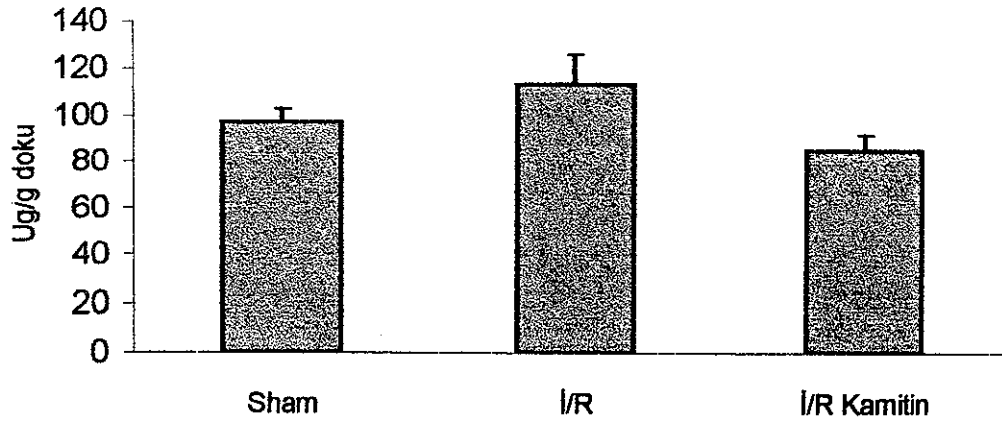
Şekil 7: Mide mukozasının PGE₂ düzeyleri

***p<0.001 Sham opere grup ile iskemi-reperfüzyon grubunun karşılaştırılması

+++p<0.001 İskemi-referfüzyon grubu ile iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunun karşılaştırılması

3. Mukus miktarı:

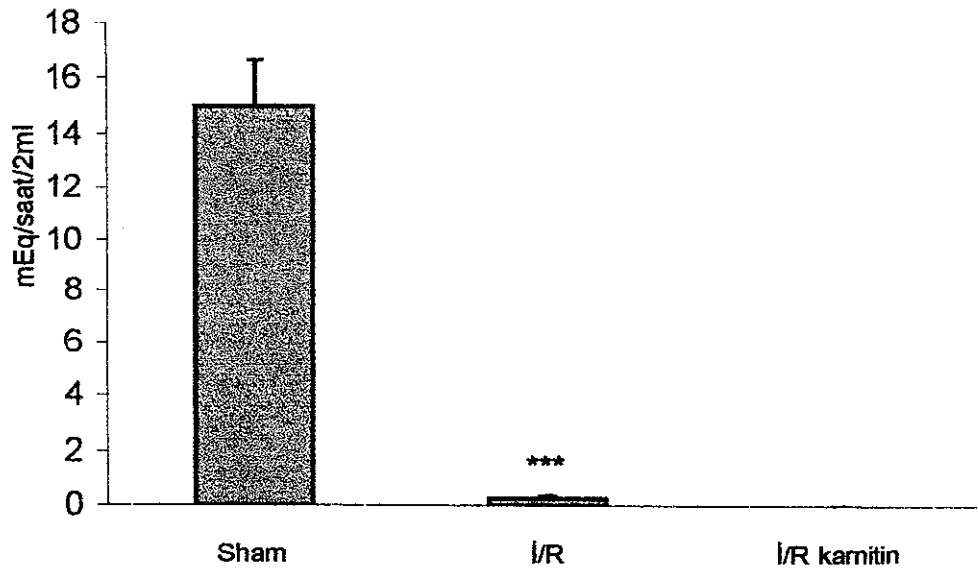
Asidik mukopolisakkaridlerin boyanması üzerinden hesaplanan mukus miktarı, sham opere grupta 97.00±5.9 µg/g doku, iskemi-reperfüzyon grubunda 113.54±12.43 µg/g doku, iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunda ise 85.06±7.04 µg/g doku olup, gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır (şekil 8).



Şekil 8: Mide mukozasının mukus düzeyleri

4. Mide asit sekresyonu:

Sıçanların midelerinden 30 dakika içinde salgılanan asit miktarı sham opere grupta 15.00 ± 1.64 mEq/saat/2ml olarak bulunmuştur. İskemi-reperfüzyon uygulamasına bağlı olarak mide salgısındaki asit miktarının 0.24 ± 0.11 mEq /saat/2ml'ye düştüğü gözlenmiş ($p < 0.001$), buna ilave olarak karnitin verilmesi ise iskemi-reperfüzyona bağlı olarak azalan asit miktarını değiştirmemiştir (Şekil 9).

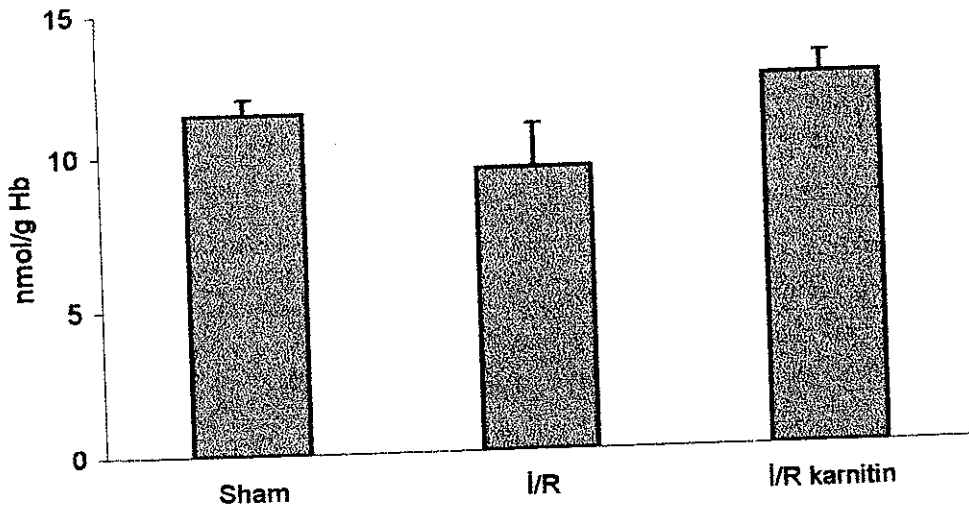


Şekil 9: Mide asit salgısı

*** $p < 0.001$ Sham opere grup ile iskemi-reperfüzyon grubunun karşılaştırılması

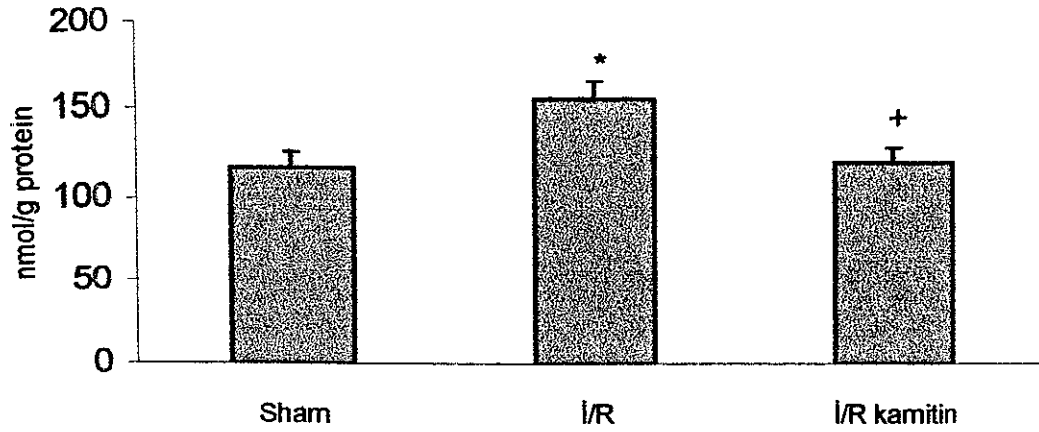
5. TBARS düzeyleri:

5.1. Eritrosit TBARS düzeyleri: Sham opere grupta 11.42 ± 0.54 nmol/g Hb olarak belirlenen eritrosit TBARS düzeyi, iskemi-reperfüzyon (9.39 ± 1.53 nmol/g Hb) ve iskemi-reperfüzyon/karnitin grubundan (12.45 ± 0.73 nmol/g Hb) farklı bulunmamıştır (Şekil 10).



Şekil 10: Eritrosit TBARS düzeyleri

5.2. Doku TBARS düzeyleri: Mide dokusuna ait TBARS miktarı sham opere grupta 116.47 ± 9.17 nmol/g protein iken, iskemi-reperfüzyon uygulamasına bağlı olarak belirgin artış tespit edilmiştir (154.45 ± 10.79 nmol/g protein, $p < 0.05$). Karnitin, iskemi-reperfüzyona bağlı TBARS miktarındaki artışı önlemiş ($p < 0.05$) ve bu grubun mide dokusundaki TBARS miktarı sham opere gruptan farksız bulunmuştur (120.06 ± 8.55 nmol/g protein) (Şekil 11).



Şekil 11: Mide dokusu TBARS düzeyleri

* $p < 0.05$ Sham opere grup ile iskemi-reperfüzyon grubunun karşılaştırılması

+ $p < 0.05$ İskemi-reperfüzyon grubu ile iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunun karşılaştırılması

6. Antioksidan enzim düzeyleri:

6.1. Eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri

6.1.1. Eritrosit katalaz aktivitesi: Tablo 1'de görüldüğü gibi iskemi-reperfüzyon eritrosit katalaz aktivitesinde belirgin yükselmeye neden olmuştur ($p < 0.001$). İskemi-reperfüzyon öncesinde karnitin uygulanması ile katalaz aktivitesindeki artış, tek başına iskemi-reperfüzyon uygulamasındaki katalaz aktivitesindeki artışı kısmen önlemiştir ($p < 0.001$).

6.1.2. Eritrosit SOD aktivitesi: Tablo 1'de görüldüğü gibi SOD aktivitesi iskemi-reperfüzyondan sonra belirgin artmış ($p < 0.05$), karnitin uygulanması iskemi-reperfüzyona bağlı artışa etki etmemiştir.

6.1.3. Eritrosit GPx aktivitesi: Tablo 1'de görüldüğü gibi iskemi-reperfüzyon GPx aktivitesinde herhangi bir değişiklik yapmazken, iskemi-reperfüzyondan önce karnitin verilmesi GPx aktivitesinde belirgin düşüğe yol açmıştır ($p < 0.001$).

Tablo 1- Eritrosit SOD, katalaz ve GPx değerleri (Ort ± SH)

	Sham opere	İskemi-reperfüzyon	İskemi-reperfüzyon/karnitin
Katalaz (k/g Hb)	8.56 ± 0.49	24.39 ± 1.62 ***	16.79 ± 0.94***
SOD (U/g Hb)	4.65 ± 0.36	7.1 ± 0.77 *	7.03 ± 0.67
GPx (U/g Hb)	9.03 ± 0.49	10.51 ± 0.92	3.36 ± 0.65***

*p<0.05 ve ***p<0.001 sham opere grup ile iskemi-reperfüzyon grubunun karşılaştırılması

+++p<0.001 iskemi-reperfüzyon grubu ile iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunun karşılaştırılması

6.2. Doku antioksidan enzim aktiviteleri:

6.2.1. Doku katalaz aktivitesi: Tablo 2'de görüldüğü gibi iskemi-reperfüzyon mide dokusundaki katalaz aktivitesini belirgin azaltmıştır (p<0.001). iskemi-reperfüzyondan önce karnitin uygulanması iskemi-reperfüzyona bağlı düşüşü tamamen önlemiştir (p<0.001).

6.2.2. Doku SOD aktivitesi: Tablo 2'de görüldüğü gibi iskemi-reperfüzyon SOD aktivitesini azaltmış (p<0.001), karnitinin, iskemi-reperfüzyona bağlı azalışa ilave bir etki göstermemiştir.

6.2.3. Doku GPx aktivitesi: Tablo 2'de görüldüğü gibi iskemi-reperfüzyon ve iskemi-reperfüzyondan önce karnitin verilmesi enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmamıştır.

Tablo 2- Mide dokusuna ait SOD, katalaz ve GPx değerleri (Ort±SH)

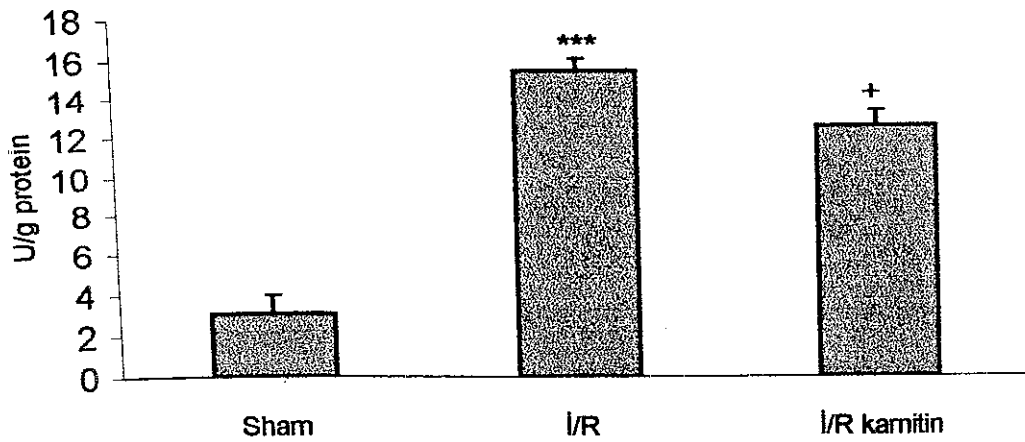
	Sham opere	İskemi-reperfüzyon	İskemi-reperfüzyon /karnitin
Katalaz (k/g protein)	25.37±2.86	9.31 ± 0.29 ***	28.07 ± 1.21 ***
SOD (U/g protein)	16.44 ±2.18	8.12 ± 0.23 ***	5.12 ± 0.33
GPx (U/g protein)	13590.71 ± 1104.6	13692 ± 811.2	29137.7 ± 9873.2

***p<0.001 Sham opere grup ile iskemi-reperfüzyon grubunun karşılaştırılması

+++p<0.001 İskemi-reperfüzyon grubu ile iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunun karşılaştırılması

7. Doku MPO aktivitesi:

Sham opere grupta 3.01 ± 0.88 U/g protein olarak belirlenen mide dokusundaki nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan MPO aktivitesi, iskemi-reperfüzyon sonucunda 15.41 ± 0.65 U/g proteine yükselmiştir ($p < 0.001$). Karnitin, MPO aktivitesinde iskemi-reperfüzyona bağlı artışı kısmen önleyerek, aktivitenin 12.55 ± 0.81 U/g protein düzeyine düşmesini sağlamıştır ($p < 0.05$) (şekil 12).



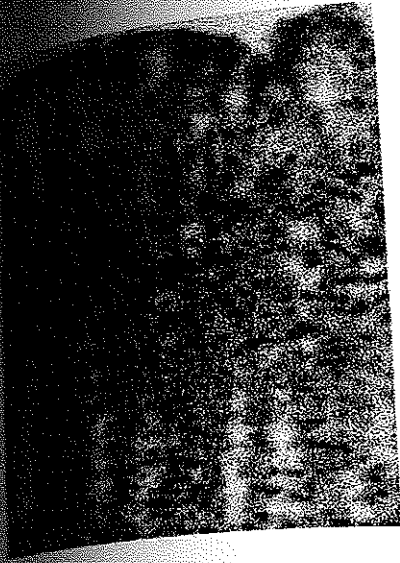
Şekil 12: Mide dokusunda MPO aktivitesi

***p<0.001 Sham opere grup ile iskemi-reperfüzyon grubunun karşılaştırılması

+p<0.05 İskemi-reperfüzyon grubu ile iskemi-reperfüzyon/karnitin grubunun karşılaştırılması

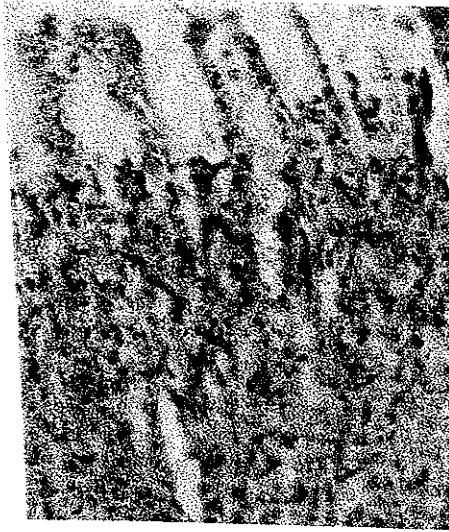
8. Histolojik inceleme:

Yapılan histolojik inceleme sonucunda kontrol grubunda, midenin mukoza yüzeyi pit yapılarını oluşturmak üzere invagine olan tek katlı epitel tabakasıyla kaplı olarak görülmüştür. Yüzey muköz hücreleri, pit duvarını ve serbest mukozal yüzeyi kaplamıştır. Pit yapısında, bezin proksimaline doğru sıra ile istmus, boyun ve baz bölgeleri izlenmiştir (şekil 13 kontrol A-B). İskemi-reperfüzyon grubunda, inflamasyon, hücresel nekrosis ve distrofi yanı sıra vasküler hasar belirlenmiştir. Yüzey mukus örtüsü yıkıma uğramıştır. Mukozada yaygın hemoraji, bezlerin üst yarımında ve pit yapılarında belirgin olmak üzere epitelyal hücre yıkımı tespit edilmiştir. Bezler ve çevresindeki kapillerler ileri düzeyde hasarlanmıştır. Mukozanın derinlerinde ve lamina propriada pek çok lökosit infiltrasyonu gözlenmiştir (şekil 13 I/R A-B). İskemi-reperfüzyon öncesi karnitin uygulanan grupta, mukozal erozyonların azaldığı tespit edilmiştir. Mukozanın üst yarımında azda olsa bez lümenlerinde gerginlik ve lamina propriada orta düzeyde lenfosit infiltrasyonu saptanmıştır. Karnitinin, iskemi-reperfüzyonla indüklenen total erozyon alanını büyük oranda inhibe ettiği görülmüştür. Hemoraji ve epitelyal hücre nekrozisi yokken, mukosubstans miktarı kontrol grubuna benzer olup, oksintik bezler çevresindeki kapillerler normal olarak izlenmiştir (şekil 13 I/R karnitin A-B)



Kontrol

(A)



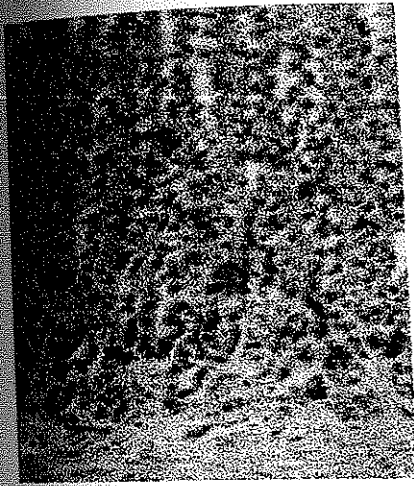
I/R

(A)



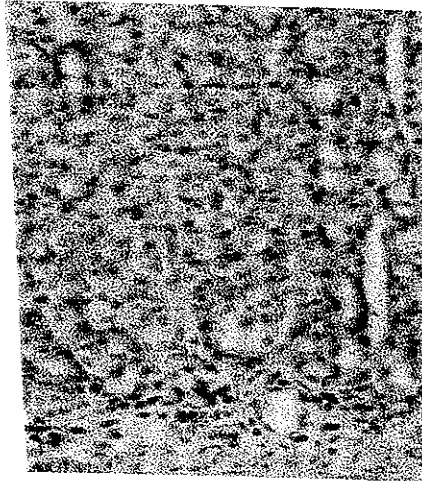
I/R-Karnitin

(A)



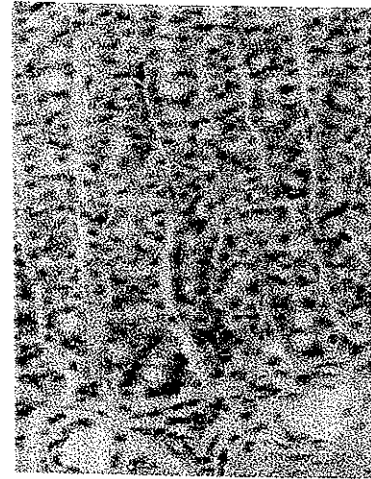
Kontrol

(B)



I/R

(B)



I/R-Karnitin

(B)

Şekil 13: Mide mukozasının yüzeysel (A) ve derin (B) katmanlarına ait ışık mikroskopisi ile görünümü. Mikroskopik büyütme x20.

TARTIŞMA

Serbest oksijen radikalleri ve bu radikallere bağlı lipid peroksidasyonunun mide iskemi-reperfüzyon hasarının patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (1-5). Antioksidanların, çeşitli dokularda iskemi reperfüzyona bağlı serbest oksijen radikallerinin oluşumunu inhibe ederek veya serbest radikalleri süpürerek doku hasarını azalttıkları tespit edilmiştir (2-4,25,26). Karnitin de ksantin oksidazı inhibe ederek reaktif oksijen metabolitlerinin sentezini azalttığı, serbest radikal süpürücü etkisi olduğu ve demir ile şelasyon yaparak hidroksil radikalının oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (27-31). Karnitin bilinen bu etkilerinden yola çıkan araştırmacılar 100 mg/kg L-karnitini ventrikül iskemisinden 5 dakika önce intravenöz bolus tarzında uygulayarak, L-karnitin doku hasarına karşı koruyucu etkisini saptamışlardır (127). Bizim çalışmamızda da mide iskemi-reperfüzyon hasarına karşı akut koruyucu etkisi olabileceği düşünülerek, L-karnitin iskemiden 5 dakika önce 100 mg/kg intravenöz bolus tarzında uygulanmış ve bu dozda uygulanan L-karnitin iskemi-reperfüzyon sırasında mide mukozasında oluşan lezyonları belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir. Bu bulgumuz, çeşitli antioksidan maddelerin kullanımı ile mide hasarının engellendiğini gösteren çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (2,24,42,43,64).

Çalışmamızda, iskemi-reperfüzyona bağlı olarak sıçan mide mukozasında yaygın hemoraji ve ileri düzeyde epitelyal hücre yıkımı saptanmıştır. Mukozal lezyonların hemen çoğunun korpusta özellikle de hücrelerin çoğunlukta olduğu oksintik bezlerin üst yarımında görülmesi Kitano ve arkadaşlarının (43) pariyetal hücrelerin hasarlanmasıyla ilgili hipotezleriyle uyumlu bulunmuştur. İskemi-reperfüzyonun oluşturduğu gastrik yaralanmalarda reaktif oksijen türlerinin ve lipid peroksidasyonunun rolünü göstermek amacıyla yapılan araştırmalarda, antioksidanların iskemi-reperfüzyon sırasında oluşan lipid peroksidasyonunu inhibe

ederek membran hasarına karşı koruyucu oldukları gösterilmiştir (42,43) Işık mikroskopik bulgularımız, iskemi-reperfüzyonun neden olduğu mide lezyonlarının L-karnitin tedavisi ile azaldığını göstermiştir. Bu sonuç, ortamdaki süperoksit radikallerinin antioksidanlarla uzaklaştırıldığını ve bu yolla gastrik mukozal hasarın azaldığını bildiren çalışmalara paraleldir (24). Çalışmamızda midedeki iskemi-reperfüzyon hasarının L-karnitin tedavisi ile tamamen ortadan kaldırılamadığı gözlenmiştir. Bunun nedeni Andrews ve arkadaşları tarafından açıklandığı gibi iskemi-reperfüzyona bağlı mukozal hasarın 1/3'lik kısmının iskemi sırasında oluşması ve antioksidan tedavisi ile önlenememesidir (63). Hasarın 2/3'lik kısmı ise reperfüzyon sırasında oluşur ve serbest radikalleri bloke eden ajanlarla düzeltilebilir (63).

İskemi-reperfüzyon hasarının ortaya çıkmasında en önemli etken reperfüzyon sırasında doku oksijenlenmesi ile birlikte görülen serbest oksijen radikalleridir. Bunun yanı sıra iskemi sırasında azalan kan akımı da H^+ iyonunun ortamdaki uzaklaştırılmamasına neden olur ve hücrelerin H^+ ile direkt teması, mukozal hasarın oluşumuna katkıda bulunur (11,63,64). Mukozal kan akımı, midede zararlı etkenlere karşı mukozanın korunmasını sağlayan bariyerin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Mide mukozal bariyerinin diğer bir önemli bileşeni olan mukus tabakası, mide salgıları ile mukoza arasında fiziksel bir koruyucu niteliğindedir. Protein, lipid, nükleik asit ve glikoprotein yapısında olan musin içeren mukus tabakası, yapısındaki HCO_3^- iyonları ile de yüzeye yakın H^+ iyonlarının nötralizasyonunu sağlar. Gerek mukus gerekse bikarbonat iyonlarının salgılanması PGE_2 ile de düzenlenmektedir. PGE_2 mide mukozasında kapiller endotel hücrelerinden salgılanmaktadır. PGE_2 bir yandan mukozal kan akımını artırırken, diğer taraftan mukus ve bikarbonat salgısını da etkileyerek mukozal korumada

anahtar rol oynar (83,97,98). Bu nedenle PGE₂ düzeyinde meydana gelecek değişikliğin, mukus miktarını da değiştirmesi beklenir. Çalışmamızda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak mukozal PGE₂ miktarının azaldığı, L-karnitin verilmesi ile iskemi-reperfüzyonun bu etkisinin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu bulgularımız Brozozowski ve arkadaşlarının mide iskemi-reperfüzyon modelinde, Myers ve arkadaşlarının renal iskemi-reperfüzyon modelinde yaptıkları çalışmaların bulgularına paraleldir (128,129). Çeşitli nedenlerle mide mukozasında oluşan reaktif oksijen türleri, PGH sentez aktivasyonu için gerekli hidroperoksitlerin önemli kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenle mide mukozasında iskemi-reperfüzyona bağlı olarak PGE₂ miktarının artması beklenirken, azalmış olması, diğer araştırmacıların da belirttiği gibi, oksidan hasarın neden olduğu endotel disfonksiyonuna bağlanabilir.

Mukus hem fiziksel, hem de iskemi-reperfüzyonda oluşan reaktif oksijen metabolitlerini süpürücü etkisi nedeniyle mukozal korunmaya katkıda bulunur (83,89,96,98). Mukus salgılanmasına etki eden çeşitli faktörler vardır. Yapılan çalışmalarda hipoksantin varlığında ksantin oksidaz aktivasyonundaki artışın doz bağımlı olarak mukus salgılanmasında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle H₂O₂ ve OH⁻ine maruz bırakılmış mukoza hücrelerinde mukus salgısının bir saatten önce stimüle olmadığı gösterilmiştir (89,98). Serbest oksijen radikallerinin reperfüzyon sırasında oluştuğunu düşünürsek, çalışmamızda gruplar arasında mukus düzeyleri açısından farklılık olmaması, üstteki çalışmanın yanısıra Kawai ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemektedir (96). Kawai ve arkadaşları mide iskemi-reperfüzyonu sırasında mukus miktarının süreye bağlı olduğunu ifade ederek ve 30 dakika iskemi, 60 dakika reperfüzyon sürecinin mukus miktarındaki değişiklik için yeterli olmadığını ve bu nedenle kontrol grubundan farksız olduğunu tespit

olmuşlardır (96). Çalışmamızda L-karnitin tedavisinin mukus salınımına ilave bir etkisi olmamıştır.

Mide mukozasının hasarlandığı durumlarda, luminal asitin geri difüze olduğu ve luminal asiditenin azaldığı pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (84,95, 130). Bizim sonuçlarımızda bu araştırmacıları destekler niteliktedir. Kitano ve arkadaşları iskemi-reperfüzyona bağlı olarak mide sıvısındaki asit miktarının azalmasının nedenini, oluşan oksijen radikallerinin mukozanın asit permeabilitesini değiştirmesine bağlayarak, asit difüzyonunun arttığını ileri sürmüşlerdir (43,131). L-karnitin tedavili grupta ise değişiklik saptamamış olmamızın nedeni, mukozada az da olsa hasarlı bölgelerin mevcudiyeti ve PGE₂ miktarındaki artışa bağlı HCO₃ iyonlarının yaptığı nötralizasyon olabilir.

İskemi-reperfüzyonun midede meydana getirdiği hasarda reaktif oksijen ürünlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (42,43). Lipid peroksidasyonun en iyi göstergesi pek çok çalışmada yaygın olarak kullanılmakta olan TBARS düzeyidir. İskemi-reperfüzyona bağlı olarak mide dokusunun TBARS düzeyinde saptadığımız artış, aynı modelde çalışan birçok araştırmacının elde ettiği bulguları destekler niteliktedir (1,23,24,42,43). Çalışmamızda L-karnitin uygulaması ile, mide dokusunun TBARS miktarındaki artış engellenerek, kontrol düzeyinde kalması sağlanmıştır. Bu sonuç L-karnitin lipit peroksidasyonunu engellediğinin bir göstergesidir. Yağ asitlerinin mitokondri membranından transferi için esansiyel bir kofaktör olan L-karnitin, hücre membranının yapısını etkileyerek, iskeminin neden olduğu membran permeabilite değişikliklerini önlediği gösterilmiştir (31,132). Bunun yanısıra L-karnitin ksantin oksidazı inhibe ederek, süperoksit radikalının oluşumunu ve demir ile şelasyon yaparak Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalının üretimini baskılamaktadır. Bu

nedenle L-karnitinin kalpte iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkili olup, myokardial hücrelerde lipid peroksidasyonunu ve proteinlerin oksidatif modifikasyonunu önlediği birçok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (28,29,31,36,37,130,133). Eritrosit TBARS düzeyinde ise iskemi-reperfüzyona bağlı olarak herhangi bir değişiklik saptayamamış olmamız Beard ve arkadaşlarının sonuçlarını desteklemektedir (134). Bu sonuç, iskemi-reperfüzyonda tespit ettiğimiz antioksidan enzim aktiviteleri ile de uyumludur. Çalışmamızda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak kan TBARS düzeyinde artış olmaması, Beard ve arkadaşlarının da belirttiği gibi, bu durumda aktiviteleri artan eritrosit SOD ve katalazın serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı koruyucu özelliklerine bağlanabilir.

İskemi-reperfüzyona bağlı olarak mide dokusunda artan TBARS miktarının ise doku SOD ve katalaz aktivitelerindeki azalışla birlikte olduğu tespit edilmiştir. SOD ve katalazın antioksidan etkileri gözönüne alındığında bu enzimlerin aktivitelerindeki azalışa, TBARS düzeyindeki artışın eşlik etmesi en doğal beklenti olmalıdır.

Yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyon sırasında mide dokusunun antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklik olduğu tespit edilmiş olup, elde edilen bulgular çelişkilidir (3,135-139). Nishida ve arkadaşları suya batırma stresinin neden olduğu akut gastrik mukozal lezyonlara, ksantin oksidaz sisteminin aktivasyonuna bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin neden olduğunu bildirmişler ve antioksidan enzim düzeylerine baktıklarında, doku katalaz aktivitesinde anlamlı değişiklik tespit etmemişlerdir (3). Kaçmaz ve arkadaşları intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde doku katalaz aktivitesinin arttığını göstermişlerdir (135). İskemi-reperfüzyon hasarında katalaz aktivitesinin azaldığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (136-139). Çalışmamızda da iskemi-reperfüzyona bağlı olarak doku katalaz aktivitesinin azaldığı, eritrosit katalaz aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Karnitin tedavisi ile doku

Katalaz aktivitesinin artarak kontrol değerlerine çıktığı, eritrosit katalaz aktivitesinin azaldığı tespit edilmiş, ancak Kızıltunç ve arkadaşlarının (140) belirttiği gibi karnitin katalaz aktivitesi üzerine etkisini gösteren herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

Doku SOD aktivitesi iskemi-reperfüzyon hasarında azalmış olup bulgularımız bu konuda yapılan çalışmaları desteklemektedir (41,135,141,142). Bray ve arkadaşları tarafından SOD aktivitesindeki azalmanın nedeni katalaz aktivitesinin inhibisyonuna bağlanmıştır (143). Katalaz aktivitesinin azalması dokuda H_2O_2 birikimine yol açmakta ve biriken H_2O_2 'in ise Cu/Zn-SOD aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (143). Gürlek ve arkadaşları (144) iskemik kardiomyopatide, Akçıl ve arkadaşları (136) iskemi-reperfüzyonda eritrosit SOD aktivitesini artmış bulmuşlardır. Lafont ve arkadaşları ise myokard enfarktüsünde eritrosit SOD aktivitesini değişmediğini bildirmişlerdir (145). Çalışmamızda Gürlek ve arkadaşlarının bulgularına benzer şekilde iskemi-reperfüzyon ile eritrosit SOD aktivitesinin arttığı gözlenmiş, karnitin tedavisinin eritrosit ve doku SOD aktivitesinde iskemi-reperfüzyona ilave bir etkisi olmamıştır.

Doku GPx aktivitesinin iskemi-reperfüzyon sırasında azaldığını bildiren literatür bulgularına (24,41,72,135,143) karşın, çalışmamızda Nishida ve arkadaşları (3), Lafont ve ark.'larını (145) destekler nitelikte iskemi-reperfüzyonda doku ve eritrosit GPx aktivitesinin değişmediği saptanmıştır. L-karnitin tedavisi, Ferrari ve arkadaşlarının (30) bulgularına uyumlu olarak, doku GPx aktivitesini değiştirmemiş, eritrosit GPx aktivitesini azaltmıştır.

Yapılan çalışmalarda nötrofillerin iskemi-reperfüzyona bağlı tahribatta etkin rol oynadığı gösterilmiştir. De La Lastra ve ark. ve diğer araştırmacılar postiskemik dokuda reaktif oksijen türlerinin diğer bir kaynağının da nötrofiller olduğunu

göstermiştir (3,24,40,41). Nötrofiller kapsadıkları NADPH oksidaz enziminin etkisiyle moleküler oksijeni süperoksit anyon radikaline dönüştürerek, bu metabolitleri hem fagozom içine hem de buldukları ortama salgırlar. Aktive nötrofiller reaktif oksijen radikallerinin yanısıra çeşitli sitotoksik proteinler (proteazlar, laktoferrin vs.) ve miyeloperoksidaz enzimi salgırlar. Miyeloperoksidaz nötrofillere özgü bir enzim olup, H₂O₂ ve Cl iyonları ve N-chloroaminlerden hipokloröz asit gibi güçlü sitotoksik oksidanların yapımını katalize eder. İskemi-reperfüzyon modellerinin kullanıldığı birçok çalışmada, iskemi-reperfüzyon yapılan dokuda nötrofil infiltrasyonunun ve MPO aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (146). Bizim çalışmamızda da iskemi-reperfüzyon sonrası midede MPO aktivitesinin arttığı ve buna paralel olarak histolojik incelemede nötrofil infiltrasyonu tespit edilmiştir. Reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen türleri, nötrofiller için kemotaktik faktörlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Allopurinol, SOD gibi antioksidanlarla tedavi sonucunda, iskemi-reperfüzyona bağlı nötrofil infiltrasyonunun ve bununla ilişkili mide hasarının azaldığı gösterilmiştir (3,25,26). Biz de antioksidan etkili olduğu ileri sürülen L-karnitini kullandığımız çalışmamızda iskemi-reperfüzyona bağlı nötrofil infiltrasyonunun azaldığını, MPO aktivitesindeki azalışla göstermiş olduk. Aynı zamanda histolojik incelemede de buna paralel bulgular elde edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız, L-karnitinin, iskemi-reperfüzyonun serbest oksijen radikalleri aracılığı ile mide dokusunda oluşturduğu hasarı azaltabildiğini göstermiştir. L-karnitinin mide lezyonlarının oluşumunu azaltıcı etkisi nötrofil infiltrasyonunu engelleyici etkisine ve antioksidan özelliğine bağlıdır. L-karnitinin mide dokusunda bulunan antioksidan enzimler üzerine etkisi farklı olup, mide dokusunda SOD ve GPx aktivitelerini değiştirmeyip, katalaz aktivitesini

arttırmaktadır. L-karnitinin katalaz aktivitesini artırıcı etkisi, iskemi-reperfüzyon hasarına karşı antioksidan özelliğine katkıda bulunuyor olabilir.

ÖZET

İskemi-reperfüzyon kalp ve beyin başta olmak üzere organizmadaki birçok organ ve sistemde hasara neden olmakta, oluşan bu hasardan reaktif oksijen ürünleri sorumlu tutulmaktadır.

İskemi-reperfüzyonun midede de hemorajik lezyonlara yol açtığı gösterilmiştir. Antioksidan özellikleri bilinen L-karnitinin iskemi-reperfüzyona bağlı mide hasarında koruyucu etkisinin olup olmadığını ortaya koymak amacıyla planlanan çalışmamızda, sıçanlar kontrol grubu, sham opere grup, iskemi-reperfüzyon grubu, iskemi-reperfüzyon ve karnitin tedavisi uygulanan grup olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. İskemi-reperfüzyon uygulanan sıçanlarda çöliak artere 30 dakika süreyle klemp konularak iskemi oluşturulmuş, klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon sağlanmıştır. L-karnitin uygulanan sıçanlara ise iskemiden 5 dakika önce 100 mg/kg dozda L-karnitin intravenöz bolus tarzında verilmiştir. Cerrahi sonrası kan ve doku örneklerinde TBARS ve antioksidan enzim düzeylerine bakılmış, ek olarak dokuda PGE₂, mukus ve histolojik değişiklikler incelenmiştir.

Sham opere grupla karşılaştırıldığında İskemi-reperfüzyon grubunda mide lezyon indeksinde ve nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz aktivitesinde artış gözlenmiş, L-karnitin tedavisi ile bu artışlarda belirgin azalma tespit edilmiştir. Mide mukozal bariyerinin bir bileşeni olan mukus miktarı açısından gruplar arasında önemli fark bulunmamıştır. PGE₂ miktarının ise iskemi-reperfüzyon grubunda azalırken, L-karnitin tedavisi ile kontrol düzeylerine çıktığı saptanmıştır.

Lipid peroksidasyon indeksi olarak kullanılan TBARS düzeylerine bakıldığında, kan TBARS açısından gruplar arasında önemli bir fark olmadığı halde, doku TBARS'inin iskemi-reperfüzyonda arttığı, L-karnitin tedavisi ile azaldığı bulunmuştur. İskemi-reperfüzyon grubu ile sham opere grup karşılaştırıldığında , iskemi-

reperfüzyon sonrası kan katalaz ve SOD aktivitesinin arttığı, GPx aktivitesinin azaldığı, L-karnitin uygulaması ile kan katalaz ve GPx aktivitesinin azaldığı, kan katalaz ve SOD aktivitesinin iskemi-reperfüzyon grubundakinden farklı olmadığı tespit edilmiştir. Iskemi-reperfüzyon grubunda doku SOD ve katalaz aktivitesi azalırken, GPx aktivitesi artmış olup, L-karnitin uygulaması sonrasında katalaz aktivitesi iskemi-reperfüzyon grubuna göre artmış olduğu halde, SOD ve GPx aktiviteleri iskemi-reperfüzyon grubuna göre farksız bulunmuştur.

Sonuçlarımız, L-karnitin dokuya nötrofil infiltrasyonunu engelleyerek ve intokaldan etki göstererek, iskemi-reperfüzyona bağlı mide hasarına karşı belirgin koruma sağladığını göstermektedir.

SUMMARY

Ischemia-reperfusion produces tissue damage in the heart, brain, stomach etc. The association of oxygen-derived free radicals with ischemia-reperfusion injury has been well documented in many studies. This study was designed to investigate the effects of L-carnitine which is known to have antioxidant roles in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion.

Rats were randomly divided into four groups as control, sham-operated, ischemia-reperfusion and ischemia-reperfusion plus L-carnitine treatment groups. Ischemia was induced by clamping the celiac artery for 30 min with a small clip. Sixty minutes after reperfusion, the lesion index, PGE₂ and mucus content, TBARS and antioxidant enzyme levels were measured in blood and gastric tissue. L-carnitine (100 mg/kg) administered intravenously 5 min before ischemia significantly reduced the lesion index and myeloperoxidase activity compared with ischemia-reperfusion group. L-carnitine also inhibited the increase in TBARS level induced by ischemia-reperfusion in the gastric tissue. Gastric prostaglandin E₂ contents decreased in ischemia-reperfusion group and L-carnitine prevented the decrease in PGE₂ level. A significant difference in gastric mucus contents between all groups was not observed. Compared with sham-operated, blood catalase and SOD activity increased and GPx activity was not different after ischemia-reperfusion. L-carnitine decreased the blood GPx and catalase activity and did not change blood and tissue SOD activity compared with ischemia-reperfusion group. SOD and catalase activity in gastric mucosa were diminished after ischemia-reperfusion and SOD activity was found unchanged by treatment with L-carnitine in gastric mucosa whereas catalase activity increased to that of control group.

The results suggest that L-carnitine provides a marked protection against ischemia-reperfusion gastric injury which could be due to antioxidant effect of L-carnitine and its ability to reduce neutrophil induced toxicity.

KAYNAKLAR

- 1) Ueda S., Yoshikawa T., Takahashi S., Ichikawa H., Yasuda M., Oyamada H., Tanigawa T., Sugino S., Kondo M.: Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand J Gastroenterol* 24 (suppl 162): 55-58, 1989.
- 2) Stein H.J., Hinder R.A., Oosthvizen M.M.J.: Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery* 108: 467-74, 1990.
- 3) Nishida K., Ohta Y., Kobayashi T., Ishiguro I.: Involvement of the xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *Digestion* 58: 340-351, 1997.
- 4) Yoshikawa T., Naito Y., Ueda S., Oyamada H., Takemura T., Yoshida N., Sugido S., Kondo M.: Role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. *J Clin Gastroenterol* 12 (1): 565-571, 1990.
- 5) Wada K., Kamisaki Y., Ohkura T., Kanda G., Nakamoto K., Kishimoto Y., Ashida K. I., Itoh T.: Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol* 274 (37): G465-471, 1998.
- 6) Kusterer K., Pihan G., Szabo S.: Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH or ischemia. *Am J Physiol* 252 (15): G811-G816, 1987.
- 7) Wadhura S., Perry M.A.: Gastric injury induced by hemorrhage, local ischemia and oxygen radical generation. *Am J Physiol* 253 (16): G129-133, 1987.
- 8) Hassan M., Kashimura H., Matsumaru K., Nakahara A., Iwata R., Hayashi T., Muto H., Tanaka N., Gato K., Fukutomi H.: Gastric mucosal injury induced by local

ischemia-reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical.
Diges Dis Sci 42(7): 1375-1380, 1997.

9) Toyokuni S.: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* (49): 91-102, 1999.

10) Kawamoto S., Tashino S., Miyavchi Y., Inove M.: Changes in circulatory status and transport function of the liver induced by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 268 (31): G47-G53, 1995.

11) Perry M.A. & Wadhwa S.S.: Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 254 (17): G366-G374, 1988.

12) Konturek P. CH., Konturek S.J., Brozozowski T., Dembinski A., Zembala M.: Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-Tryptophan, against stress-induced and ischemia-induced lesions is mediated by scavenging of oxygen radicals. *Scand J Gastroenterol* 323: 433-438, 1997.

13) Schoenberg M.H., Beger H.G.: Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 21(9): 1376-86, 1993.

14) Kurokawa T., Takagi H.: Mechanism and prevention of ischemia – reperfusion injury. *Transplant Proc* 31: 1775-6, 1999.

15) Nilsson UA., Lundgren O., Haglund E.: ESR- Measurement of radical production during in vivo intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Am J Physiol* 257: G409-G414, 1989.

16) Hayashi N., Tsujii M., Itoh T., Sakura H., Tsuji S., Tanimaru H., Ogihara T., Yoshiha H., Kawano S., Sato N., Kamada T.: Changes in the intracellular calcium ion concentration in the gastric mucosa in a rat ischemia-reperfusion model. *Scand J Gastroenterol* 24(suppl 162): 43-46, 1989.

17) Carden D.L., Granger D.N.: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury.

J Pathol 190: 255-66, 2000.

18) Sussman MSN., Bulkley GB.: Oxygen derived free radicals in reperfusion injury. *Methods in enzymology* Vol.186, Part B. Ed. By Packer L., Glazer A.N. Academic press New York Tokyo Toronto Boston pp:711-723, 1990.

19) Ferrari R., Ceconi C., Curello S., Cargnoni A., Pasini E., De Giuli F., Albertini A.: Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 53: 215S-22S, 1991.

20) Smith S.M., Holm-Rutili L., Perry M.A., Grisham M.B., Arfors K.E., Granger D.N., Kvietys P.R.: Role of neutrophils in hemorrhagic shock induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology*. 93: 466-71, 1987.

21) Andrews F.J., Malcontenti Wilson C., O'Brien P.E.: Polymorphonuclear leukocyte infiltration into gastric mucosa after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 266(29): G48-G54, 1994.

22) Perry M.A., Wadhwa S., Parks D.A., Pickard W., Granger D.N.: Role of oxygen radicals in ischemia induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology* 90: 362-7, 1986.

23) Yashikawa T., Naito Y., Ueda S., Takahashi S., Oyamada H., Yoneta T., Sugino S., Kondo M.: Ischemia-reperfusion injury and free radical involvement in gastric mucosal disorders. *Adv Exp Med Biol* 264: 401-10, 1990

24) De La Lastra CA., Cabeza J., Motilva V., Martin MJ.: Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pineal Res* 23: 47-52, 1997

25) Wadhwa S.S., Perry M.A.: Gastric mucosal injury induced by hemorrhage local ischemia and oxygen radical generation. *Am J Physiol* 253(16): G129-G133, 1987.

26) Ogino K., Oka S., Okazaki Y., Takemoto T.: Gastric mucosal protection and superoxide dismutase *J Clin Gastroenterol* 10 (suppl-1) : 129-132, 1988.

- 27) Geremia E., Santoro C., Baratta D., Scalia M and Sichel G.: Antioxidant action of acetyl L-carnitine: In vitro study. *Med Sci Res* 16: 125-29, 1988
- 28) Di Giacomo C., Latteri F., Fichera C., Sorrenti V., Campisi A., Castorina C., Russo A., Pinturo R., Vanella A.: Effect of acetyl-L-carnitine on lipid peroxidation and xanthine oxidase activity in rat skeletal muscle. *Neurochem Res* 18(11): 1157-1162, 1993.
- 29) Reznick AZ., Kagan VE., Ramsey R., Tsuchiya M., Khwaja S., Serbinova EA., Packer L.: Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. *Arch Biochem and Biophys* 296(2): 394-401, 1992.
- 30) Ferrari R., Ceconi C., Curello S., Pasini E., Visioli O.: Protective effect of propionyl-L-carnitine against ischaemia and reperfusion damage. *Mol Cell Biochem* 88: 161-168, 1989.
- 31) Hülsmann W.C., Dobelaar M.L., Lamers J.M.J., Maccari F.: Protection by acyl-carnitines and phenylmethylsulfonyl fluoride of rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 847: 62-66, 1985.
- 32) Pavker L., Valenza M., Serbinova E., Starke-Reed P., Frost K., Kagan V.: Free radical scavenging is involved in the protective effect of L-propionyl-carnitine against ischemia-reperfusion injury of the heart. *Arch Biochem Biophys* 288(2): 533-537, 1991.
- 33) Paulson D.J., Shug A.L., Zhao J.: Protection of the ischemic diabetic heart by L-propionyl-carnitine therapy. *Mol Cell Biochem* 116: 131-137, 1992
- 34) Ronca G., Ronca F., Yu G., Zucchi R., Bertelli A.: Protection of isolated perfused working rat heart from oxidative stress by exogenous L-propionyl carnitine. *Drugs Exptl Clin Res* XVIII (11/12): 475-480, 1992.

- 35) Fritz I.B., Arrigoni-Martelli E.: Sites of action of carnitine and its derivatives on the cardiovascular system : interactions with membranes. *TIPS*-october 14: 355-360, 1993.
- 36) Bertelli A., Conte A., Ronga G.: L-propionyl carnitine protects erythrocytes and low density lipoproteins against peroxidation. *Drugs Exptl Clin Res* XX (5): 191-197, 1994.
- 37) Bertelli A., Conte A., Ronca G., Segnini D., Yu G.: Protective effect of propionyl carnitine against peroxidative damage to arterial endothelium membranes. *Int J Tiss Reac* XIII (1): 41-43, 1991.
- 38) Hagen T.M., Ingersoll R.T., Wehr C.M., Lykkesfeldt J., Vinarsky V., Bartholomev J.C.: Acetyl L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* Aug 4: 95(16): 9562-6, 1998.
- 39) Tagliatela G., Caprioli A., Giuliani A., Ghirardi O.: Spatial memory and NGF levels in aged rats : natural variability and effects of acetyl-L-carnitine treatment. *Exp Gerontol* Oct 31 (5): 577-87, 1996.
- 40) Murakami K., Okajima K., Uchiba M., Harada N., Lik W., Okabe H., Takatsuki K.: Role of granulocyte elastase in indomethacin induced gastric mucosal lesion formation in rats. *J Lab Clin Med* 130: 307-313, 1997.
- 41) Tanaka J., Yuda Y.: Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion in the pylorus ligated rat. *Biol Pharm Bull* 16 (1): 29-32, 1993.
- 42) Nakamoto K., Kamisaki Y., Wada K., Kawasaki H., Hoh T.: Protective effects of acetaminophen against acute gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion in the rat. *Pharmacology* 54: 203-210, 1997.
- 43) Kitano M., Wada K., Kamisaki Y., Nakamoto K., Kishimoto Y., Kawasaki H., Hoh

- T.: Effects of cimetidine on acute gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Pharmacology* 55: 154-164, 1997.
- 44) Rynn R.F., Stuart R.C., Goney T.F., Kay E., Mcbennett S., Byrne P.J., Hennessy T.P.J.: Stress ulceration and gastric mucosal cell kinetics: The influence of prophylaxis against acute stress ulceration. *J Surg Res* 55: 188-192, 1993.
- 45) Oredsson S., Ovarfordt P., Plate G.: PMN leukocytes increase reperfusion injury in skeletal muscle. *Int Angiol* 14: 80-88, 1995.
- 46) Petrasek P.F., Homer V., Walker P.M.: Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 19: 623-631, 1994.
- 47) Granger D.N., Korthius R.J.: Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Ann Rev Physiol* 57: 311-32, 1995.
- 48) Park J.L., Lucchesi B.R.: Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 689: 1905-12, 1999.
- 49) Toledo-Pereyra L.H., Suzuki S.: Neutrophils, cytokines and adhesion molecules in hepatic ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg* Dec 179: 758-62, 1994.
- 50) Jordan J.E., Zhao Z., Vinten-Johansen J.: The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 43: 860-78, 1999.
- 51) Jennings R.B., Shen A.C.: Calcium in experimental myocardial ischemia. Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. In: Bajusz E., Rona G., Eds., University Park: Baltimore, Inc pp: 639-655, 1972.
- 52) Cheung JY., Bonventre JV., Malis CD.: Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 314: 1670-1676, 1986.
- 53) Reilly M.P., Schiller H.J., Bulkley G.B.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surgery* 161: 488-503, 1991.

- 54)** Jarasch ED , Grund C , Bruder G : Localization of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 25: 67-82,1981.
- 55)** Roy RS , McCord JM.: Superoxide and ischemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase In: *Oxy radicals and their scavenger systems*. Vol 2. Cellular and Medical Aspects. Greenwald RA, Cohen G. Eds., New York, Elsevier Science Publishing, pp:145-53, 1983.
- 56)** Grisham M.B., Hernandez L.A , Granger D.N.: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 251: G567-G574, 1986.
- 57)** Seekamp A., Warren S.J., Remick G.D., Till O.G , Ward A.: Requirements for TNF- α and IL-1 in limb ischemia-reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Path* 143: 453-463, 1993.
- 58)** Hernandez L.A , Grisham M.B., Twohig B., Arfers K.E., Harlan J.M., Granger D.N.: Role of neutrophils in ischemia reperfusion induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253: H699-703, 1987.
- 59)** Forde R.C., Fitzgerald D.J.: Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 95: 787-789, 1997.
- 60)** Leo R., Pratico D., Iuliano L , Pulcinelli FM., Ghiselli A., Pignatelli P., Colavita AR., Fitzgerald GA., Violi F.: Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 95: 885-891, 1997.
- 61)** Bekerecioğlu M, Uğraş S., Dilek O.N., Tercan M., Özyazgan İ.: Serbest radikaller; Temel görüşler, biyokimyası, fizyopatolojisi ve cerrahi ile ilgileri. *Sendrom* 85-95,1998.
- 62)** Mutah H., Hiraishi H., Ota S., Ivey K.J., Terano A., Sugimoto T.S.: Role of oxygen radicals in ethanol induced damage to cultured gastric mucosal cells. *Am J*

- Physiol 258: G603-G609, 1990.
- 63)** Andrews F.J., Malcontenti C., O'Brien P.E.: Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. Role of reactive oxygen metabolites. *Digest Dis Sci* 37(9): 1356-1361, 1992.
- 64)** Smith S.M., Grisham M.B., Mancini E.A., Granger D.N., Kvietys P.R.: Gastric mucosal injury in the rat: role of iron and xanthine oxidase. *Gastroenterology* 92: 950-6, 1987.
- 65)** Olsan C.E.: Glutathione modulates toxic oxygen metabolite injury in canine chief cell monolayers in primary culture. *Am J Physiol* 254: G49-G56, 1988.
- 66)** Tsao P.S., Lefer A.M.: Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic and hypoxic perfused rat hearts. *Am J Physiol* 259: H1660-H1666, 1990.
- 67)** Gutteridge J.M., Halliwell B.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15(4): 129-135, 1990.
- 68)** Koster J.F., Biemond P., Stam H.: Lipid peroxidation and myocardial ischemic damage: cause or consequence. *Basic Res Cardiol* 82 Suppl 1:253-60, 1987.
- 69)** Clemens M.R., Waller H.D.: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 45(2-4): 251-68, 1987.
- 70)** Szelenyi I., Brune K.: Possible role of oxygen free radicals in ethanol induced gastric mucosal damage in rats. *Digest Dis Sci* 33(7): 865-871, 1988.
- 71)** Frank L., Massaro D.: Oxygen toxicity. *Am J Med* 69: 117-126, 1980.
- 72)** Yoshikawa T., Naito Y., Kishi A., Tomii T., Kaneko T., Inuma S., Ichikawa H., Yasuda M., Takahashi S., Kondo M.: Role of active oxygen, lipid peroxidation and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 34: 732-737, 1993.

- 73) Marx G., Chevion M.: Site specific modification of albumin by free radicals
Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochem J* 236(2): 397-400, 1986.
- 74) Wolff S.P., Dean R.T.: Fragmentation of proteins by free radicals and its effect
on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J* 234(2): 399-403, 1986.
- 75) Davies K.J., Goldberg A.L.: Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly
degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem* 262(17): 8227-34, 1987.
- 76) Davies K.J., Goldberg A.L.: Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis
and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem*
262(17): 8220-6, 1987.
- 77) Butler J., Koppenol W.H., Margoliash E.: Kinetics and mechanism of the
reduction of ferric cytochrome C by the superoxide anion. *J Biol Chem* 257(18):
10747-50, 1982.
- 78) Hassan H.M., Fridovich I.: Chemistry and biochemistry of superoxide
dismutases. *Eur J Rheumatol Inflamm* 4(2): 160-72, 1981.
- 79) Pal Y.B.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.
Physiol Rev 74(1): 139-162, 1994.
- 80) Takahashi K., Cohen H.J.: Selenium dependent glutathione peroxidase protein
and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood*
68: 640-645, 1986.
- 81) Sen C.K.: Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 79: 675-686,
1995.
- 82) Powers S.K., Leeuwenburgh C.: Exercise training-induced alterations in skeletal
muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sport Exerc* 31(7): 987-997,
1999.
- 83) Allen A., Flemström G., Garner A., Kivilaakso E.: Gastroduodenal mucosal

- protection. *Physiol Rev* 73(4): 823-857, 1993.
- 84) Davenport HW.: Salicylate damage to the gastric mucosal barrier. *N Engl J Med* 276:1307-12, 1967.
- 85) Clamp JR, Ene D.: The gastric mucosal barrier. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 11(1): 19-25, 1989.
- 86) Kelly D.G., Code C.F., Lechago J., Bugajski J., Schlegel J.F.: Physiological and morphological characteristics of progressive disruption of the canine gastric mucosal barrier. *Dig Dis Sci* 24: 424-441, 1979.
- 87) Kiviluoto T., Voipio J., Kivilaakso E.: Subepithelial tissue pH of gastric mucosa exposed to luminal acid, barrier breaking agents and haemorrhagic shock. *Gastroenterology* 94: 695-702, 1988.
- 88) Peskar BM., Maricic N.: Role of prostaglandins in gastroprotection. *Dig Dis Sci* 43(9): 23S-29S, 1998.
- 89) Seno K., Joh T., yokoyama Y., Hoh M.: Role of mucus in gastric mucosal injury induced by local ischemia/reperfusion. *J Lab Clin Med* 126: 287-93, 1995.
- 90) Takeuchi K.: Gastroduodenal bicarbonate secretion: pharmacological modulation and contribution to mucosal protection. *Nippon yakurigaku Zasshi* 108(6): 281-93, 1996
- 91) Hojgaard L., Mertz Nielsen A., Rune SJ.: Peptic ulcer pathophysiology: acid, bicarbonate and mucosal function. *Scand J Gastroenterol* 216: 10-5, 1996.
- 92) Ritchie W.P.: Role of bile acid reflux in acute haemorrhagic gastritis. *World J Surg* 5:189-198, 1981.
- 93) Kawano S., Tsuji S.: Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol* 15 suppl: D1-6, 2000.
- 94) Sorbye H., Svanes K.: The role of blood flow in gastric mucosal defence,

- damage and healing. *Dig Dis* 12(5): 305-17, 1994
- 95) Starlinger M., Schiessel R., Chung L., Silen W.: H⁺ back diffusion stimulating gastric mucosal blood flow in the rabbit fundus. *Surgery* 89: 233-236, 1981.
- 96) Kawai T., Joh T., Iwata F., Hoh M.: Gastric epithelial damage induced by local ischemia-reperfusion with or without exogenous acid. *Am J Physiol* 266: G263-G270, 1994.
- 97) Olson C.E., Chen M.C., Amiran D.A., Soll A.H.: Oxygen metabolites modulate prostaglandin E₂ production by isolated gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 256: G925-G930, 1989.
- 98) Hiraishi H., Terano A., Ota S., Mutoh H., Sugimoto T., Razandi M., Ivey K.J.: Oxygen metabolites stimulate mucous glycoprotein secretion from cultured rat gastric mucous cells. *Am J Physiol* 261: G662-G668, 1991.
- 99) Haeckel R., Kaiser E., Oellerich M., Siliprandi N.: Carnitine: metabolism, function and clinical application. *J Clin Chem Clin Biochem* 28: 291-95, 1990:
- 100) Tanphaichitr V., Leelahagul P.: Carnitine metabolism and human carnitine deficiency. *Nutrition* 9(3): 246-254, 1993.
- 101) Bremer J.: The role of carnitine in cell metabolism. *Molecular biology intelligence unit. Carnitine today.* Cladio De S., Giuseppe F., Landes Bioscience Austin, Texas, USA. Pp: 1-37, 1997.
- 102) Editorial :Carnitine deficiency. *The Lancet* 335(17): 631-33, 1990.
- 103) Brass E. P.: Carnitine transport. L-carnitine and its role in medicine from function to therapy. Ferrari R., Di Mauro S., Sherwood G. Ed. Academic press Ltd., New York, 21-36, 1992.
- 104) Rebouche C. J.: Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 54: 1147-52, 1991.

- 105) Famularo G., Matricardi F., Nucera E., Santini G., Simone De C.: Carnitine deficiency: Primary and secondary syndromes. Molecular biology intelligence unit Carnitine today. Simone De C., Famularo G., Landes bioscience Austin, Texas, USA. pp: 119-61, 1997.
- 106) Deufel T.: Determination of L-carnitine in biological fluids and tissues. J Clin Chem Clin Biochem 28: 307-311, 1990.
- 107) Bahl JJ, Bressler R. The pharmacology of carnitine. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 27: 257-277, 1987.
- 108) Bieber LL.: Carnitine. Annu Rev Biochem 57: 261-283, 1988.
- 109) Bremer J.: The role of carnitine in intracellular metabolism. J Clin Chem Clin Biochem 28: 297-301, 1990.
- 110) Tanpahaichitr N.: In vitro stimulation of human sperm motility by aetyl carnitine. Int J Fertil 22: 85-92, 1977.
- 111) De Simone C, Ferrari M, Lozzi A, et al. Vitamins and immunity. II. Influence of L-carnitine on the immun system. Acta Vitaminol Enzymol 4: 135-140, 1982.
- 112) De Simone C, Ferrari M, Meli D.: Reversibility by L-carnitine of immunosuppression induced by an emulsion of soya bean oil, glyserol and egg lecithin. Arzneim Forsch/ Drug Res 32: 1485-1488, 1982.
- 113) Fritz I.B., Burdzy K.: Novel action of carnitine: Inhibition of aggregation of dispersed cells elicited by clustering in vitro. J Cell Physiol 140: 18-28, 1989.
- 114) Neumann F.J., Ott I., Gawaz M.: Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. Circulation 92: 748-55, 1995.
- 115) Hulsmann W.C., Dubelaar M.L.: Carnitine recruitment of vascular endothelial and smooth muscle cells in imminent ischemia. Mol Cell Biochem 116: 125-29, 1992.

- 116) Gundersen H J G , Benotsen T.F., Korbo L , Marcussen N , Moller A., Nielsen K., Nyenggaard J.R., Pakkenberg B., Sorensen F.B., Vesterby A., West M.J.: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 379-394, 1988.
- 117) Davis J.E. Solutions and buffers, *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis Vol.1* Sonnenwirth A.C., Jarett L. The C. V Mosby Company Sy. Lovis Toronto London , pp:140-41, 1980.
- 118) Come S., Marrissey S.M., Woods R.J.: A method for quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J Physiol (Lond)* 242: 1169-1179, 1974.
- 119) Cockrell C.S., Ellis E.F.: Simple single-step high performance liquid chromatographic method for the separation of cyclooxygenase and lipoxigenase enzyme metabolites of arachidonic acid. *J Chromatog* 308: 316-321, 1984.
- 120) Stocks J., Offerman E.L., Modell C.B., Dormandy T.L.: The susceptibility to autooxidation of human red cell lipids in health and disease. *Br J Haematology* 23: 713-724, 1972.
- 121) Tietz N.V.: Chapter 15, Biochemical aspects of hematology. In *Textbook of Clinical Chemistry* pp: 1532-1534, 1986.
- 122) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Far A.L., Randel R.J.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 123) Misra H.P., Fridovich I.: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase *J Biol Chem* 247: 3170-75, 1972.
- 124) Aebi H.: Catalase of enzymatic analysis. Volume III *Enzyme 1: Oxidoreductases, Transferases.* Bergmeyer H. U, VCH Verlagsgesellschaft, weinheim. pp:273-285, 1987.

- 125) Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-69, 1967.
- 126) Gurr E.: Biological staining methods, Searle Diagnostic Gurr Products, ED Gurr E. Buckinghamshire, UK, 36-37, 1973.
- 127) Kobayashi A., Suzuki Y., Kamikawa T., Hayashi H., Masumura Y., Nishibara K., Abe M., Yamazaki N.: Effects of L-carnitine on ventricular arrhythmias after coronary reperfusion. *Jpn Circ J* 47(5): 536-42, 1983.
- 128) Brzozowski T., Konturek P.C., Konturek S.J., Sliwowsky Z., Drazdowicz D., Stachura J., Pajda R., Hahn EG.: Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion induced gastric lesions. *Eur J Pharmacol* Nov 26: 385(1): 47-61, 1999.
- 129) Myers S.I., Hernandez R.H., Honton J.W.: Acute mesenteric ischemia-reperfusion down regulates renal PGE₂ synthesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52(1): 41-8, 1995
- 130) Öner G., İzgut VN., Şentürk UK.: The susceptibility to stress-induced gastric injury of rats exposed to cadmium. *Biol Trace Elem Res* 47(1-3): 219-23, 1995
- 131) Nakamoto K., Wada K., Kitano M., Kishimoto Y., Ashida K., Kamisahi Y., Kawasaki H., Itoh. The role of endogenous acid in the development of acute gastric ulcer induced by ischemia-reperfusion in the rat. *Life Sci* 62(4):65-9, 1998
- 132) Ferrari R., Ciampolini G., Agnoletti G., Cargnoni A., Ceconi C., Visioli D.: Effect of L-carnitine derivatives on heart mitochondrial damage induced by lipid peroxidation. *Pharmacol Res Commun* 20(2): 125-132, 1988
- 133) Sushamakumari S., Jayadeep A., Suresh Kumar J.S., Venugopal P. Menon.: Effect of carnitine on malondialdehyde, taurine and glutathione levels in heart of

- rats subjected to myocardial stress by isoproterenol. *Indian J Exp Biol* 27:134-37, 1989.
- 134)** Beard T , Carrie D , Bayer MJ., Boudjenes B , Ferrieres J , Delay M , Berredet P., Thauwnat JP : Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by trombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde *Arch Mol Conur Vaiss* 87(10): 1289-96,1994.
- 135)** Kaçmaz M , Öztürk HS., Karaayvaz M., Güven C , Durak I.: Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effect of an allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg* 42(6): 427-31,1999.
- 136)** Akçıl E., Tug T., Döşeyen Z : Antioxidant enzyme activities and trace element concentrations in ischemia-reperfusion *Biol Trace Elem Res* 76(1): 13-7, 2000
- 137)** İnal M., Aktaş O , Kanbak G , Akyüz F., Sevin B Changes of antioxidant enzyme activities during cardiopulmonary bypass *J Cardiovasc Surg* 40(3): 373-6,1999.
- 138)** Dusinoviç S., Miyolkoviç D., Soicic Z S., Duric J , Zunic Z., Nikatic V : Spasis M.B Antioxidative defence in human myocardial reperfusion injury. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17(3-4): 281-4,1998.
- 139)** Brown J.M., Grosso M.A., Benerjee A., Whitman G.J , Repine J.E., Harkes A.H : Erythrocyte catalase decreases cardiac reperfusion injury. *Curr Surg* 46(2): 122-4,1989
- 140)** Kızıltunç A., Cogalgil S , Cerrahoğlu L : Carnitine and antioxidants levels in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 27(6): 441-5,1998
- 141)** Tashima K., Fujita A , Takeuchi K.: Aggrevation of ischemia-reperfusion induced gastric lesions in streptozotocin diabetic rats. *Life Sci* Aug 25, 67(14):

1707-18, 2000.

142) Üstündağ B., Kazez A., Demirbağ M., Canatan H., Halifeoğlu I., Özercan I.H.: Protective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Cell Physiol Biochem* 10(4): 229-36, 2000.

143) Bray R.C., Cockle S.A., Fielden E.M.: Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J* 139: 43-48, 1974.

144) Gürlek A., Tutar E., Akcıl E., Dinçer I., Erol C., Kocatürk P.A., Oral D.: The effects of L-carnitine treatment on left ventricular function and erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with ischemic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2(2): 189-93, 2000.

145) Lafont A., Marwick T.H., Chisolm G.H., Van Lente F., Vaska K.J., Whitlow P.L.: Decreased free radical scavengers with reperfusion after coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 131(2): 219-23, 1996.

146) Stroh M., Christopher T.A., Lopez B.L., Guo Y.P., Amico-Roxas M., Ma X.L.: L-propionyl carnitine, an endogenous ester in fatty acid metabolism, exerts anti-shock and endothelial protective effects in rat splanchnic ischemia-reperfusion injury. *Shock* 9(3): 216-22, 1998.

ANKA
Merkez Kurumları