

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

**OREKSİN-A’NIN İSKEMİ-REPERFÜZYON İLE
OLUŞTURULAN MİDE HASARINA KARŞI
KORUYUCU ETKİSİNDE DUYUSAL AFFERENT
SİNİRLERİN VE NİTRİK OKSİT’İN ROLÜ**

Ruken TAN

Doktora Tezi

Antalya, 2011

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

**OREKSİN-A’NIN İSKEMİ-REPERFÜZYON İLE
OLUŞTURULAN MİDE HASARINA KARŞI
KORUYUCU ETKİSİNDE DUYSAL AFFERENT
SİNİRLERİN VE NİTRİK OKSİT’İN ROLÜ**

Ruken TAN

Doktora Tezi

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

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2008.03.0122.002)

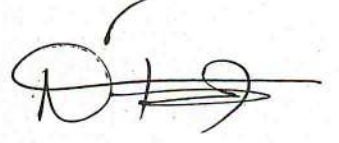
“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 11/08/2011

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



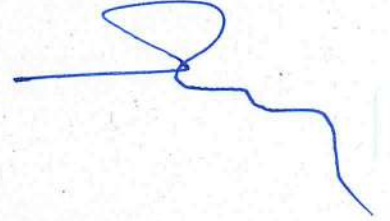
Üye: Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



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



Üye: Prof. Dr. Sadi ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı



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



ONAY:

Bu tez, Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2011 tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

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

1. **Tan R**, Bulbul M, Ongut G, Tosun O, Izgut-Uysal VN. Prostaglandins, capsaicin-sensitive sensory nerves and neutrophil infiltration, but not nitric oxide, contribute to cold restraint stress-induced gastric adaptation in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006; 33(10):946-51.

ÖZET

Bu çalışmada Oreksin-A'nın (OXA) iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarını azaltıcı etkisinde duysal innervasyon ve NO aracılı sistemin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla Sham grubu ve SF, OXA, L-NAME, L-NAME+OXA, Kapsaisin, Kapsaisin+OXA, Vagotomi, Vagotomi+OXA uygulanan I/R grupları oluşturulmuştur. SF grubuna 30 dk iskemi/3 saat reperfüzyon uygulaması ile eşzamanlı olarak jugular ven aracılığı ile serum fizyolojik infüzyonu (0.01 ml/kg/dk), OXA gruplarına ise aynı hızda 500 pmol/kg/dk OXA infüzyonu uygulanmıştır. Kapsaisin (125 mg/kg, s.c.); duysal sinirlerin denervasyonu için, L-NAME (30 mg/kg, i.v.) ise nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olarak kullanılmıştır. Vagotomi gruplarına subdiyafragmatik bilateral vagotomi yapılmıştır. Tüm gruplarda I/R sonrası mide mukozal kan akımı ve lezyon indeksine bakılmıştır. Mide örnekleri toplandıktan sonra mide dokusunda miyeloperoksidaz (MPO), CGRP, nitrit/nitrat (NOx), iNOS ve eNOS protein ölçümleri yapılmıştır.

Bulgularımız, OXA verilen hayvanlarda I/R ile oluşan mukozal hasarın önemli ölçüde azaldığı ve kan akımında da anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir. L-NAME, kapsaisin ve vagotomi uygulamaları I/R gruplarında lezyon indeksi ve kan akımı değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. L-NAME+OXA, Kapsaisin+OXA ve Vagotomi+OXA gruplarında ise OXA grubuna göre lezyon indeksi değerlerinin yükseldiği ve kan akımı değerlerinin düştüğü görülmüştür. Her üç grupta da OXA'nın koruyucu etkisi ortadan kalkmış ve I/R grubuna yaklaşmıştır. Benzer şekilde SF grubunda, sham grubuna göre önemli miktarda artan MPO enzim aktivitesi, OXA infüzyonu ile azalmıştır. L-NAME, Kapsaisin ve Vagotomi gruplarında MPO aktivitesi SF grubundan farklı bulunmamış, bu ajanların OXA ile birlikte uygulandığı gruplarda, sadece OXA uygulaması ile gözlenen MPO aktivitesindeki azalış ortadan kalkmıştır. SF grubunda, sham grubuna göre azalmış olarak bulunan CGRP miktarı OXA uygulamasıyla önemli düzeyde artmıştır. L-NAME, Kapsaisin ve Vagotomi gruplarında CGRP düzeyleri SF grubundan farklı bulunmamış, L-NAME+OXA, Kapsaisin+OXA ve Vagotomi+OXA gruplarında ise OXA grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. NOx miktarı SF grubunda sham grubuna göre önemli bir artış göstermiştir. SF grubuna göre OXA grubunda önemli bir fark gözlenmemiş, L-NAME grubunda NOx miktarının önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. L-NAME+OXA ve Kapsaisin+OXA gruplarında NOx miktarı OXA grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. I/R mide dokusunda iNOS protein ekspresyonunun düzeyinde artışa neden olmuş, OXA ve L-NAME uygulanan gruplarda ise protein ekspresyonu önemli düzeyde azalmıştır. eNOS protein ekspresyon düzeyi ise SF grubunda önemli ölçüde azalırken OXA ve L-NAME gruplarında SF grubuna göre bir fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak; OXA'nın, midede I/R'nin neden olduğu mukoza hasarını önleme mekanizmasına; duysal afferent sinirlerin ve NOS-NO sisteminin aracılık ettiği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: oreksin-A, iskemi/reperfüzyon, mide mukozal korunması, mide mukozal kan akımı, duysal sinirler, kalsitonin geni ile ilişkili peptid, nitrik oksit

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the roles of sensory innervation and NO mediated system in the protective mechanisms of Orexin-A (OXA) against ischemia/reperfusion (I/R) induced gastric injury. For this purpose, a Sham group and several I/R groups such as Saline, OXA, L-NAME, L-NAME+OXA, Capsaicin, Capsaicin+OXA, Vagotomy and Vagotomy+OXA are set up. A total of 30 min ischemia/3 hours reperfusion was applied to the Saline group with parallel infusion of saline (0.01 ml/kg/dk) through the jugular vein. OXA groups received 500 pmol/kg/min of OXA infusion with the same rate. Capsaicin (125 mg/kg, s.c.) was used for sensory neuron innervation while L-NAME (30 mg/kg, i.v.) was applied as the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. Rats in the vagotomy groups had subdiaphragmatic bilateral vagotomy. For each group, rat stomachs were exposed and following the measurement of gastric blood flow, lesion index was calculated. Myeloperoxidase (MPO), CGRP, nitrite/nitrate (NO_x), iNOS and eNOS protein expressions were measured.

Gastric mucosal injury caused by I/R significantly reduced in OXA infused rats while the blood flow significantly increased. Lesion index and blood flow did not change in I/R groups those received L-NAME, capsaicin or vagotomy application. Compared to the OXA group; L-NAME+OXA, Capsaicin+OXA and Vagotomy+OXA groups had increased lesion index and decreased mucosal blood flow. Protective effect of OXA diminished in all three groups and approached to I/R group level. Similarly, in Saline group, MPO enzyme activity significantly increased compared to the sham group, but decreased with the OXA infusion. MPO activities in L-NAME, Capsaicin and Vagotomy groups did not differ from Saline group level. However, when these agents were applied with OXA infusion, the decline in MPO activity which was observed after sole OXA infusion was diminished. CGRP level was lower in the Saline group compared to the sham group, but it significantly increased following the OXA infusion. CGRP levels did not change in L-NAME, Capsaicin and Vagotomy groups compared to the Saline group. However, the CGRP levels of L-NAME+OXA, Capsaicin+OXA and Vagotomy+OXA groups were significantly lower than the OXA group. NO_x level of Saline group was significantly higher than the sham group. While there was no change in NO_x level of OXA group compared to the Saline level, the decrease in L-NAME group was found to be significant. NO_x levels of L-NAME+OXA and Capsaicin+OXA groups were significantly lower than the OXA group. I/R increased the iNOS protein expression in the gastric tissue. It decreased significantly in the OXA and L-NAME groups. eNOS protein expression significantly decreased in Saline group while there was no significant change in either OXA or L-NAME groups compared to the Saline group.

In conclusion, it has been shown that the sensory afferent neurons and NOS-NO system mediate the protective mechanisms of OXA against I/R related gastric mucosal injuries.

Key Words: orexin-A, ischemia/reperfusion, gastric mucosal protection, gastric mucosal blood flow, sensory neurons, calcitonin gene related peptide, nitric oxide

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerçekleşmesinde değerli katkıları ve eleştirileriyle bana yol gösteren ve destek olan sevgili hocam Prof. Dr. Nimet UYSAL'a, deneysel çalışmalardaki katkılarından dolayı çalışma arkadaşım Araş. Gör. Burcu GEMİCİ'ye, teknik olanakları ile deneysel çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına, Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR ve Yrd. Doç. Dr. Nazmi YARAŞ'a, Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Ayşegül ÇÖRT'e, istatistiksel değerlendirmelerdeki danışmanlığı ve moral desteği için Biyoistatistik Anabilim Dalı Araş. Gör. Özgür TOSUN'a, aileme, Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve değerli hocalarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Oreksinlerin Keşfi	4
2.2. Beyinde Oreksin Sistemi	5
2.3. Oreksin Reseptörlerinin Özellikleri	6
2.4. Oreksin Reseptörlerinin Dağılımı	6
2.4.1. Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı	6
2.4.2. Oreksin Reseptörlerinin Periferdeki Dağılımı	7
2.5. Oreksinlerin Fizyolojik Etkileri	7
2.5.1. Oreksinlerin Besin Alımı ve Uyku Üzerine Etkileri	8
2.5.2. Oreksinlerin Nöro-Endokrin Etkileri	9
2.5.3. Oreksinlerin Enerji Metabolizması Üzerine Etkileri	10
2.6. Sindirim Sisteminde Oreksinler ve Etkileri	10
2.6.1. Oreksinlerin Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkileri	11
2.6.2. Beyinde Asit Sekresyonunun Stimüle Edildiği Bölge Olarak Dorsal Motor Nukleus	12
2.6.3. Endojen Oreksin-A'nın Asit Sekresyonu Üzerine Etkileri	12
2.6.4. Oreksin-A'nın Mide Motilitesi Üzerine Etkisi	13
2.6.5. Oreksin-A'nın Mide Korunması Üzerine Etkisi	13
2.7. İskemi/Reperfüzyon	14
2.7.1. İskemi Fazında Hasar Oluşumu	15
2.7.2. Reperfüzyon Fazında Hasar Oluşumu	15
2.8. Mide Mukozal Savunma Mekanizmaları	18
2.8.1. Mukus-Bikarbonat-Fosfolipid Bariyer	18
2.8.2. Yüzey Epitel Hücreleri	19
2.8.3. Mukozal Progenitör Hücrelerde Sürekli Hücre Yenilenmesi	19
2.8.4. Mukozal Mikrodolaşım	20
2.8.5. Mide Mukozasının Duysal İnnervasyonu	21
2.8.6. Prostaglandin E ₂ ve Prostaglandin I ₂ 'nin Sürekli Üretimi	21
2.8.7. Mide Mukozal Savunmasının Nörohormonal Düzenlenmesi	21
2.8.8. İskemi/Reperfüzyon Hasarı'na Karşı Mide Savunması	22
2.9. Mide Mukozal Savunmasında Duysal İnnervasyonun Rolü	23

2.9.1. Sindirim Sisteminin Duysal İnnervasyonu	23
2.9.2. Duysal Nöronların Enteroendokrin Hücrelerle Etkileşimleri	24
2.9.3. Kasılma ve Gerilme Yoluyla Duysal Nöron Aktivasyonu	25
2.9.4. Mukozal Hasar Yoluyla Duysal Nöron Aktivasyonu	25
2.9.5. Midedeki Duysal Nöron Fonksiyonlarının Araştırılmasında Kapsaisin'in Yeri	26
2.9.6. Midedeki Nörojenik Korumanın Yolakları ve Mediatorleri	27
2.10. Nitrik Oksit'in Sindirim Sistemi Fizyolojisindeki Rolü	29
2.10.1. Nitrik Oksit Sentezi	29
2.10.2. Nitrik Oksit'in Hücre İçi Etki Mekanizmaları	30
2.10.3. Nitrik Oksit'in Sindirim Sistemi Motilitesi Üzerine Etkileri	31
2.10.4. Nitrik Oksit'in Mukozal Fonksiyon ve Kan Akımının Düzenlenmesi Üzerine Etkileri	32
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	34
3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü	34
3.1.1. Gruplandırma	34
3.2. Parametrelerin Tayini	35
3.2.1. Mide Mukozal Kan Akımı Ölçümü	35
3.2.2. Lezyon İndeksinin Tayini	36
3.2.3. Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini	36
3.2.4. CGRP Miktarının Tayini	37
3.2.5. Nitrit/Nitrat Tayini	38
3.2.6. iNOS ve eNOS Ekspresyonunun Tayini	38
3.3. İstatistiksel Analiz	40
BULGULAR	41
4.1. Oreksin-A Etkin Dozunun Belirlenmesi	41
4.2. Lezyon İndeksi	43
4.3. Mukoza Kan Akımı	44
4.4. MPO Aktivitesi	45
4.5. CGRP Düzeyleri	46
4.6. NOx Değerleri	47
4.7. iNOS Protein Ekspresyonu	48
4.8. eNOS Protein Ekspresyonu	49
TARTIŞMA	50
SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	75
EKLER	76
EK-1: Prostaglandins, capsaicin-sensitive sensory nerves and neutrophil infiltration, but not nitric oxide, contribute to cold restraint stress-induced gastric adaptation in rats.	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$[Ca^{+2}]_i$	: hücre içi kalsiyum
2-DG	: 2-Deoksi-D-glikoz
5-HT	: 5-hidroksitriptamin
ACTH	: adrenokortikotropik hormon
BH4	: tetrahidrobiopterin
CaM	: kalmodulin
CAT	: katalaz
CCK	: kolesistokinin
CGRP	: kalsitonin geni ile ilişkili peptid
CINC	: sitokinle indüklenen nötrofil kemoatraktanları
eNOS	: yapısal NOS
COX	: siklooksijenaz
CRF	: kotrikotropin salgılatıcı hormon
CSF	: serebrospinal sıvı
DMN	: dorsal motor nukleus
EC	: enterokromaffin hücreler
EGF-R	: epidermal büyüme faktörü reseptörü
eNOS	: endotelial NOS
ERK	: ekstraselüler sinyal tarafından regüle edilen kinaz
ESS	: enterik sinir sistemi
FAD	: flavin adenin dinükleotid
FMN	: flavin mononükleotid
H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit
HCO ₃ ⁻	: bikarbonat
HIF1- α	: hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α
HPG	: hipotalamus-hipofiz-gonad
HSP	: ısı şok proteinleri
HUVEC	: insan vasküler endotelial hücreleri
I/R	: iskemi/reperfüzyon
ICAM	: hücre içi adezyon molekülleri
IGF-1	: insülin-benzeri büyüme faktörü-1
IL-1 β	: interlökin 1 β
iNOS	: indüklenebilir NOS
IPAN	: intrinsik primer afferent nöronlar
LH	: luteinizan hormon
LHA	: lateral hipotalamik alan
L-NAME	: N ^w -nitro-L-arginine methylester
LOX	: lipoksijenaz
MAPkinazlar	: mitojen ile aktive olan protein kinaz ailesi
MCH	: melanin konsantre edici hormon

MSS	: merkezi sinir sistemi
MUC	: musin
N₂O₃	: dinitrojen trioksitin
NF-κB	: nükleer faktör- kappa B
NKA	: nörokinin A
nNOS	: nöronal NOS
NO	: nitrik oksit
NOS	: nitrik oksit sentaz
NPY	: nöropeptid Y
NSAID	: non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar
NTS	: nukleus traktus solitarius
ONO₂CO₂⁻	: nitrozoperokso karbonat
ONOO⁻	: peroksinitrit anyonu
OXA	: Oreksin-A
OXB	: Oreksin-B
PAF	: trombosit aktive edici faktör
PCR	: polimeraz zincir reaksiyonu
PDE	: fosfodiesteraz
PG	: prostaglandin
PGI₂	: prostasiklin
PMN	: polimorfonükleer nötrofil
PMNL	: polimorfonükleer lökositler
PVN	: paraventriküler nukleus
sGC	: çözülebilir guanilat siklaz
SOD	: süperoksit dismutaz
SP	: substans P
TFF	: trefoil faktör ailesine ait peptid
TGF-α	: transforme edici büyüme faktörü
TNF-α	: tümör nekrozis faktör-alfa
TRH	: tirotropin serbestleştirici hormon
TSH	: tiroid uyarıcı hormon
TSP1	: trombospondin-1
TX	: tromboksan
VIP	: vazoaktif intestinal peptid
VMN	: ventromedyal hipotalamik nukleus
VR1	: vanilloid reseptörleri
XOD	: ksantin oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Oreksin-A'nın Santral ve Periferik Dokulardaki Fonksiyonları	7
3.1. Mide Mukozal Kan Akımı Ölçümü için Kullanılan Düzenek	36
4.1. Farklı Dozlarda Oreksin-A Uygulamasının Lezyon İndeksine Etkileri	41
4.2. Farklı Dozlarda Oreksin-A Uygulamasının Mide Mukozal Kan Akımına Etkileri	42
4.3. Lezyon İndeksi	43
4.4. Mukoza Kan Akımı Değerleri	44
4.5. MPO Aktivitesi	45
4.6. CGRP Düzeyleri	46
4.7. NO _x Değerleri	47
4.8. iNOS Protein Ekspresyonu Düzeyleri	49
4.9. eNOS Protein Ekspresyonu Düzeyleri	49

GİRİŞ

Oreksin-A (OXA, hypocretin-1) ve Oreksin-B (OXB, hypocretin-2), prepro-oreksin olarak isimlendirilmiş 130 amino asitlik öncü proteinden türeyen peptidlerdir. Oreksinler, besin alımının merkezi kontrolünün yanı sıra; enerji homeostasisi, uyku/uyanıklık davranışı, ağrı iletimi, yeme ve ilaç bağımlılığı, üreme, kardiyovasküler ve adrenal fonksiyonlarda rol oynayan birçok sinirsel yolağın aktivasyonu ile ilişkilidir [1]. Oreksinler, ilk olarak 1998 yılında dorsal ve lateral hipotalamusta bulunan nöronların hücre gövdelerinde gösterilmiş ve G proteinine bağlı reseptörleri aracılığı ile etki gösteren, besin alımıyla ilişkili hipotalamik nöropeptidler olarak tanımlanmışlardır [1]. 33 amino asit içeren 3562 Da ağırlığındaki OXA ve 28 amino asit içeren 2937 Da ağırlığındaki OXB peptidlerini üreten nöronlar lateral ve distal hipotalamusta bulunurlar [1, 2]. Bu nöronların merkezi sinir sisteminin (MSS), oreksin reseptörlerinin de bulunduğu birçok bölümüne projeksiyonları vardır. Bunun yanı sıra, testis, böbrek, plasenta, adrenal bezler, pankreas, ince bağırsak ve midedeki endokrin hücrelerde ve enterik sinir sistemindeki (ESS) nöronlarda oreksinlerin ve reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir [1, 3]. İnce barsağın submukozal ve myenterik plexuslarında oreksin immünoreaktif nöronlar saptanmıştır. OXA ve reseptörü intrinsik ve ekstrinsik afferent nöronlarda da gösterilmiştir [3]. Oreksin reseptör immünoreaktivitesi ise oreksin içeren sinir liflerinin yakınlarda ve sirküler düz kas hücrelerinde belirlenmiştir [4]. OXA'nın sinir varikozitlerinde; vazoaaktif intestinal peptid (VIP), nitrik oksit sentaz [5], Substans P (SP) veya gastrin ile beraber bulunduğu tespit edilmiştir [6]. Oreksinler gastrointestinal motilite, mide, bağırsak ve pankreas salgısı üzerine etkilidirler [7-10].

İskemi/reperfüzyon (I/R) uygulamasının, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, endotel hücrelerine nötrofil adezyonu ve mikrovasküler disfonksiyonla ilişkili olarak midede lezyon oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Konuyla ilgili çalışmalar iskeminin mide mukozal bariyerini zayıflatıp asit geri-difüzyonunu artırarak mukozayı hasara yatkın hale getirdiğini göstermiştir [11]. Hassan ve ark. tarafından mikrovasküler disfonksiyona neden olan, artmış endotelin-1 salınımının ve gastrin motilitedeki değişimlerin, I/R tarafından indüklenen mukozal hasarı başlatıcı etkiler olduğu ileri sürülmektedir [12]. Reperfüzyondan sonra özellikle ksantin-ksantin oksidaz sistemi (XOD) ve aktive olmuş nötrofiller aracılığı ile oluşan ROS, dokuda lipid peroksidasyonuna neden olur ve asit sekresyonuyla birlikte hücre ölümü ve mukozal hasar yapar [13].

Mide mukozasının bütünlüğü mukozal bariyeri oluşturan fiziksel, kimyasal ve fizyolojik birçok faktörün katılımıyla sürdürülmektedir. Duysal lifler gastrin mukozal homeostasisin sürdürülmesinde ve mukozal korunmada rol oynamaktadır [14]. Mide mukozası yoğun olarak ekstrinsik afferent sinirler tarafından innerve edilmektedir. Midedeki ekstrinsik afferent sinir liflerinin iki farklı kaynağı bulunmaktadır [15].

Spinal duysal nöronların gövdeleri dorsal kök gangliyonunda bulunur. N. vagustaki afferent liflerin hücre gövdeleri ise nodoz ve jugular gangliyonunda bulunur [14, 15]. Vagal afferentler temel olarak gastrointestinal sistem ile MSS arasındaki duysal köprüyü oluştururlar. Sindirim sisteminde ağrı algılanmasına yanıt olarak nöroendokrin, davranışsal ve emosyonel reaksiyonların oluşmasına neden olurlar [16, 17]. Spinal afferent nöronlar tip 1 vanilloid reseptörleri eksprese ederler ve toksik bir ajan olan kapsaisin'e duyarlıdırlar [16-18]. Düşük doz kapsaisin bu nöronları uyarıcı etki gösterirken, yüksek dozda denerve olmalarına neden olur. Kapsaisin'e duyarlı afferent sinir sonlanmalarından salınan kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve taşıyıcıları gibi peptid transmitterler mukozal savunmayı güçlendirici etkilere sahiptirler [19]. Kapsaisin'e duyarlı duysal liflerin topikal kapsaisin uygulaması ile uyarılması ülser oluşturuca ajanların neden olduğu mukozal lezyon oluşumunda azalmaya neden olur. Nörotoksik dozlarda kapsaisin uygulamasının ise, duysal liflerin duyarsızlaşmasına, etanol, indometazin, stres ve asit ile oluşturulan mukozal lezyonların şiddetlenmesine neden olduğu gösterilmiştir [14, 19]. Mide mukozal kan akımını düzenleyen submukozal arteriyoller, kapsaisine duyarlı duysal lifler ile yoğun olarak innerve edilir ve kapsaisin'in submukozal olarak uygulanması submukozal arteriyollerin dilatasyonuna neden olur [20]. CGRP vazodilatasyona neden olan lokal mediatördür ve mide mukozasını etanol ve diğer zararlı etkenlere karşı koruyucu özelliğe sahiptir. CGRP, CGRP-1 reseptörü aracılığı ile endotelden nitrik oksit (NO) salınımına neden olarak submukozal arteriollerde genişleme ve mukozal kan akımında artış yapar. Ayrıca CGRP-1 reseptörü üzerinden gastrin salınımını baskılar, böylece asit sekresyonunu inhibe eder [15, 18, 20].

Mukozal kan akımının sürekliliği zararlı maddelere karşı mukozal bütünlüğün korunması açısından oldukça önemlidir. Zararlı maddeler luminal yüzeye uygulandığında mukozal kan akımı hızlı bir biçimde artış gösterir [21]. Bu reaktif hipereminin engellenmesi mukozanın hasar görme olasılığını artırmaktadır. Kuvvetli bir vasodilatör olan NO'nun mukozal kan akımı cevaplarını regüle eden anahtar mediatörlerden biri olduğu gösterilmiştir. Bu durum hem bazal koşullarda hem de zararlı maddelere verilen cevaplarda geçerlidir. NO'nun oluşumunu sağlayan NOS enziminin cNOS formu normal fonksiyonun sürdürülmesinde önemlidir. Bu enzimin inhibisyonu mukozal kan akımı, sekresyon ve motiliteyi bozar. iNOS patolojik durumlarda büyük miktarlarda eksprese olur. Bu nedenle tahribat ve disfonksiyonla ilişkilidir [21]. Mide yüzeyine asit uygulanması epitelyum altındaki duysal afferent sinirlerin aktivasyonuna yol açarak submukozal arteriyollerin çevresinde CGRP salınımına neden olur. CGRP kan damarları boyunca uzanan vasküler endotelyumdan NO üretimini uyarır. NO, vasküler düz kas hücrelerine difüze olur ve burada çözünebilir guanilat siklaz'ı stimüle eder. Bu stimülasyon cGMP seviyesinin artması ile sonuçlanır ve böylece vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesi sağlanır. Bu sinirsel yanıtta görülebilecek bozulmalar mide mukozasının hasara karşı olan hassasiyetini anlamlı derecede artırır. Böyle bir bozulma duysal afferent sinirlerin hasar görmesi, CGRP reseptörlerinin bloke edilmesi veya NO sentezinin inhibisyonu ile olabilir [22, 23].

OXA'nın mide mukozası üzerine koruyucu etkisi Yamada ve ark. tarafından çok yakın tarihli bir çalışmayla gösterilmiştir [24]. Bu çalışmada intrasisternal OXA uygulamasının, etanol ile oluşturulan mide lezyonlarında doza bağımlı bir azalmaya

neden olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, OXA'nın mideyi koruyucu etkisinin merkezi sinir sistemi aracılığı ile olduğunu ve vagal muskarinik sistemin, NO'nun ve prostaglandinlerin (PG) bu koruma mekanizmasında rol oynayabileceği sonucuna ulaşmışlardır. Ancak duysal lifler de dâhil olmak üzere sindirim sisteminin farklı bölümlerinde OXA'ya ait reseptörlerin bulunması, OXA'nın midedeki reseptörlerine bağlanarak mide mukozasını koruyucu etki gösterebileceğini ve bu etki mekanizmasında duysal sinirlerin rol oynayabileceğini düşündürmüştür. OXA ve reseptörünün ekstrasik afferent nöronlarda da bulunduğu ve duysal afferentlerin OXA tarafından aktive edilerek duysal iletide rol oynayabileceği ile ilgili kanıtlar mevcuttur [3]. Bunun yanı sıra NOS knockout fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada OXA'nın besin alımını arttırıcı etkisinin NO aracılı olduğu gösterilmiştir [25].

Bu bilgiler doğrultusunda planlanan çalışmanın amacı; OXA'nın, midede oluşturulan I/R hasarına karşı mide mukozasını koruyucu etkisi ve bu etkide NOS-NO sisteminin ve kapsaisine duyarlı duysal sinirlerin rolünü araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Oreksinlerin Keşfi

Oreksinler, G-proteiniyle eşleşen yetim reseptörleri aktive eden endojen ligandların incelendiği bir çalışma sırasında bulunmuştur [26]. Sakurai ve ark., her biri farklı bir yetim reseptör cDNA'sını eksprese eden 50'den fazla hücre hattı kullanarak, sıçan beyninden elde edilen örneklerin HPLC fraksiyonlarının, hücre içi kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) konsantrasyonunu artırma yetenekleri test edilmiştir [26]. Araştırmacılar, insan embriyonik böbrek (HEK293) hücre hattında HFGAN72 olarak adlandırıldıkları bir reseptörü eksprese eden ve güçlü $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olan HPLC fraksiyonları tespit etmişlerdir. Fraksiyonlarda en fazla tepe yapan protein saflaştırılıp sekanslandığında, 33 amino asit uzunluğunda, N-terminal piroglutamil rezidüsü olan ve bir amidlenmiş C terminaline sahip yeni bir peptid keşfedilmiştir. OXA olarak adlandırılan bu peptid iki adet disülfid bağı içermektedir ve sığır beyninden elde edilen benzer örneklerin de sekanslanması sonucunda peptidin türler arası kesin homolojiye sahip olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmaların sonucunda, HPLC fraksiyonlarında OXA'ya ek olarak B ve B' şeklinde adlandırılan iki tepe noktasının varlığı gözlenmiştir. B tepe noktasının; amidlenmiş C terminali içeren ve sekans açısından da OXA ile %46 oranında benzer olan 28 amino asitlik OXB adı verilen bir peptide, B' tepe noktasının ise N-terminal kısmı olmayan OXB'ye ait olduğu bulunmuştur [4, 27-37]. Daha sonraki analizler hem OXA hem de OXB'nin aynı 130 amino asitlik prekürsör olan sıçan preprooreksininden proteolitik işleme yoluyla oluştuğunu göstermiştir. İnsan ve fare preprooreksin sekansları, sıçandan alınan örneklerle sırasıyla %83 ve %95 oranında benzerlik göstermiştir. Radyasyon hibrit eşleştirme yöntemi sonucunda insan preprooreksin geninin 17q21 kromozom bölgesine eşleştiği bulunmuştur. Dolayısıyla preprooreksin geninin "kromozom 17 ile ilişkili demans" olarak da adlandırılan bir grup nörodejeneratif bozukluğa neden olan aday genlerden biri olduğu öne sürülmektedir [3].

Tüm bu bulgulardan bağımsız olarak, de Lecea ve ark. [38] polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemini kullanarak preprohipokretin adı verilen bir öncül proteini kodlayan, hipotalamusa özgü bir mRNA tanımlamışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda bu prepropeptidin işlenmesi ile biri 39 amino asitlik biri de 29 amino asitlik iki farklı peptid elde edildiğini saptamışlardır. Bu geni eksprese eden hücrelerin yalnızca hipotalamusta konumlandığını düşünmeleri ve bağırsak peptidi olan sekretin ile zayıf homolojisi nedeniyle bu peptidler hipokretin-1 ve hipokretin-2 olarak adlandırılmıştır. Takip eden karşılaştırmalar sonucunda preprooreksin ve preprohipokretin'in aynı gen olduğu görülmüş ve hipokretin-1 ve hipokretin-2'nin sırasıyla OXA ve OXB ile ortak sekanslarının olduğu bulunmuştur [36]. Dolayısıyla oreksin ve hipokretin aynı molekül olarak kabul edilmiştir [4, 26, 39].

2.2. Beyinde Oreksin Sistemi

İmmünohistokimyasal ve in situ hibridizasyon çalışmaları oreksin üreten hücrelerin MSS’de hipotalamusdaki az sayıda çekirdekte bulunduğunu göstermiştir. Bu çekirdekler perifornikal çekirdek, lateral hipotalamik alan (LHA) ve dorsomedyal hipotalamik çekirdektir [26-28, 38, 40, 41]. Oreksin içeren sinir lifleri oldukça sınırlı bir bölgede yerleşmiş olmalarına rağmen MSS boyunca geniş şekilde dallanırlar. Bu dallanmalar özellikle olfaktör bulbul, serebral korteks, talamus, hipotalamus, beyin sapı ve omuriliğin hemen tüm seviyelerinde görülebilir [27, 28, 34, 35, 42, 43]. Oreksin nöronlarının geniş projeksiyonu, oreksinlerin çok sayıda sistemi modüle ettiğini göstermektedir [35, 36]. Oreksinlerin doğrudan akson terminalleri üzerine etki ederek eksitator ya da inhibitör nörotransmitterlerin salınımını artırdığı bilinmektedir [38, 44].

Hipotalamus içinde oreksin nöronları arkuat nukleusa projekte olur [27, 28] ve özel olarak nöropeptid Y (NPY) içeren hücre gövdelerini innerve eder [43]. LHA içerisinde, NPY nöronları ve oreksin nöronları arasında karşılıklı bağlantılar bulunduğu gösterilmiştir [40, 42, 43]. Ek olarak, oreksin içeren sinir lifleri, paraventriküler nukleus (PVN) içindeki NPY-immünoreaktif sinir terminallerine yakın bölgelerde sonlanırlar [42, 43]. NPY kuvvetli bir oreksijenik peptid olup PVN’den ve etrafındaki bölgelerden salınır ve besin alımını stimüle eder [45]. Arkuat NPY nöronları oreksinler tarafından uyarıldığı için [36, 44], oreksinin stimüle ettiği besin alımının NPY yolları üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir [28, 46]. Ek olarak, NPY’nin Y1 ve Y5 reseptörleri için kullanılan antagonistlerin de oreksinin stimüle ettiği besin alımını azalttığı gözlenmiştir [47]. Dolayısıyla, NPY aracılı besin alımı yollarının aktivasyonu, kısmen oreksinin besin alımı üzerindeki etkisinden sorumludur.

Arka beyindeki oreksin-immünoreaktif lifler, nukleus traktus solitarius (NTS), vagusun dorsal motor nukleusu (DMN) ve area postrema’yı içeren dorsal vagal kompleks içinde bulunurlar. Sindirim sisteminden vagal yolla gelen beslenme ile ilgili afferent sinyaller NTS üzerinden iletilir [37]. NTS’de ayrıca, kan şekeriindeki değişimlere ve sindirim sisteminde besin bulunup bulunmamasına göre cevap veren glukoz duyarlı nöronlar bulunmaktadır [48]. DMN ise; sindirim sistemi motilitesini ve özellikle de sindirim için önemli olan sekretuar cevapları kontrol eden motor nöronları içerir. DMN ayrıca, sindirim sisteminin besin alımına ve sonraki sindirim sürecine hazırlanması için gerekli olan sefalik faz cevaplarının başlatılmasından da sorumludur [49]. Area postrema ise; dorsal vagal kompleks ile bağlantılı, sindirim sistemi peptidleri, glukoz gibi dolaşımdaki sistemik faktörlerin beyine girişinin sağlandığı bölgedir [3].

Her ne kadar dorsal vagal kompleks içerisinde oreksin içeren sinir terminalleri tarafından innerve edilen nöron tipleri henüz tanımlanamamış olsa da, oreksinlerin vagal motor nöronların aktivitesini değiştirdiği ve/veya NTS nöronlarının gastrointestinal uyarılara verdikleri yanıtları kontrol ettikleri düşünülebilir. LHA’nın stimülasyonu ile DMN’deki nöronların uyarıldığı ve vagal afferentlerin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir [3]. Böylece vagal aktivitenin oreksinler tarafından kontrolünün sefalik faz reflekslerini ve/veya mide-bağı

rsak motilitesini ve sekresyonunu etkilediği ön görülebilir. Ayrıca, NTS'deki nöronlar LHA'ya geri projekte olduğu için oreksin nöronlarının NTS üzerinden yayılan tokluk sinyallerince düzenleniyor olduğu düşünülebilir [3].

2.3. Oreksin Reseptörlerinin Özellikleri

Sakurai ve ark. tarafından oreksinlerin yapısı ve her iki peptide ait reseptörlerin amino asit sekansları gösterilmiştir [26]. OX1R olarak adlandırılan orjinal HFGAN72 reseptörünün OXA'ya yüksek afinite ile OXB'ye ise 100-1000 kat daha düşük bir afiniteyle bağlandığı, diğer bir reseptör olan OX2R'nin her iki peptide de eşit oranda yüksek afinite gösterdiği bulunmuştur. Her iki ligandın reseptörlerden herhangi birine bağlanması sonucu hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun $[Ca^{+2}]$ i arttırdığı tespit edilmiştir. Reseptör içeren hücrelerle yapılan çalışmalara göre, OX1R yalnızca G proteinlerinin Gq alt sınıfı ile OX2R ise Gi/Go ve/veya Gq ile eşleşmektedir [26, 36, 44].

2.4. Oreksin Reseptörlerinin Dağılımı

2.4.1. Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı

Hipotalamus içerisinde OX1R mRNA'sının en fazla olduğu bölge ventromedyal hipotalamik nukleusun (VMH) dorsomedyal kısmıdır. OX1R'ın yoğun ekspresyonu aynı zamanda suprakiazmatik nukleusun dorsalindeki anterior hipotalamik bölgede de görülmektedir. Tersine, OX2R mRNA'sı, tüberomamiller nukleus, LHA, arkuat nukleus ve PVN'yi içeren çok sayıda hipotalamik bölgede eksprese olmaktadır [50, 51]. Tüberomamiller nukleus MSS'deki tek histamin kaynağıdır. Histamin uyanıklığın sağlanması için önemli olduğundan, bu bölgedeki OX2R'ın uyku/uyanıklık regülasyonunda rol oynadığı öne sürülebilir [51].

Oreksin reseptörlerinin VMH, LHA, arkuat nucleus ve PVN'de ekspresyonu, hipotalamik oreksin sistemlerinin besin alımındaki rolüyle uyumludur. VMH'nin besin alımının düzenlenmesiyle yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu bölgenin zarar görmesi obeziteye yol açar. PVN, NPY ve galanin gibi birçok oreksinergik ajanın etkinlik bölgesidir [45]. PVN aynı zamanda dorsal vagal komplekse uzanan projeksiyonu yoluyla sindirim sistemi fonksiyonlarının regülasyonunda da rol oynamaktadır [52].

NTS ve DMN'nin yoğun sayılabilecek oreksin innervasyonları aldıkları bilinmektedir [27, 36] fakat bu bölgelerde az miktarlarda oreksin reseptör mRNA'sı tespit edilebilmiştir [51]. Yoğun oreksin immünoreaktivitesine karşın az miktarda reseptör mRNA'sı içeren bölgeler, hücreleri uzak konumlarda yerleşmiş olan akson terminallerinin presinaptik innervasyonunu gösteriyor olabilir [44]. Yakın zamanlı bir bulgu da OXA'nın DMN'deki presinaptik etkilerini desteklemektedir [3]. Bununla birlikte, DMN nöronları üzerinde OX1R aracılı postsinaptik etkilerin varlığı da gösterilmiştir ve bu etkilerin merkezi OXA'nın mide motilitesi üzerindeki stimülatör işlevine aracılık ettiği bilinmektedir [3].

Göreceli olarak yoğun OX1R ekspresyonu görülen diğer beyin bölgeleri arasında hipokampusun CA1 ve CA2 bölgeleri, raphe nukleusu ve locus coeruleus da bulunmaktadır [50, 51, 53, 54]. Locus coeruleus ve dorsal/medyan raphe nukleusu

sırasıyla noradrenerjik ve serotonerjik nöronların en önemli merkezleridir. Bu nükleuslardaki yüksek OX1R seviyesi, oreksinlerin monoaminerjik sistemler üzerindeki düzenleyici etkilerine işaret eder. Diğer taraftan, OX2R mRNA'sı da hafıza ve dikkat gibi fonksiyonlarla ilişkili olan bazal ön beyin yapılarında ve nükleus accumbens'de görülmektedir [50, 51, 53, 54]. Nükleus accumbens, mezolimbik dopaminerjik projeksiyonun en önemli alıcısıdır ve beyin ödül mekanizmasında önemli bir role sahiptir.

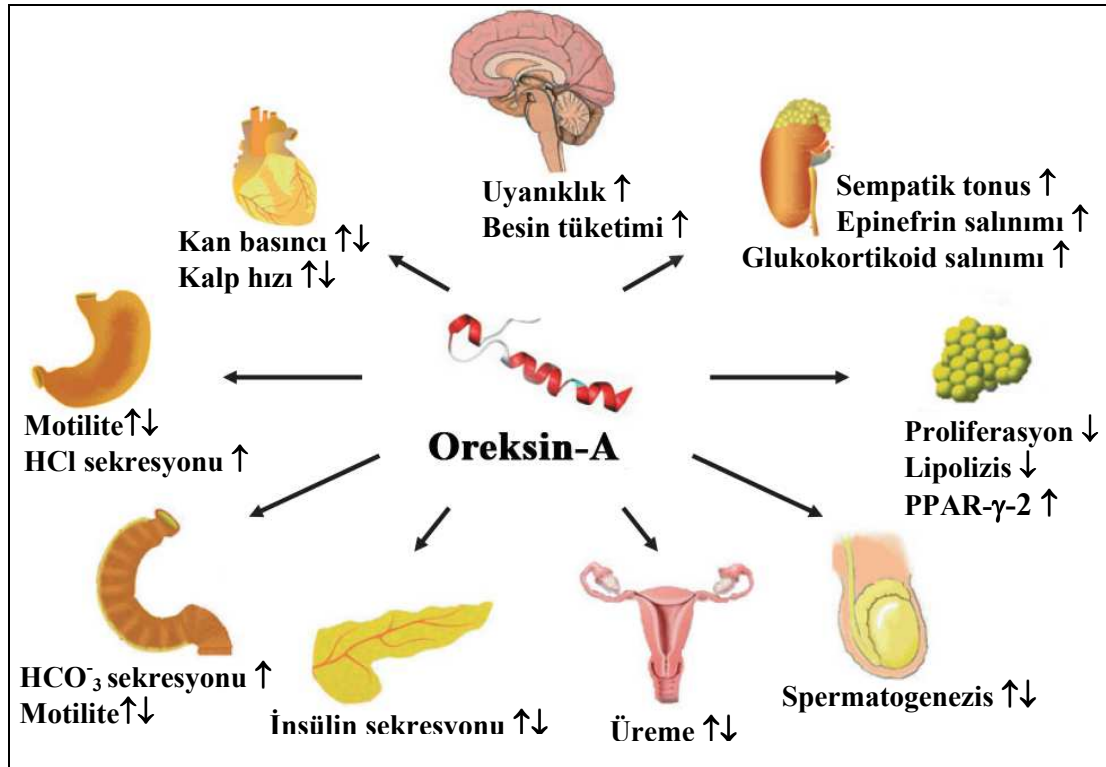
2.4.2. Oreksin Reseptörlerinin Periferdeki Dağılımı

Oreksinler ve reseptörleri merkezi sinir sisteminin dışında mide, bağırsak, pankreas, adrenal bezler, böbrek, yağ dokusu, dişi ve erkek genital sistem, kalp, akciğer ve tiroid bezi gibi pek çok farklı dokuda tespit edilmiştir [3, 55].

Sindirim sisteminde OX1R, sıçan midesinin korpus bölgesinde submukozal ve myenterik plexus nöronlarında ve mukozada tespit edilirken, OX2R ise enteroendokrin hücrelerde gösterilmiştir [3, 10, 56]. Sıçanlarda OX1R vagal afferent liflerde; insanlarda ise OX1R ve OX2R noduz gangliyon (NG) üzerinde gösterilmiştir [55].

2.5. Oreksinlerin Fizyolojik Etkileri

Öncelikli etkisi uyku-uyanıklığın düzenlenmesi ve beslenme üzerine olan oreksinlerin, enerji dengesi, nöroendokrin düzenleme, gastrointestinal ve kardiyovasküler sistem kontrolü, su dengesi ve ağrı iletiminde de etkili olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.1.) [57].



Şekil 2.1. OXA'nın Santral ve Periferel Dokulardaki Fonksiyonları [55].

Oreksinerjik hücrelerin yerleşimi ve projeksiyonları, farklı fizyolojik fonksiyonlar üzerine doğrudan ve dolaylı olarak düzenleyici etkilerinin olmasını sağlar. Bu karmaşık düzen oreksinlerin etki şekillerinin ayırt edilmesinde güçlük yaratmaktadır [58].

2.5.1. Oreksinlerin Besin Alımı ve Uyku Üzerine Etkileri

Sakurai ve ark. [26] öncelikli olarak oreksinlerin beslenme davranışı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bunun nedeni, preprooreksin mRNA'sının besin alımı ve metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynayan LHA bölgesinde bol miktarda eksprese olmasıdır [3, 29]. Anand ve Brobeck LHA'yı, bu alandaki lezyonlar besin alımında önemli azalışa neden olduğu için "beslenme merkezi" olarak adlandırmışlardır [59]. LHA'nın elektriksel stimülasyonu aşırı besin alımına yol açar ve kilo artışıyla sonlanır [29]. Bu durum, stimülasyonun LHA içerisinde veya civarında oluşan oreksinerjik yolları aktive ettiğini düşündürmektedir.

Sakurai ve ark. [26] sıçanlarda OXA ya da OXB'nin intraserebroventriküler olarak uygulanmasının doza bağımlı bir şekilde besin alımını artırdığını ve OXA'nın OXB'ye kıyasla daha etkin olduğunu göstermişlerdir [26]. Bu bulgular ışığında, oreksinler, Yunanca'da iştah anlamına gelen "orexis" kelimesinden esinlenerek isimlendirilmiştir [26]. Daha sonra, OXA'nın bazı türlerde (Japon balığı gibi) besin alımını artırdığı [30, 31, 36, 60] ve bu fonksiyonun PVN, dorsomedyal hipotalamik nukleus, LHA ve perifornikal bölge gibi çeşitli hipotalamik bölgelerle ilgili olduğu gösterilmiştir [32, 35, 36]. Ek olarak Yamada ve ark. [33], sıçanlarda bir antioreksin-A antikorunun merkezi enjeksiyonu sonucunda doğal beslenme davranışının inhibe olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, seçici bir OX1R antagonisti olan SB-334867-A'nın birkaç gün boyunca spontan gece beslenmesini ve OXA'nın indüklediği beslenmeyi inhibe ettiği, bunun yanında bir gecelik açlığın stimüle ettiği beslenmeyi de (ilk 4 saat boyunca) [61, 62] baskıladığı gösterilmiştir.

OXA'nın aksine OXB ile elde edilen bulgular daha değişkendir: dolayısıyla OXB'nin beslenme davranışları üzerinde az miktarda etkisi olduğu düşünülmektedir [30-32, 63]. OX2R mutant köpeklerde gözlemlenemeyen belirgin beslenme davranışı bozuklukları da bu çıkarımı desteklemektedir [64].

İntraserebroventriküler olarak uygulanan oreksinlerin besin alımı üzerindeki etkileri diğer hipotalamik oreksinerjik peptidlerle karşılaştırılmış ve OXA'nın besin alımı üzerine etkisinin NPY'ye kıyasla daha az olduğu gösterilmiştir [30, 45]. Ek olarak, NPY'nin aksine, OXA'nın kronik uygulanması normal sıçanlarda obeziteye neden olmamaktadır [65]. Bununla birlikte bu etkinin süresi NPY'nin etkisine kıyasla daha uzundur [26] ve oreksinlerin yarattığı etkinin büyüklüğü melanin konsantrite edici hormon (MCH) ve galanin gibi diğer hipotalamik iştah artırıcı peptidlerin etkilerine benzer bulunmuştur [30]. Dolayısıyla oreksinlerin vücut ağırlığının uzun süreli korunmasından çok beslenmenin kısa süreli düzenlenmesinde katkılarının olduğu görülmektedir.

OXA, besin alımını, davranışsal doygunluğu geciktirerek artırmaktadır [60]. Ek olarak, birkaç gün süresince OXA'nın kronik intraserebroventriküler infüzyonu neticesinde bu peptidin sıçanlarda görülen normal sirkadiyen beslenme davranışını

da gün içi yemek alımını artırıp gece alımını azaltarak bozduğu görülmektedir [46, 61, 63, 65]. Oreksinlerin metabolik etkilerinin de sirkadiyen faza bağımlı olduğu görülmüştür [66]. İlginç bir şekilde, normal sirkadiyen beslenme düzeninin bozulması, LHA lezyonlarının iyi açıklanabilmiş etkilerindendir. Ayrıca LHA'nın uykunun düzenlenmesindeki rolü de ortaya konmuştur [29]. Bütün bunlar düşünüldüğünde artan uyarılma halinin veya uzayan uyanıklık durumunun, sürekli OXA infüzyonu uygulanan sıçanlarda OXA tarafından stimüle edilen besin alımını etkilediği düşünülebilir.

Oreksin nöronları uyanıklığı sağlayan beyin bölgelerini innerve edip aktif hale getirirler. Bu bölgelerden biri locus coeruleus diğeri de tüberomamiller nukleustur [35, 36]. In vitro OXA uygulaması histaminerjik nöronların ateşlenme hızını artırır ve REM uykusunu doza bağımlı şekilde baskılar [67]. Bunun yanında, oreksin knockout farelerde narkolepsi benzeri bir fenotip gözlenmektedir [68]. Aynı benzerlik OX2R geninde mutasyon görülen köpeklerde de gözlenmiştir [64]. Narkolepsi aşırı gündüz uykusu ve gün boyu şekillenen karşı konulması güç uyku atakları ile karakterize bir hastalıktır. Diğer sık gözlenen belirtisi ise katapleksi, uyku paralizisi ve halüsinasyonlardır. Bu bulgular oreksinlerin beslenme ve enerji dengesi açısından öneminin yanında uyanıklığı da düzenlediğini işaret etmektedir. Bu sonuç oldukça önemlidir çünkü beslenmenin azalması durumunda böyle bir alarm mekanizmasının olması hayatta kalımı sağlar. Bu durumlarda besin arama içgüdüsünün uykuya dalmaktan daha önemli olacağı açıktır.

2.5.2. Oreksinlerin Nöro-Endokrin Etkileri

Oreksinler ve reseptörleri çeşitli nöroendokrin hücrelerde tanımlanmış olup, mide bağırsak mukozasındaki ve pankreastaki endokrin hücreler, adrenal bezlerdeki medullar hücreler, hipofiz hücreleri ve epidermisteki markel hücreleri bunlara örnek olarak verilebilir [69]. Oreksinlerin nöroendokrin etkilerine plazma prolaktin ve büyüme hormon seviyelerini düşürmesi, kortikotropin, kortizol, insülin ve luteinizan hormon [70] seviyelerini yükseltmesi örnek olarak sayılabilir [57].

Oreksinlerin, hipotalamustan salınan birçok hormon üzerine doğrudan etki gösterdiği gibi hipotalamo-hipofizer hormon salınımını da bazı sinirsel devreler aracılığıyla indirekt olarak etkilediği düşünülmektedir [58]. Oreksin reseptörlerinin her ikisi de nöroendokrin düzenleme ile ilgili bölgelerde eksprese edilirler. Oreksinler median eminens'de, reseptörlerinin mRNA'ları ise hipofizin ön ve ara loblarında gösterilmiştir. Oreksinerjik sinir lifleri hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) ekseninde etkili alanları innerve etmektedir. Hipotalamustaki OXA liflerinin HPG eksenini ile ilgili septal preoptik nukleus, ARC ve median eminence bölgelerine projeksiyonları vardır. Oreksinerjik nöronlar ayrıca seksüel davranışların kontrol edildiği amigdala ve olfactory bulbus bölgelerini de innerve ederler [58, 71]. Adenohipofizdeki asidofilik hücrelerde büyüme hormonu ve OX1R'nin, bazofilik hücrelerde ise adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve OX2R'nin birlikte eksprese edildiği gösterilmiştir [72].

OXA'nın sıçanlarda intravenöz ve hipotalamusa mikroenjeksiyon yolu ile uygulanması, plazmada tiroid uyarıcı hormon (TSH) ve hipotalamik tiotropin serbestleştirici hormon (TRH) seviyelerini düşürürken, plazmadaki tiroid hormon

düzeyini etkilememiştir. OXA'nın bu etkisinin hipofiz hücre kültüründe in vitro olarak tekrar edilememesi OXA'nın TSH'a etkisinin TRH üzerinden olduğunu ortaya koymuştur [73].

Oreksinerjik sistem, organizmada strese de aracılık etmekte olup strese maruz kalınan durumlarda hipotalamustaki oreksinerjik nöron aktivitesinin [74] ve serebrospinal sıvıda (CSF) OXA konsantrasyonunun arttığı [75] bildirilmiştir. Öte yandan OXA'nın sıçanlarda intraserebroventriküler uygulaması HPA'yı aktive ederek plazmada kortikotropin salgılatıcı hormon (CRF), ACTH, kortikosteron ve epinefrin seviyelerini arttırmaktadır [74, 76].

2.5.3.Oreksinlerin Enerji Metabolizması Üzerine Etkileri

Oreksin nöronları, enerji kaynaklarının mevcut durumuna ilişkin bilgiler sunan çeşitli metabolik sinyallere cevap verirler. Hipotalamik preprooreksin mRNA düzeyi, 48 saatlik açlıktan ve insülinin indüklediği akut (6 saat) hipoglisemiden sonra önemli bir artış göstermektedir [26, 34, 77]. Dolayısıyla bu nöronlar açlık durumunda aktive olmaktadır. Cai ve ark. düşük plazma glukoz düzeyi ve/veya sindirim sisteminde besin yokluğu gibi durumların oreksin nöronlarını stimüle ettiğini ve oreksinlerin kısa dönem beslenme davranışları üzerine etkili olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca Cai ve ark., oreksin nöronlarının; LHA nöronlarının, serum glukoz düzeyinin düşmesiyle stimüle olan ve NTS aracılığıyla vagal olarak iletilen tokluk sinyalleri ile inhibe edilebilen bir alt kümesi olabileceğini ileri sürmüşlerdir [77].

Kan glukoz düzeyinin azalması ile besin alımını başlatıcı sinyalin üretildiği iyi bilinmektedir [78]. Birçok insan ve sürüngen denekte kan glukoz düzeyinin öğünlerden önce en düşük noktasına geldiği bilinmektedir. Mayer'in glukostatik beslenme teorisine göre [79] yeme davranışı glukoz düzeyini sürdürebilmek amacıyla şekillenir. LHA "glukoza duyarlı" nöronlar içerir ve bu nöronlar hipoglisemi ile aktif hale geçer ve artan kan glukozuyla da baskılanırlar. Glukoza duyarlı nöronlar tüm LHA nöronlarının yaklaşık %25'i kadardır [78]; dolayısıyla oreksin içeren nöronların en azından bir kısmının glukoza duyarlı olduğu düşünülebilir. Yakın zamanlı çalışmalar da bu kanıyı desteklemektedir. İnsüline bağlı hipoglisemi sırasında oreksin-immünoreaktif nöronların yaklaşık %30'unun sinirsel aktivasyonun bir işareti olan Fos-benzeri immünoreaktivite gösterdiği gösterilmiştir [80]. Ayrıca Shiraishi ve ark. [81] test ettikleri glukoza duyarlı LHA nöronlarının yaklaşık %67'sinde OXA'nın ani deşarj artışına neden olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla glukoza duyarlı hücreler eksitator oreksin reseptörleri eksprese ederler. Ayrıca OXA, VMH'de bulunan glukoza duyarlı nöronların aktivitesini inhibe eder. Glukoza duyarlı nöronlar glukoz tarafından uyarılırlar ve bu hücrelerin stimülasyonunun yemeyi sona erdirmeye katkısının olduğu öngörülmektedir. Oreksinlerin glukoza duyarlı ve glukoza hassas hipotalamik nöronlar üzerindeki zıt etkileri, LHA ve VHM'nin besin alımının düzenlenmesindeki antagonistik rolleri ile uyumludur [3].

2.6. Sindirim Sisteminde Oreksinler ve Etkileri

ESS'de oreksin immünoreaktivitesi gösteren nöronlar ve enteroendokrin hücreler, PCR ve immünohistokimyasal çalışmalar ışığında gösterilmiştir [3]. Preprooreksin, OXA, OXB ve reseptörleri fare, sıçan, kobay ve insanda myenterik ve submukozal pleksuslarda, enteroendokrin hücrelerde saptanmıştır [4, 10, 82, 83].

Oreksinlerin, sekretomotor nöronların elektriksel özelliklerini etkilediği ve kolonik motilitenin düzenlenmesine katkısı olduğu ortaya çıkarılmıştır [3].

OXA immünoreaktivitesi kobay midesinin antrum bölgesinde gastrin ile birlikte [4] ve fare midesinin pilor bölgesinde gösterilmiş, OXB aktivitesi ise saptanamamıştır [84]. ESS’de OX1R immünoreaktivitesi myenterik ve submukozal pleksuslarda, sirküler ve longitudinal kas liflerinde ve mukozada saptanmıştır. Bunun yanı sıra OX2R, enterokromafin (EC) hücrelerde gösterilmiştir [10].

2.6.1. Oreksinlerin Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkileri

LH’nin beslenme davranışlarının yanı sıra, mide sekresyonunun merkezi düzenlenmesine de katkılarının olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir [85]. OXA’nın intrasisternal enjeksiyonu, mide sıvılarının hacmini artırmış ve pilor ligasyonu yapılan sıçanlarda mide asit üretiminin doza bağımlı şekilde stimüle olduğu gözlenmiştir. Bunun aksine, OXA’nın intraperitoneal olarak uygulanması mide sekresyonunu stimüle etmemiş ve böylece OXA’nın mide asit sekresyonunu stimüle edici etkisinin MSS üzerinden gerçekleştiği öne sürülmüştür [8]. Sakurai ve ark.’nın çalışmasında kullanılan ve asit sekresyonunu stimüle edebilen dozlar, sıçanlarda besin alımını stimüle etmek için kullanılan dozlara eşit veya daha düşük dozlardır [26]. Hem besin alımını hem de mide sekresyonunu stimüle edebilen dozların birbirine yakın olduğu bulgusu dikkate alındığında OXA ile oluşan bu iki cevabın da ortak bir mekanizma ile tetiklendiği düşünülebilir. LH’nin elektriksel stimülasyonu mide asit sekresyonunu artırır. Önceki çalışmalarda, LH lezyonlarının veya LH’ye anestezi uygulanmasının, hipoglisemik ajanların periferik uygulamaları ile artan mide asit sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir [3]. Dolayısıyla LH asit sekresyonunda kritik bir görev üstlenir. Bu asit sekresyonu cevabı özellikle de açlık duyusuna cevaben ortaya çıkar ve açlık duyusu da büyük olasılıkla azalmış glukoz düzeyince indüklenmektedir [86]. Bununla birlikte, LH nöronlarının mide asit üretimini moleküller/nörotransmitter bazda nasıl artırdığına ilişkin mekanizmalarla ilgili bilgi oldukça azdır. Oreksin içeren nöronların LH bölgesinde ve komşu alanlardaki lokalizasyonu ve mide asidinin merkezi OXA ile stimülasyonu düşünülecek olursa, LH nöronlarının terminal sinir sonlanmalarından salınan OXA’nın asit sekresyonunu stimüle ettiği düşünülmektedir. Dolayısıyla OXA, LH nöronlarından ortaya çıkan bir efferent sinyal gibi işlev görerek mide asit sekresyonunu artırıyor olabilir.

Mide asit sekresyonunun stimülasyonu, OXA’nın intrasisternal enjeksiyonu ile görüldüğü halde OXB enjeksiyonu aynı etkiyi göstermez. Yani OXA, asit sekresyonunu özel bir şekilde stimüle etmektedir. Oreksin reseptörlerinin özelliklerine bakıldığında, OX1R, OXA için seçici iken; OX2R’nin her iki oreksin tipine afinitesi vardır. Bu bilgi ışığında; OXB’nin değil de OXA’nın merkezi yönetiminin asit sekresyonunu stimüle ediyor olduğu bulgusu [8]; OXA’nın neden olduğu asit sekresyonunda OX1R’in aracı olabileceğini gösterir. OXA’nın mide asit sekresyonunu stimüle ettiği yapı-aktivite ilişkisini daha da iyi ortaya çıkarabilmek için, modifiye edilmiş disülfid bağları olan OXA ile ilişkili peptidler [OXA (15-33)] oluşturulmuştur. Bu peptidlerin in vitro reseptör aktivasyonundaki rolleri veya in vivo asit sekresyonundaki stimülator etkileri değerlendirilmiştir. Pilor ligasyonu yapılan bilinci açık sıçanlarda OXA’nın intrasisternal enjeksiyonu mide asit sekresyonunu stimüle ederken, iki disülfid bağına sahip olmayan OXB için benzer

etki gözlenmemiştir. OX1R ve OX2R eksprese eden CHO-K1 hücrelerinde oreksine bağlı kalsiyum artışı ölçülmüştür. OXA, OXB ve OXA (15-33)'ün EC50 değerleri sırasıyla 0,068, 0,69, ve 4,1 nM olarak bulunmuştur ve bu da disülfid bağları içermeyen peptidlerin OX1R için daha düşük bağlanma potansiyelleri olduğunu göstermektedir. Bu üç oreksin analogunun bir veya iki disülfid bağının modifikasyonu sonucunda OX1R için ölçülen agonistik aktiviteleri, OXA'ninkine kıyasla önemli düzeyde azalmıştır. OX2R için OXA ve OXB'nin EC50 değerleri neredeyse eşittir fakat OXA (15-33) için ölçülen potansiyeller, OXA'ninkine kıyasla daha düşüktür. Mide asit üretimi ile OX1R için EC50 değeri arasında gözlenen zıt ilişki OX2R için tespit edilememiştir. Bu sonuçlara bakılarak OXA'nın indüklediği asit stimülasyonu için OX1R aktivasyonunun gerektiği ve OXA'daki disülfid bağlarının reseptör aktivasyonu için anahtar bir role sahip olduğu söylenebilir [86].

2.6.2. Beyinde Asit Sekresyonunun Stimüle Edildiği Bölge Olarak Dorsal Motor Nukleus

Mideyi vagus siniri yoluyla innerve eden hücreler medulla oblongatadaki DMN üzerinde yerleşmişlerdir [86]. İntrasisternal olarak enjekte edilen OXA'nın asit üretimini artırıcı etkisi N. vagus aracılıdır [8]. Dolayısıyla, OXA'nın sisterna magna'ya enjekte edilmesiyle akson terminallerini mideye projekte eden DMN sinirlerinin aktive edilebileceği düşünülmektedir. Her ne kadar oreksin-immünoreaktif nöronlar hipotalamus'da yerleşmiş olsalar da [26], oreksin-immünoreaktif lifler DMN bölgesi de dâhil olmak üzere merkezi sinir sistemine dağılmış haldedirler [28, 33, 41]. Oreksin-immünoreaktif liflerin DMN'de varlığının gösterilmiş olması ve DMN nöronlarının LH nöronlarının akson terminallerini alıyor olması göz önünde bulundurulursa, intrasisternal olarak enjekte edilen OXA'nın asit üretimini başlattığı esas etkinlik bölgesinin DMN nöronları olduğu hipotezi kuvvet kazanır [86]. İmmünohistokimyasal çalışmalar, sıçanlardaki DMN nöronlarının birçoğunun oreksin reseptörlerini eksprese ettiğini göstermektedir. OX1R, OX2R'ye oranla daha çok üretilir [87]. Ek olarak, Krowicki ve ark. [87] OX1R'nin en çok mideyi innerve eden pregangliyonik vagal motor nöronlarda eksprese olduğunu göstermişlerdir. OXA mideyi innerve eden DMN nöronlarında OX1R'ye bağlanma yeteneğine sahiptir. Bunun da ötesinde, sıçan medulla kesitlerinden alınan kayıtlar göstermiştir ki oreksin bir kısım DMN nöronunu doğrudan depolarize etmektedir. Bu depolarize edilen nöronlar arasında pregangliyonik parasempatik bazı nöronlar da bulunmaktadır [88]. Grabauskas ve Moises'in çalışmalarında [89] sıçan beyin sapı kesitlerinden elde edilen DMN nöronlarına ait tüm hücre kayıtlarında oreksinlerin tercihen DMN içerisinde işlev görerek mideye projekte olan DMN nöronlarını doğrudan uyardığı gösterilmiştir. Bu elektrofizyolojik bulgular, yukarıda değinilen nöroanatomik kanıtlar ve farmakolojik çalışmaların sonuçları birlikte düşünüldüğünde, hipotalamik projeksiyon ile DMN içerisine ulaşan endojen OXA'nın, OX1R'yi aktive ederek vagal akışı stimüle ettiği ve midede asit üretimi artırdığı ortaya çıkar.

2.6.3. Endojen Oreksin-A'nın Asit Sekresyonu Üzerine Etkileri

Spesifik bir OX1R antagonisti olan SB334867'nin [62, 90, 91] intraperitoneal olarak uygulanması sonucu pilor ligasyonu yapılan sıçanlarda mide asit sekresyonunu etkilemediği, fakat intrasisternal olarak uygulanan OXA'nın neden olduğu asit üretimini tamamen bloke ettiği gösterilmiştir [92]. Vagal yolağın merkezi aktivasyonu için kullanılan 2-Deoksi-D-glikoz (2-DG) periferik olarak uygulandı-

ğında özellikle hipotalamusta işlev görerek vagal tonusu artırıp mide asit sekresyonunu stimüle etmektedir [86]. Mide asit üretiminin 2-DG tarafından stimülasyonu, intraperitoneal SB334867 uygulaması ile önemli oranda bloke edilebilmektedir. Bu da beyinde endojen olarak salgılanan OXA'nın, mide asit sekresyonunun merkezi düzenlenmesinde kritik bir rolü olduğunu ve OX1R'nin endojen olarak salınan OXA tarafından gerçekleştirilen asit stimülasyonunda katkısının olduğunu göstermektedir. Bazı çalışmalarda hipogliseminin OXA nöronlarını aktive ettiği gösterilmiştir. Cai ve ark. [80], insülinin neden olduğu hipogliseminin sıçanların LH bölgesindeki OXA nöronlarında c-fos ekspresyonunu stimüle ettiğini göstermişlerdir. c-fos ekspresyonuna ilişkin bu çalışmaların bulguları, 2-DG'nin hipotalamik OXA sistemini aktive ettiği ve bunu takiben de vagal sistem yoluyla mide sekresyonunun stimüle olduğu yönündeki hipotezleri destekler niteliktedir.

Bu bulgular, OXA'nın beyinde sefalik faz stimülasyonunu (besin alımı ve uygun hazırlayıcı sekretuar cevapların üretilmesi gibi) tetikleyen en önemli moleküllerden biri olduğu yönündeki hipotezi destekleyici niteliktedir.

2.6.4. Oreksin-A'nın Mide Motilitesi Üzerine Etkisi

Birçok çalışmada merkezi olarak enjekte edilen oreksinin mide motilitesini değiştirdiği gösterilmiştir. Kobashi ve ark. [93] sıçanlarda intrasisternal OXA uygulamasının mide motilitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve oreksinin 30 dakikadan fazla süreyle mide gevşemesine neden olduğunu bulmuşlardır. Distal midedeki fazik kontraksiyonlar da oreksine cevap olarak kolaylaşmıştır, fakat vagotomi uygulanan hayvanların distal midelerinde bu etki gözlenmemiştir. Vagotomi uygulanan hayvanların proksimal midelerinde gevşeme gözlenmekle birlikte bu gevşemenin miktarı müdahale edilmemiş hayvanlara kıyasla anlamlı ölçüde düşük gerçekleşmiştir. Bu bulgu, merkezi oreksinin distal mide motilitesini ve proksimal midedeki gevşemeyi vagus siniri aracılığıyla kolaylaştırdığını işaret eder [93]. Her ne kadar beslenme esnasında proksimal midede gevşeme ve distal midede motilite artışı görülüyor olsa da, merkezi OXA'nın uyardığı mide motilite değişimleri göz önüne alındığında, beslenme sırasında OXA'nın mide-bağırsak motilitesinin koordinasyonunda işlev görmekte olduğu düşünülebilir. Bu açıdan bakıldığında, yukarıda da tarif edildiği gibi OXA, sefalik-faz stimülasyonda önemli rol oynayan tetikleyici bir moleküldür. Ek olarak Krowicki ve ark. [87] sıçanlarda DMN bölgesine oreksinin mikroenjeksiyonunun mide içi basıncı ve antral motiliteyi artırdığını göstermişlerdir ve bu bulgu DMN'deki oreksinlerin mide motor fonksiyonlarını stimüle ettiğinin bir göstergesidir.

2.6.5. Oreksin-A'nın Mide Korunması Üzerine Etkisi

OXA'nın intrasisternal enjeksiyonu, %70'lik etanolün sebep olduğu mukozal hasarın boyutunu doza bağımlı bir şekilde azaltmaktadır. Bu etkinin OXA'nın intraperitoneal enjeksiyonu ile gözlenmemiş olması, OXA'nın mide mukozal hasarını merkezi etki göstererek engellediğini göstermektedir [24]. Sıçanlarda görülen bu koruyucu etki OXB için gösterilememiştir. Merkezi OXA'nın mideyi koruyucu etkisi, atropin, N^w -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) veya indometazin ile gerçekleştirilen ön tedavi ile engellenmektedir. Bu bulgu OXA'nın beyinde OX1R yoluyla etki göstererek, vagal muskarinik sistem, NO ve PG yolları üzerinden etanole karşı koruyucu rol üstlendiğini göstermektedir. NO'nun oreksin yolağında rol aldığı önce-

ki çalışmalarda gösterilmiştir. Farr ve ark. [25] L-NAME'in s.c. enjeksiyonunun, sıçanlarda OXA'nın neden olduğu besin alımı artışını bloke ettiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde NOS knockout farelerde OXA, besin alımı artışını sağlayamamıştır. Araştırmacılar ayrıca L-NAME'in hipotalamusdaki NOS aktivitesini yüksek oranda inhibe ettiğini göstermişlerdir ve bu bulgu da beyindeki NO'nun OXA'ya bağlı besin tüketiminde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Ek olarak, Zheng ve ark. yaptıkları araştırmada [94] hipotalamik oreksin nöronlarının %20'ye yakın bir kısmının dorsal vagal komplekse projekte olduğunu ve hatta bir kısmının NOS-immünoreaktif nöronlara anatomik yakınlıkta olduğunu göstermişlerdir. Beyindeki NO'nun, mide-bağırsak fonksiyonlarının OXA aracılı merkezi düzenlenmesinde vagal sistem yoluyla işlev gördüğünü düşündürmektedir.

Kendi grubumuzun yaptığı çalışmada da OXA infüzyonunun, I/R uygulamasıyla oluşan mide mukozal hasarını azalttığı ve nötrofil infiltrasyonunu ve lipid peroksidasyonunu azaltarak mukozal korunmaya katkısı olduğu gösterilmiştir [95].

2.7. İskemi/Reperfüzyon

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesi veya durması sonucu, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin uzaklaştırılamamasına iskemi denir. Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır [96].

İskemi tek başına doku hasarına sebep olur, ancak asıl hasar iskemik dokunun hücre canlılığını ve fonksiyonunu korumaya yönelik olarak yeniden kanlanması durumunda oluşur. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan ROS, dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir [96]. Bir dokuda iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır.

Akut mezenterik iskemi, çeşitli yanıklar, hemorajik, travmatik ya da septik şok sonrasında, ROS ve proteazların üretimi ve nötrofillerin, nötrofil–endotelial hücre etkileşimlerini takiben intestinal mukozada birikmeleri sonucu I/R hasarı oluşur [97]. İskemik dokuya nötrofil geçişi iskemiden sonra ilk 12-24 saat içinde gözlenir. Bu sürenin sonunda nötrofiller yerini yavaş yavaş makrofajlara bırakırlar. Bununla beraber, iskeminin ardından reperfüzyon da gerçekleşirse, lökosit birikimi iskemik alanda kan akımı arttığı için daha hızlı olur [70].

I/R hasarı, kalp, beyin, karaciğer, böbrek ve gibi oksijene bağımlı doku hücrelerini, organları önemli ölçüde etkiler. Organ naklini takiben gelişen fonksiyon bozukluğunun ana sebebi olarak da I/R hasarı gösterilmektedir. Bu hasar nakledilmiş organın uzun süre yaşama durumunu kısıtlar [98]. I/R'nin görülme sıklığına bağlı olarak mezenterik kan damarlarında meydana gelen I/R sonucu, genellikle akut vasküler yetmezlik ve çoklu organ yetmezliği gelişir [99].

I/R hasarının oluşum mekanizmasında çeşitli faktörlerin etkili olduğu öne sürölmüştür. Bunlar arasında, proteazların ve fosfolipazların aktivasyonu, $[Ca^{2+}]_i$ 'da değişim, ATP yokluğu, serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarı, pro ve anti-inflamatuar sitokin yapımındaki dengenin pro-inflamatuar sitokinler yönüne kayması, kemokinler, aktif immün sistem hücreleri bulunmaktadır [100].

2.7.1. İşkemi Fazında Hasar Oluşumu

İşkemik fazda oksijene bağımlı olan hücrelerin (kardiyomiyositler, nöronlar, hepatositler, renal tübüler hücreler, bağırsak epitel hücreleri) oksijensiz kalması bu hücreleri ağır bir şekilde etkiler [98]. İşkemi sonucunda dokunun tek enerji kaynağı anaerobik metabolizmadır. Bu sebeple doku hipokside kalırsa, hipoksik doku hasarı ortaya çıkar [98]. Hasar oluşumu, mitokondriyal enerji yapımının (oksidatif fosforilasyonun) azalması ve hücresel enerjinin düşmesi sonucu gerçekteşen bir seri olaylar dizisidir [98]. Doğrudan ya da dolaylı olarak meydana gelen enerji yokluğu, hücre içinde hücresel iyon homeostazisinin bozulması, hidrolazların aktivasyonu, hücresel membranların permeabilitelerinin artması gibi değişimlerin görölmesine sebep olur.

İşkemide sitozolik pH, ATP yokluğuna, glikolitik hızın artışına ve belki de hasarlı lizozomlardan serbestlenen H^+ iyonuna bağılı olarak düşer. Asidoz ile birlikte, makromolekül sentezinin durması, sitozolik Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının konsantrasyonunun artması ve iyon dengesinin bozulması, plazma permeabilitesinin artması, ATP yıkım ürünlerinin birikmesi, bu değişimlere paralel olarak sonunda, hücresel homeostazis bozulması görölür [98, 99].

Sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun artışı hücre içi fosfolipazlar gibi hidrolazları (özellikle fosfolipaz A_2 gibi) aktive eder. Aktive olan hidrolazlar substratlarını yıkmak suretiyle hasar oluşumunu hızlandırırlar (Ör. hücre içi Ca^{2+} ile aktive olan calpain, hücre iskeleti proteinlerinin yıkımına sebep olur). Artan hücresel Na^+ iyonu konsantrasyonu plazma membranının ayrılmasına sebep olan hücresel osmotik şişkinliğin oluşumuna sebep olur. Mitokondriyal membranda oluşan geçiş porları yüzünden permeabilite değişimi, mitokondriyal membran potansiyeli kaybına ve mitokondriyal matriksde Ca^{2+} birikimine sebep olur.

İşkemide gelişen bu olaylar, temelde reperfüzyonda oksijen ve kan ürünlerinin yeniden dokuya gelmesiyle oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumu için zemin hazırlamaktadır [101]. Reperfüzyonda çok çeşitli hücre, organel ve enzimler serbest radikal oluşturur. Bunlar arasında mitokondrial elektron transport zinciri, vasküler endotel, lökositlerin (nötrofil, lenfosit, monosit) aktivasyonu, plazma ve organel membranları, NOS aktivasyonu sayılabilir.

2.7.2. Reperfüzyon Fazında Hasar Oluşumu

Yapılan şalışmalarda, koroner arter tıkanması sonrasında eğer zamanında reperfüzyon uygulanırsa, bu uygulamanın hücreleri miyokardial nekrozisten koruduğu gösterilmiştir [99]. Bununla birlikte işkeminin süresine ve yoğunluğuna bağılı olarak oksijen yeniden dokulara geldiğinde, temelde oksijensizlik yüzünden oluşan doku hasarı daha da ağırlaşır. Reperfüzyonda hızlı oksijen radikali oluşumu hem sistemik hem de lokal hasar oluşumuna neden olur. Çeşitli hayvan türlerinde yapılan de-

neysel mezenterik I/R modelinde reperfüzyon fazında oluşan doku hasarı, iskemik fazda oluşan hasardan daha fazladır. Braunwald ve ark.'nın [102] çalışmasına göre miyokardiyal iskemide iskeminin süresi ile bağlantılı olarak koroner akımın yeniden sağlanması, hem nekrozisin önlenmesi hem de miyokardiyal hasarın yayılmasının önlenmesi açısından son derece etkilidir. Ancak, akımın yeniden sağlanması dokuda fonksiyonel metabolik ve yapısal değişimleri de beraberinde getirir [70]. I/R sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon ve arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozukluğu gelişir. Kapillerlerde lökosit tıkaçları oluşur, sıvı filtrasyonu artar. Postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına çıkması ve lökositlerin hareketliliği başlar. Mikrosirkülasyonun bütün segmentlerinde aktive olan endotel hücreleri daha fazla ROS ve daha az NO üretir. Endotel hücrelerinde süperoksit radikali ve NO arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınmalarına öncülük ederken adezyon moleküllerinin biyosentezini de artırır [103].

I/R, endotel ve farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimleri artırarak mikrovasküler hasara, hücrel nekroza ve/veya apoptozise neden olur. Splanik arterlerin tıkanması ve reperfüzyonun özellikle vasküler permeabiliteyi değiştirmesi, polimorfonükleer nötrofillerin (PMN) aktivasyon ve adezyonlarını sağlaması, pro-inflamatuvar maddelerin, nitrojen ve oksijen kökenli serbest radikallerin oluşumu nedeniyle dolaşımsal şoku hızlandırır [98].

İnce bağırsakta meydana gelen I/R, mukozal bariyerin bütünlüğünün bozulmasına, bakteriyel geçiş ve inflamatuvar cevabın oluşumuna sebep olur. Bakteriyel translokasyon, canlı bakterinin intestinal mukoza aracılığı ile mezenterik lenfatik nodlara, diğer organlara ve dokulara yayılmasıdır. Translokasyon süreci, bakteri ve bağırsak duvarı arasında tek başına sitokin yapımını uyaracak ve inflamatuvar yanıtı oluşturacak ilk temas ile başlar. Bakteri mukozaya geçer ve oradan farklı organlara dolaşım sistemi ile taşınır. Sıçan mezenterik arterine 30 dakika iskemiye takiben 24 saatlik reperfüzyon uygulanan bir çalışmada, işaretli bakterinin translokasyonu incelenmiş ve translokasyonda reperfüzyon zamanının belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır [98]. Çünkü kan akımının yeniden sağlanması ile hücre içine fosfolipaz A₂ aktivasyonunu sağlayan Ca²⁺ girişi gerçekleşir. Fosfolipaz A₂ tarafından salınan araşidonik asit reperfüzyon süresince siklooksijenaz (COX) enzimleri tarafından metabolize edilir. PG'lerin, Tromboksan (TX), prostasiklin (PGI₂) ve lökotrienlerin yapımından sorumlu olan lipooksijenaz (LOX) enzimlerinin üretimi, vazodilatasyon (PGI₂, PGE₁, PGE₂, PGD₂), vasküler permeabilitenin artışı (LTC₄, LTD₄, LTE₄), trombosit agregasyonunu ve PMN'lerin kemotaksisini uyarır [98, 99].

İskemiye takiben inflamatuvar bir cevap oluşur [98]. İnflamasyon, travma ve enfeksiyon gibi durumlarda dokular fiziksel ya da kimyasal ajanlarla ya da patojenlerle hasarlandığında, hasara karşı oluşturulan bölgesel savunma cevabı olarak tanımlanmıştır [104]. Bu oluşan inflamatuvar cevaba, makrofajlar, endotel hücreleri, nötrofiller, lenfositler, trombositler, parankimal hücreler, ayrıca kompleman sistemi, kan koagülasyon kaskadı, ROS, NO, pro ve anti-inflamatuvar sitokinler, mikrovasküler perfüzyon ile ilişkili diğer mediyatörler gibi hücrel olmayan yapılar da katılır [98].

İnflamasyon cevabı, hasarlı hücre içeriği tarafından tetiklenebileceği gibi, bütünlüğü bozulmuş doku matriksinin kompleman kaskadını ya da makrofajları aktive etmesi yolu ile dendritik ve diğer hücrelerin heat shock proteinlere (HSP), nükleer proteinlere ya da heparan sülfatın toll-like reseptörlerine bağlanması yolu ile de tetiklenebilir. İnflamatuvar yanıt her ne kadar hücrelerde özellikle de endotel hücrelerinde ve makrofajlarda başlasa da, bu hücreler de anoksi ve yeniden oksijenlenme sırasında ve $[Ca^{+2}]$ i artışı ile aktive olurlar [98].

İnflamasyondaki olaylar, birbirleri ile bağlantılıdır. ROS, aktive olmuş makrofajlardan, nötrofillerden, endotel hücrelerinden, trombositlerden ve hasarlanmış hücrelerden salınabilir. Sitokin ve kemokinler gibi mediyatörler ise, makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve endotel hücreleri tarafından oluşturulur ve yine bu hücreleri aktive eder. Azalan / artan NO oluşumu, artan endotelin -1 oluşumu ve kan koagülasyonu mikrovasküler perfüzyonda sorunlar yaratır. İnflamatuvar cevap süresince salınan ROS, sitokinler, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), NO'nun yüksek dozları gibi çeşitli bileşenler, sitotoksikite yaratarak hücre hasarına neden olurlar. ROS'un, özellikle hidrojen peroksitin NF- κ B'yi aktive ettiği bilinmektedir. Aktive olmuş NF- κ B inflamasyonla ilişkili akut faz proteinleri, hücre adezyon molekülleri, hücre yüzey reseptörleri, sitokinler ve kemokinler gibi ürünleri olan genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinden sorumludur [105].

Mikrovasküler düzensizlik yüzünden reperfüzyon ile yeniden oksijenlenme sağlansa bile reperfüzyon fazında hala anoksik hasar devam eder ve reperfüzyon süreci boyunca inflamatuvar cevabın oluşumu ile hücre hasarı sürekliliğini korur.

Deneyssel çalışmaların sonuçlarına göre I/R hasarının erken ve sonradan oluşan hasar olmak üzere bifazik şekilde geliştiği ortaya konmuştur. Erken hasar, XOD enziminden köken alan ROS'ların yapımı ile oluşurken, sonradan oluşan hasar, inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve birikimi ile oluşur [105]. Erken hasarda iskemiye maruz kalan organda hipoksi ve hücre membranlarında da XOD kökenli ROS aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonu ile hasar gelişir. Bununla birlikte, ROS hem TNF- α , interleukin 1 β (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin hem de sitokinle uyarılan nötrofil kemoatraktanlarının üretimine sebep olur [106]. Sonradan oluşan hasarda ise, nötrofil birikimi reperfüzyon sonrası 24 saat içinde belirgin şekilde gözlenir. Hasarlı dokuda lökosit birikimi karmaşık bir olaydır. Bu süreç, endotel yüzeyindeki adezyon moleküllerini, lökosit-kemotaksis faktörlerini, hücre içi adezyon moleküllerini (ICAM), ayrıca en önemli adezyon molekülleri olan, normalde bazal seviyede olan ancak iskemi sonrası yapımları-ekspresyonları IL-8, IL-1, ve TNF- α gibi iskemik dokudan salınan çeşitli inflamatuvar sitokinlerce artırılan endotelial adezyon moleküllerini kapsar [97].

Reperfüzyonda, özellikle erken reperfüzyon fazındaki hücre hasarı iskemik fazda oluşan hücre içi değişimler sonucu oluşur. Örneğin, iskemik fazda mitokondriyal solunum zinciri enzimleri gibi elektron transferinden sorumlu enzimler hasarlanır. Reperfüzyonda hala elektronlarını oksijene aktarabilen hücreler bunu hasarlı enzimler aracılığı ile yaparlar ve sonuç olarak ROS oluşur ve ROS aracılığı ile oluşan hücresel hasar başlamış olur. Benzer bir durum soğuk iskemide de gözlenir. Soğuk iskemi apoptozisi tetikler. Soğuk, endotel hücreleri, hepatositler ve renal

tübüler hücreler gibi çeşitli hücrelerin sitozolik şelat havuzunda demir iyonlarının artışına sebep olur. Reperfüzyonu takiben bu demir iyonları hem apoptotik cevabı tetikler, hem de ROS oluşumuna neden olur. Her iki örnekte açıklanan, azalmış durumdaki hücrel redoks sistemlerinin artması, iskemik faz süresince demir şelatının indirgenmesinin artması reperfüzyonun başlangıcında hasar oluşumunu kolaylaştırır. Reperfüzyonda hücre hasarı her ne kadar inflamatuvar cevap sonucu oluşsa da hasarı oluşturan bileşenler, iskemide kan akımının azalması-durdurulması ile oluşan oksijensizliğe bağlıdır. Bu bileşenlerin çok çeşitli olmasından dolayı hücre içi hasar süreci karmaşık, uzun süreli ve reperfüzyon süresince devam edebilir tarzdadır [98].

Sitozolik Na^+ ve Ca^{2+} un artması, hidrolazların aktivasyonu ve mitokondriyal permeabilitede değişim anoksik hücre hasarı oluşumunda hemen gerçekleşir. Diğer değişimler, özellikle gerçekleşebilmesi ATP varlığına bağlı olanlar sadece reperfüzyon fazında görülürler. Bu sayede, mitojen ile aktive olan protein kinaz ailesi (MAP kinazlar), NF- κ B, ölüm reseptörlerini aktive eden sinyaller ve mitokondriyal apoptotik yolların (aktive edici ya da baskılayıcı kaspazların ve Bcl-2 ailesi üyelerinin aktivasyonu) tamamının reperfüzyon fazındaki hücrel hasar ile ilişkili olduğu söylenebilir [98].

2.8. Mide Mukozal Savunma Mekanizmaları

Mide mukozası sahip olduğu savunma mekanizmaları sayesinde, geniş bir aralıktaki pH, osmolarite ve sıcaklık değişimlerinin sıklıkla neden olduğu zarar verici etkilere karşı koyabilmektedir [107-111]. Bu mekanizmalar, yerel savunma mekanizmaların yanı sıra nöro-hormonal mekanizmaları da kapsamaktadır.

2.8.1. Mukus-Bikarbonat-Fosfolipid Bariyer

Mukus-bikarbonat-fosfolipid bariyer, mukozal savunmanın ilk basamağını oluşturur [108, 112, 113]. Bu bariyer, mukus jeli, bikarbonat (HCO_3^-) ve surfaktan fosfolipidlerden oluşmaktadır ve mukoza yüzeyini kaplar. Bu katman, yüzey epitel hücreleri tarafından salgılanan bikarbonatı alıkoyarak mukozal yüzeydeki mikroçevrenin nötralizasyonunu (pH=7,0) sağlar ve pepsin'in dokuya girişini engelleyerek yüzey epitelyumunun proteolitik sindirimini de önlemiş olur [112, 113]. Mukus jeli fosfolipidler içerir ve luminal yüzeyi oldukça güçlü hidrofobik özelliklere sahip surfaktan fosfolipidlerden oluşan bir film ile kaplıdır [108].

Mukus jeli, yüzey epitel hücrelerinin apikalinden salgılanır ve içeriğinde %95 su, %5 musin glikoproteinleri ve musin (MUC) geni ürünleri bulunur. Jeli oluşturan musin birimleri polimerize olarak büyük musin multimerleri oluştururlar ve bu multimerler jel oluşumu için şarttır [112, 113]. Her bir jel oluşturu mu musin'in, MUC2, MUC5AC, MUC5B ve MUC6'nın yapısı açıklanmıştır [112]. MUC5AC midede kardias, fundus ve antrum'un yüzey epitelyal hücrelerinde eksprese olur; MUC6 ise fundus'un boyun hücrelerinde ve antral bezlerde eksprese olur. İnsan mide mukozasındaki mukus katmanında MUC5AC ve MUC6 için alternatif katmanlar da gösterilmiştir [112, 114]. Mukus jeli, düşük moleküler ağırlıklı trefoil faktör ailesine ait peptidler (TFF'ler) ile birlikte salgılanır [115]. TFF'ler, hücre içi mukus salgılayıcı veziküllerin önemli parçalarıdır ve müsünlerin hücre içinde birikmesinde ve/veya paketlenmesinde rolleri vardır [115]. TFF2, midede müsün vizkositesini artırır ve jel ağını stabilize eder [116]. Mukus sekresyonu, aralarında gastrin ve

sekretin'in de bulunduğu mide-bağırsak hormonları, PGE₂ ve kolinerjik ajanlar tarafından stimüle edilir [112]. Aspirin ve safra tuzları gibi ülser oluşturmaya maddeler mukus jeli ve fosfolipid katmanın zarar görmesine neden olurlar ve böylece asit geri difüzyonuna ve mukozal hasarlara yol açarlar [112, 117].

HCO₃⁻'in mukus jel tabakasına sekresyonu, mide ve duodenum'un epitel yüzeyinde pH gradientine neden olur ve böylece luminal asite karşı ilk mukozal savunma hattı oluşur [112, 113]. Asit salgılayan mide mukozasının yüzey epiteli asit sekresyonunun sadece %10'u kadar bir oranda HCO₃⁻ salgılar. Mukus jeli HCO₃⁻'in luminal kaybını en aza indirerek apikal hücre yüzeyinde nötral pH düzeyini korur. Bazolateral membranda Na⁺ ve HCO₃⁻'in birlikte taşınması HCO₃⁻'in alımı için en önemli mekanizmadır. Sıçan ve tavşan mide mukozasında yürütülen çalışmalarda mide yüzey epitel hücrelerinin apikal membranlarında Cl⁻/HCO₃⁻ anyon değiştirici pompaların varlığı gösterilmiştir [118]. Midede PG'ler HCO₃⁻ sekresyonunu EP₁ reseptörleri yoluyla stimüle ederler [119]. HCO₃⁻ sekresyonunu stimüle eden diğer faktörler; luminal asit, kortikotropin-salgilatıcı hormon (CRF), melatonin, uroguanilin ve OXA'dır [112].

Lümen ve epitelyum arasındaki tek preepitelyal bariyer, mukus bikarbonat bariyeridir. Zararlı etkilerle bariyer hasarlandığında aktive olan asidin hücre içi nötralizasyonunu, hızlı epitel tamiri ve mukozal kan akımının kontrolünü ve sürekliliğini sağlarlar.

2.8.2. Yüzey Epitel Hücreleri

Mukozal savunmanın bir sonraki basamağını yüzey epitel hücrelerinin meydana getirdiği sürekli ve kesintisiz katman oluşturur. Bu katman, mukus-bikarbonat, PG'ler, HSP'ler, TFF'ler ve katelisinleri salgılar. Yüzeylerindeki fosfolipidler nedeniyle hidrofobik olan bu hücreler, asit ve suda çözünebilen zararlı ajanları uzak tutabilirler [108]. Sıkı bağlantılar ile birbirine bağlanmış olan yüzey epitel hücreleri, asit ve pepsin'in geri difüzyonunu önleyici bir "bariyer" oluştururlar [107, 112]. Yüzey epitel hücreleri gap junction'lar aracılığı ile metabolik ve elektriksel iletişimi sağlarlar. HSP'ler, artan sıcaklık, oksidatif stres ve sitotoksik ajanlar gibi stres faktörlerine yanıt olarak mide epitel hücreleri tarafından üretilirler [120, 121]. Protein denatürasyonunu engellerler ve hücreleri hasara karşı korurlar. HSP cevabının aktivasyonu, antasit hidrotalsit'in mukozal koruma mekanizmalarından birisidir [122]. Katelisin ve β defensinler katyonik peptidlerdir ve bu peptidler mukozal yüzeyin bakteriyel kolonizasyonunu engelleyen savunma sisteminde önemli rol oynarlar. Bu peptidlerin mide epitel hücrelerindeki varlığı ve ülser iyileşmesi sırasında üretimlerinin arttığı gösterilmiştir [123]. TFF'ler epitelizasyonun sürdürülmesini ve mukozal koruyucu etkinliği sağlarlar [124].

2.8.3. Mukozal Progenitör Hücrelerde Sürekli Hücre Yenilenmesi

Mukozal progenitör hücreler aracılığı ile olan sürekli hücre yenilenmesi, mukozanın yapısal bütünlüğünü sağlar. Epitelyum, progenitör hücrelerin iyi koordine edilmiş kontrollü proliferasyonu ile sürekli yenilenir. Mide yüzey epitelyumunun tamamen yenilenmesi genellikle 3-7 gün sürer. Glandular hücrelerin yenilenmesi için gereken süre ise ayları bulabilir. Mide bezlerinde tek bir kök hücre bölünmeye uğrayarak progenitör hücreleri oluşturur. Bu hücreler farklılaşarak olgun epitel hücresi

tiplerine dönüşür [125]. Kök/progenitör hücre nişi, proliferasyona ve farklılaşmaya uğrayan epitel hücreleri ve onları çevreleyen mezenşimal hücrelerden oluşur [126]. Mezenşimal hücreler büyüme faktörlerini üretirler ve böylece mezenşimalden epitelyal çapraz iletişim ve sinyalleşmeye yönlendirilmesini sağlar. Bu şekilde, niş progenitör hücrenin devamlılığı sağlanmış olur. Yüzeysel hasarlardan sonra yüzey epitelyumunun eski haline dönmesi, mide bezlerinin boyun kısmında bulunan ve korunmaya alınmış olan epitel hücrelerinin göçü ile dakikalar içinde gerçekleşir. Bu hücre göçü öncüdür ve progenitör hücrelerin proliferasyonundan bağımsızdır. Proliferasyon daha sonra (hasarın ortaya çıkmasından saatler sonra) gerçekleşir [122].

Progenitör hücrelerin hücre proliferasyonu büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Midedeki progenitör hücrelerde eksprese olan en önemli büyüme faktörü reseptörü epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGF-R) [122]. Bu reseptörü aktive eden en önemli mitojenik büyüme faktörleri; transforme edici büyüme faktörü (TGF- α) ve insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'dir [127]. PGE₂ ve gastrin, EGF-R'yi transaktive ederler ve mitojen-aktive protein kinaz yolağını tetikleyerek hücre proliferasyonunu stimüle ederler. Böylece mide mukozası üzerindeki trofik etkileri gerçekleşmiş olur [128]. Tükürük bezlerinde ve özofagusta üretilen EGF mide mukozasında bulunmamaktadır. Herhangi bir hasar durumunda progenitör hücrenin proliferasyonunu stimüle edebilir. Önemli bir yeni bulgu da bir antiapoptosis proteini olan survivin'in mide progenitör hücrelerindeki ekspresyonudur. Bu ekspresyon ile mide progenitör hücrelerinin apoptosise uğramaması sağlanarak mitozu artırılmaktadır [129].

2.8.4. Mukozal Mikrodolaşım

Mukozal mikrodolaşım, oksijenin ve besinlerin iletimi ve toksik maddelerin uzaklaştırılması için gereklidir. Birçok mide arteri muskularis mukoza seviyesinde, küçük kapillerlere dallanır ve bu kapillerler de lamina propria içine girerek glandular epitel hücrelerine yakın şekilde yukarıya doğru uzanırlar. Kapillerler, yüzey epitel hücrelerinin tabanında toplayıcı venüller oluşturacak şekilde birleşirler [122]. Mikrodamarlar boyunca uzanan endotel hücreler, NO ve PGI₂ gibi kuvvetli vasodilatörleri üretirler. Bu vasodilatörler mide mukozasını hasarlara karşı korurlar. Lökotrien C₄, tromboksan A₂ ve endotelin gibi vazokonstriktörlerin mukozal hasara neden olabilecek etkilerini zayıflatırlar. PGI₂ ve NO, endotel hücrelerinin yaşamını sürdürmesini sağlarlar ve mikrovasküler endotel hücrelerine trombosit ve lökosit yapışmasını engelleyerek mikrodolaşımın bozulmasını önlerler [130].

Mide mukozası bir irritana maruz kaldığında veya asit geri difüzyonu gerçekleştiğinde, mukozal kan akımında hızlı ve önemli bir artış meydana gelir. Duysal afferent sinirler aracılığı ile oluşan bu hiperemik cevap, geri difüze olan asitin ve/veya tehlikeli ajanların uzaklaştırılmasına ve dilüsyonuna izin verir. Bu cevap mukozal savunma bakımından çok önemlidir. Mekanik kısıtlamalar ile kan akımının engellenmesi, hemorajik nekroza neden olur. Asit sekresyonuna cevaben artan mukozal kan akımı, kısmen NO aracılığıyla gerçekleşir. NO, mukozal dolaşımı ayarlamak suretiyle mukozal savunmada önemli bir rol oynar [130, 131]. Endojen ve ekzojen NO mide mukozasını etanol ve endotelin-1 hasarına karşı korurken, NOS enziminin inhibisyonu mukozal hasarı artırır [130].

Hidrojen sülfid endojen olarak üretilen ve mukozal koruyucu etkiye sahip diğer bir bileşiktir. NO benzeri bir etki göstererek, TNF- α 'nın ekspresyonunu azaltır, vasküler endotelyuma lökosit yapışmasını azaltır ve non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların (NSAID) neden olduğu mukozal hasarı inhibe eder [132].

2.8.5. Mide Mukozasının Duysal İnnervasyonu

Mide mukozası ve submukozal damarlar, primer afferent duysal nöronlar ve mukoza tabanında yoğun bir plexus oluşturan sinirler tarafından innerve edilirler [17, 133]. Bu plexustan çıkan sinir lifleri kapiller damarlara eşlik ederek lamina propria içine girerler ve yüzey epitel hücrelerinin hemen altında sonlanırlar. Bu sinir sonlanmaları, asidi algılayan kanalları sayesinde, luminal içeriği ve/veya mukozaya asit girişi ile aktive olurlar. Bu sinirlerin aktivasyonu, submukozal arteriollerin tonusunu doğrudan etkiler ve bu tonus da mukozal kan akımını düzenler [130]. Midedeki duysal sinirlerin stimülasyonu, geniş submukozal damarların içerisinde veya yakın komşuluğunda bulunan sinir terminallerinde CGRP ve SP nörotransmitterlerinin salınımına neden olur [17, 133]. CGRP, mukozal koruyucu bir fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyon büyük olasılıkla submukozal damarların, NO üretimi ile gerçekleşen vasodilatasyonu üzerinden olmaktadır. Duysal innervasyona müdahale edilmesi; örneğin duysal afferent sinirlerin kronik, yüksek dozlarda kapsaisin ile denervasyonu sonucu hiperemik cevap bozulur ve böylelikle mide mukozasının hasara karşı olan direnci azalmış olur [17, 131, 133].

2.8.6. Prostaglandin E₂ ve Prostaglandin I₂'nin Sürekli Üretimi

Mukozada prostaglandin E₂ (PGE₂) ve PGI₂'nin sürekli üretimi, mukozal bütünlüğün sağlanması ve ülserojenik ve nekroz yapıcı ajanlara karşı korunmada oldukça önemlidir [109-111, 134-136]. PG'ler asit sekresyonunu inhibe ederler, mukus, HCO₃⁻ ve fosfolipid sekresyonunu stimüle ederler, kan akımını artırır, epitel oluşumunu ve mukozal iyileşmeyi hızlandırırlar [109-111, 131, 134-136].

PG'ler aynı zamanda mast hücresi aktivasyonunu ve vasküler endotel hücrelerine lökosit ve trombosit adherensini inhibe ederler [109-111, 134-136]. PG'lerin antikorlarla immünonötralize edilmesi, tavşan ve köpeklerde PG üretimini inhibe eden NSAID'lerin neden olduğu etkilere benzer şekilde mide ve duodenal ülser gelişimine neden olmaktadır [137, 138].

Endojen ve ekzojen E-tipi PG'ler ve bunların analogları, EP 1-4 reseptörleri yoluyla biyolojik fonksiyonlarını yürütürler [138]. PG'lerin mukozal koruyucu etkileri EP-1 reseptörleri üzerinden gerçekleşir. EP-1 reseptörleri de hasarlı mukozada HCO₃⁻ sekresyonunu ve mukozal kan akımını artırır ve mide motilitesini azaltırlar [122]. EP-3 ve EP-4 reseptörleri de sırasıyla asit ve mukus sekresyonuna etki etmektedirler [139].

2.8.7. Mide Mukozal Savunmasının Nörohormonal Düzenlenmesi

Yerel mukozal faktörlere ek olarak, MSS ve hormonlar da mide mukozal savunmasında rol oynarlar [109, 131, 140-143]. Merkezi vagal aktivasyon, sıçan mide-sinde mukus jelini ve yüzey hücrelerde hücre içi pH düzeyini artırır [140]. Merkezi CRF sinyal yollarının yanı sıra periferel CRF-ilişkili mekanizmalar da sindirim

sistemi motilitesi ve mukoza fonksiyonunda stresin neden olduğu değişimlerde etki göstermektedir [141, 142]. CRF2 reseptörü insan midesinde bulunmaktadır ve apoptosisi inhibe ederek koruyucu bir rol üstlenir [141]. CRF'nin ya da ürokortin'in periferik enjeksiyonu mide boşalmasını ve motilitesini CRF2 reseptörleri yoluyla inhibe eder. Bunun tersine, periferik olarak verilen CRF antagonistleri stresin neden olduğu gecikmiş mide boşalmasını engellemektedir. Tüm bu bulgular göstermektedir ki, periferik CRF reseptörlerinin ve mast hücrelerinin aktivasyonu sindirim sistemi fizyolojisi açısından stres kaynaklı değişimlerin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir [109-111, 131, 134, 140-142]. Bunun yanında, merkezi opioid reseptörlerinin aktivasyonu, mukozal savunmayı daha da kuvvetlendirir [122].

Aralarında gastrin 17, kolesistokinin (CCK), tiotropin-salgılatıcı hormon, GRP, CRF, EGF, peptid YY, nörokinin A (NKA) analogları ve intragastrik pepton'un da bulunduğu çeşitli peptidler mide savunmasına belirli düzeylerde katkıda bulunurlar. Bu savunma, afferent sinir denervasyonu, CGRP reseptörlerinin blokajı ve NOS inhibisyonu ile bozulmaktadır [131]. Kemirgenlerde gastrik A-benzeri hücrelerde, insanda ise P/D1 hücrelerinde üretilen bir peptid olan ghrelin, büyüme hormonu sekresyonunu hipotalamik ve hipofiz bezi üzerinden düzenleyebilmektedir. Ayrıca ghrelin, oreksijenik etkiyi de ortaya çıkarmaktadır [143]. Ghrelin'in, NO üretimi ve duysal afferent sinirlerin CGRP ile stimülasyonu yoluyla mide mukozal kan akımını artırarak, mukozayı koruyucu ve hasarları iyileştirici rol üstlendiği periferik etkilerinin de olduğu bilinmektedir [143].

Ek olarak, glukokortikoidler de mukozal savunmayı kolaylaştırıcı roller üstlenirler [144-146]. Stres esnasında kortikosteron miktarındaki akut artış, strese karşı üretilen hormonal cevabın güçlü bir koruyucu bileşenidir [143]. Glukokortikoidlerin farmakolojik dozlarıyla gerçekleştirilecek bir ön tedavi, strese bağlı kortikosteron artışını uzun süre düşük düzeyde tutabilir ve farklı stres modellerinde ortaya çıkan ülserojenik yanıtları artırır. Kortikosteronun yerine konması mide lezyonlarını azaltır [145]. Spesifik bir glukokortikoid reseptörü antagonistinin (RU-38486) uygulanması stres kaynaklı lezyonların şiddetini artırırken, stres sırasında glukokortikoidlerin midedeki koruyucu rolünü destekler niteliktedir [144]. Glukokortikoidlerin koruyucu etkilerinin; glukoz homeostasisinin, mide kan akımının ve mukus sekresyonunun sürdürülebilmesi ve ayrıca artmış mide motilitesini ve mikrovasküler permeabilityi azaltması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [146].

2.8.8. İskemi/Reperfüzyon Hasarı'na Karşı Mide Savunması

I/R oksidatif strese neden olarak mide mukozasında hasar yapar. Süperoksit ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi ROS'lar, DNA'yı parçalayarak inflamatuvar yanıtların oluşmasına ve doku hasarına neden olurlar. Ayrıca ROS'lar, sindirim sistemi boyunca NSAID'ler, soğuk stres, etanol ve H. pylori enfeksiyonu ile de üretilirler. NADPH oksidaz, fagositik hücrelerde, vasküler kas hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve adipositlerde bulunur ve oksijeni süperoksit anyonlarına dönüştürür. Nakagiri ve Murakami [147], NADPH oksidaz aktivitesinin I/R sırasında arttığını ve sonuçta ortaya çıkan mide mukozal hasarında etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Peskar ve ark., I/R sırasında COX ve LOX yollarının inhibitörlerinin kullanılmasının doza bağımlı bir şekilde mide hasarını artırdığını göstermişlerdir. COX ve

LOX yolaklarının inhibitörlerinin kombinasyonu sonucu sinerjistik etki gözlemlendiğinde, her iki yolağın da I/R sırasında oluşan mide mukozal savunmasında önemli olduğu düşünülmüştür. PGE₂, COX ve LOX yolaklarının inhibitörlerinin etkilerini antagonize eder. Araşidonik asit metabolizmasının LOX enzimi ile üretilen bir ürünü olan lipoksin A₄ de, benzer şekilde COX ve LOX yolaklarının inhibitörlerinin etkilerini antagonize etmektedir. Lipoksin A₄, I/R sırasında COX inhibitörlerinin neden olduğu mide mukozal hasarının önlenmesinde PGE₂'nin yerini alabilir [148].

Kalsitonin geni primer transkriptinin dokuya spesifik alternatif splayı sonucunda oluşan ve 37 amino asitlik nöropeptid olan CGRP, bilinen en kuvvetli vazodilatörlerdendir ve beyin-sindirim sistemi ekseninin bir düzenleyicisidir. Afferent sinirlerden salınan CGRP, kan akımını artırarak mukozayı korur. Ayrıca, intravenöz CGRP vagus siniri üzerine etki ederek gastrik asit sekresyonunu inhibe eder [149]. Feng ve ark. [150], serebral arter oklüzyonu uygulanan sıçanlarda serebral I/R'a bağlı mide mukozal hasarına CGRP'nin olası etkilerini araştırmışlardır. İntraperitoneal enjekte edilen CGRP'nin serebral I/R'nin neden olduğu mide mukozal hasarını hafiflettiği gösterilmiştir. Serebral I/R'yi takiben G hücresi sayısı ve gastrin ekspresyonu artmış bulunurken, D hücresi sayısı ve somatostatin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Gastrin ve somatostatin, CGRP tedavisi yoluyla hafifletilen serebral I/R hasarında etki göstermektedirler. CGRP tedavisi gastrin ekspresyonunu azaltırken somatostatin ekspresyonunu ve mukozal korumayı artırmaktadır. CGRP'ye ilişkin bildirilmiş olan diğer koruyucu etkiler arasında; su moleküllerinin taşınmasını sağlayan ve mide asit sekresyonunu kolaylaştıran aquaporin-4 ekspresyonunun inhibisyonu, mide mukozasının büyümesinde önemli katkısı olan fibroblast büyüme faktörünün up-regülasyonu, kan damarlarının normal yoğunluğunu ve permeabilitesinin sürekliliğinin sağlanması ve mast hücresi degranülasyonun inhibisyonu da vardır [150].

2.9. Mide Mukozal Savunmasında Duysal İnnervasyonun Rolü

2.9.1. Sindirim Sisteminin Duysal İnnervasyonu

Sindirim sistemi dört farklı duysal nöron popülasyonu tarafından innerve edilir. İntrinsik primer afferent nöronlar (IPAN'lar), hücre gövdeleri miyenterik pleksusta (Auerbach pleksusu) ve submukozal pleksusta (Meissner pleksus) yer alan, sindirim sisteminin hem mukozal hem de musküler tabakalarını innerve eden nöronlardır. ESS'nin bir parçası olan bu nöronlar, mukozal kemosensörleri, mekanosensörleri ve musküler gerim reseptörlerini oluşturmaktadırlar. Ek olarak, IPAN'lar birbirleri ile yaptıkları sinapslarla kendi kendilerini güçlendiren ağlar oluşturarak aranöronlara, motor nöronlara, sekretomotor nöronlara ve vasodilatör nöronlara sinyal gönderirler [15]. IPAN'lar bu şekilde ESS'ye gönderdikleri bilgilerle sindirimin otonomik kontrolünü sağlarlar.

IPAN'lar iki ekstrinsik duysal nöron grubu tarafından tamamlanırlar; vagal ve spinal afferentler. Bu sinir grupları sindirim sisteminden gelen bilgileri beyine taşırlar. Ek olarak bu nöronların bazıları, periferik sonlarından CGRP ve taşıkininler (SP, NKA) gibi nöropeptid transmitterler salgılayarak efferent-benzeri işlev görürler. Bu transmitterler enterik nöronların ve sindirim sistemindeki efektör sistemlerinin aktivitesini etkiler [14]. Vagal ve spinal afferentler, sırasıyla nodoz ve dorsal kök gangli-

yonundan köken alırlar ve bazı nörokimyasal ve fonksiyonel özellikleri bakımından ayrışırlar [151]. Vagus sinirlerindeki aksonların %80-90 kadarı afferent sinir lifleridir ve bunlar beyin kökünün nukleus traktus solitarius ve area postrema bölgelerine erişirler [152]. Sindirim sistemini destekleyen spinal afferentler çoğunlukla omuriliğin dorsal bölümünde, farklı laminalarda sonlanırlar. Spinal afferentler, bu bölgede segmental bir şekilde organize olurlar, fakat somatik afferentlerin aksine, çeşitli spinal segmentler üzerinden dağıtılırlar [153].

Miyenterik plexus ve kastaki belli başlı uzaysal düzenlemeler haricinde [152, 154] vagal ve spinal afferentlerin visseral uçları, herhangi bir organ veya morfolojik bölgede sonlanmamaktadır. Ekstrinsik duysal nöron lifleri çoğunlukla miyelinsiz veya ince miyelinli aksonlar ile ilişkilidirler ve bu lifler mukoza, submukoza (özellikle arteriyoller), kas, myenterik plexus ve seroza'yı beslemektedirler [14, 152, 154, 155]. Tüm bu projeksiyonlar ve bunların duysal modaliteleri ile lümendeki kimyasal çevrede, intersitisyel alanda ve damarlarda meydana gelen herhangi bir değişime, sindirim sistemi duvarlarındaki distansiyona ve aynı zamanda kaslardaki kasılma ve gevşemeye de cevap verebilmektedirler [14, 152, 154, 155].

Ekstrinsik afferentlerin en önemli görevi MSS'yi vücudun enerji ve sıvı homeostasisi ile ilgili durumlardan haberdar etmektir. Dolayısıyla bu afferentler otonomik ve nöroendokrin refleks devrelere katılırlar. Bununla birlikte bazı işlevsel bağırsak bozukluklarında hastalar mide ve bağırsakta ağrı ve rahatsızlık hissederler. Ekstrinsik afferent sistemlerin aşırı duyarlılığının, bu hastalardaki şikâyetler açısından çok önemli olduğu yönünde oldukça kuvvetli kanıtlar bulunmaktadır [15].

2.9.2. Duysal Nöronların Enteroendokrin Hücrelerle Etkileşimleri

Sindirim yolu mukozasında epitel hücrelerinin arasına yayılmış olan enteroendokrin hücreler, birçok sindirim hormonu üretmektedirler. Bu hücrelerin çoğu sinir liflerinin etrafında konumlanırlar. Bu sinir lifleri enteroendokrin hücrelerin aktivitelerini regüle ederler ve aynı zamanda bu hücrelerden salınan hormonların hedefidirler [156]. Yapılan deneyler göstermiştir ki enteroendokrin hücreler luminal içeriği analiz eden detektörler gibi işlev görürler, mukozal durumu gözlemlerler ve böylece sindirim sisteminin "tat alıcıları" gibi bir rolleri vardır. Hormon salgılamak suretiyle hem sindirimin endokrin düzenlenmesine katkıda bulunurlar hem de mide-bağırsak lümeni ve mukozanın lamina propriasındaki duysal nöronlar arasındaki iletişimi sağlamaya yönelik arayüz görevini de üstlenmiş olurlar.

Enteroendokrin hücreler vücuttaki 5-hidroksitriptamin (5-HT) için en önemli kaynaktır ve toplam amin içeriğinin %80'inden fazlasına katkı sağlarlar [152]. Bu hücreler; mukozal villuslardaki mekanik distorsiyona, kolera toksini gibi bakteriyel ürünlere, sisplatin gibi çeşitli sitostatik ilaçlara ve mukozal hasara cevap olarak 5-HT salınımı yaparlar. Bunun sonucunda 5-HT, özelleşmiş 5-HT reseptörleri yoluyla intrinsik ve ekstrinsik duysal nöron liflerini aktive eder. Submukozal plexusun intrinsik duysal nöronları üzerindeki 5-HT reseptörleri ağırlıklı olarak 5-HT_{1P} ve 5-HT₄ tiplerindedirler. Fakat myenterik plexusun intrinsik duysal nöronları ve ekstrinsik afferentler üzerindeki 5-HT reseptörleri ise tercihen 5-HT₃ tipindedirler. Vagal afferentlerdeki 5-HT₃ reseptörlerinin stimülasyonu kasmaya neden olur. Spinal duysal nöronların üzerindeki 5-HT₃ reseptörleri, kolorektal distansiyonun

afferent sinyalinde rol alırlar. 5-HT3 reseptörleri enterik sinir sistemindeki çeşitli nöronlarda da bulunmaktadır. Bu durumla ilişkili olarak 5-HT3 reseptör antagonistleri kobay bağırsağında peristalsisi inhibe ederler [15].

CCK duodenumdan yağ ve protein sindirim ürünlerine cevap olarak salınır [156]. Bu peptid doyma hissine katkısı olan ekstrinsik vagal afferentlerin stimülasyonunda, mide motilitesi ve boşalmasının refleks inhibisyonunda, midedeki kan akımının refleks artışında ve mukozal korumada rol alır [15]. Vagal duysal nöronların CCK aracılı eksitasyonuna CCK1 (CCKA) reseptörleri aracılık eder [157]. CCK1 reseptör antagonistlerinin gastro-özofagal reflü ve fonksiyonel dispepsi tedavisine yönelik bir potansiyel taşıdığı bilinmektedir [5]. Bunun sebebi, CCK1 reseptörlerinin, mide distansiyonunun neden olduğu geçici alt özofageal sfinkter gevşemelerinde rol almaları ve aynı zamanda intraduodenal lipid ve mide distansiyonu ile ilişkili olarak yemek sonrası görülen doluluk hissi ve bulantı ile de bağlantılı olmasıdır [15].

Duodenuma geçen mide asidi, proksimal ince bağırsaktaki endokrin S hücrelerinden sekretin salınımı yaptırarak pankreasın ekzokrin sekresyonunu ve safra akımını çoğaltır. Sekretin, vagal afferentleri stimüle ederek vago-vagal refleks yoluyla mide kontraktilitesini, dolayısıyla mide boşalmasını inhibe eder. Mide motilitesinin duodenal aside cevap olarak gerçekleşen nöral refleks inhibisyonu, kısmen de olsa sekretin tarafından başlatılmış olur [15]. Endokrin D hücrelerinden salınan somatostatin peptidi, ekstrinsik afferentler üzerinde inhibitör bir etkiye neden olabilir çünkü somatostatinin uzun etkili bir analogu olan oktreotid'in mide ve rektumdaki distansiyon algısını azalttığı bilinmektedir [5]. Bunun da ötesinde, mide-bağırsak mukozasında enteroendokrin hücreler veya bağırsıklık hücreleri tarafından salınan kortikotropin-salgilatıcı faktör, ekstrinsik afferent sinir aktivitesini artırabilmektedir [15].

2.9.3. Kasılma ve Gerilme Yoluyla Duysal Nöron Aktivasyonu

Önder odak hücreler olan Kajaal hücrelerinin elektriksel aktivitesine bağlı olarak sindirim sistemi sürekli olarak hareket halindedir ve mekanik durumu ile ilişkili değişiklikler intrinsik ve ekstrinsik afferent nöronlar tarafından kaydedilir. IPAN'ların mekanosensitivitesi ESS'deki mukozal villusların distorsiyonlarına ve sindirim sistemi distansiyonuna cevap verebilmesini sağlar ve böylelikle motiliteyi, sekresyon aktivitesini ve vasküler perfüzyonu sindirimin gereksinimlerine göre düzenleyebilir. Hem intrinsik enterik hem de vagal mekanosensörler, fundusun yiyecek alımının neden olduğu distansiyona cevap olarak gösterdiği adaptif gevşemeye katkıda bulunurlar [15].

2.9.4. Mukozal Hasar Yoluyla Duysal Nöron Aktivasyonu

Mide-bağırsak mukozası için tehlikeli bakteriyel toksinlerin en önemlileri Clostridium difficile tarafından üretilmektedir. Clostridium toksin A'nın neden olduğu diyare, inflamasyon ve nekroz gibi sorunların erken aşamalarında spinal afferentler taşıkinin salınımına neden olurlar. Taşikininler NK1 reseptörleri aracılığıyla enterik nöronları stimüle ederler ve aynı zamanda da mast hücresi degranülasyonuna, makrofaj aktivasyonuna ve nötrofil infiltrasyonuna da katkıda bulunurlar [15]. Her ne kadar Clostridium toksin A'nın duysal nöronları aktive etme mekanizması henüz

tam olarak bilinmese de, toksinin epitelyal hücreleri uyarak makrofaj-inflamatuar protein-2 ve diğer kemokinlerin salgılanmasına yol açtığı bilinmektedir. Makrofaj-inflamatuar protein-2 ve diğer kemokinler inflammatuar reaksiyonları etkilerler ve duysal nöronların stimülasyonuna da öncülük ederler. Bunun aksine, kolera toksini ise enteroendokrin hücrelere etki ederek 5-HT salınmasını sağlar ve 5-HT de enterik sekretomotor refleks yoluyla elektrolit ve sıvı sekresyonunu stimüle eder [15].

Sindirim sistemi mukozasında deneysel olarak oluşturulmuş hasarların spinal afferentlerin aktivasyonuna neden olduğuna ilişkin birçok çalışma vardır. Bu nöronlar, efferent benzeri işlevleri sayesinde mukozadaki yerel koruyucu mekanizmaları veya afferent işlevleri sayesinde de otonomik ve nöroendokrin mekanizmaları aktive edebilirler [14]. Hidroklorik asit ve pepsin, midenin oldukça agresif salgılarıdır ve epitelyal bariyeri aşabildikleri takdirde mukozaya zarar verirler. Bu durumun gerçekleşmesine neden olan koşullar şunlar olabilir: sindirimin mekanik kuvvetlerinin neden olabileceği mukozal bariyer hasarları, alkol alımı, NSAID'ler veya iritan yiyecekler ya da safra reflüsü. Asitin lamina propria içine kontrolsüz sızması spinal afferentleri stimüle eder ve spinal afferentler de periferik aksiyon mekanizmaları yoluyla gastroduodenal mukozada kan akımını artırır ve diğer savunma mekanizmalarını başlatırlar [14]. Dolayısıyla asite duyarlı ekstrinsik afferentler, çeşitli zararlı kimyasallar tarafından aktive edilebilen bir sinirsel acil durum sistemini oluştururlar [14]. Bu alarm sistemi insan mide mukozasında [158] ve deney hayvanlarının ince ve kalın bağırsak mukozalarında [15] işlev görür.

2.9.5. Midedeki Duysal Nöron Fonksiyonlarının Araştırılmasında Kapsaisin'in Yeri

Duysal nöronların midedeki mukozal homeostasis katkılarının keşfi, bu nöronların diğerlerinden farklı olan bir nörofarmakolojik özelliklerinin kullanılması ile gerçekleşmiştir [14, 16]. C liflerine sahip olan primer afferent nöronların büyük çoğunluğu ve az sayıdaki Aδ liflerine sahip olan primer afferent nöronlar kırmızı biberdeki acı bileşeni olan kapsaisin'in eksitotoksik etkisine karşı özel olarak duyarlıdır. Bunun nedeni, bu nöronların kapsaisin tarafından özel olarak aktive edilen Tip 1 vanilloid reseptörlerine (VR1) sahip olmalarıdır. Vanilloid reseptörü taşıyan afferent nöronlar tipik olarak zararlı uyaranlara karşı duyarlıdır. Bu sebeple, kapsaisin hepsini olmasa da çok sayıda nosiseptif afferenti manipüle etmede kullanılabilir ve böylelikle bu nöronların patofizyolojik özelliklerini anlamamızı kolaylaştırabilir. Bir eksitotoksin olan kapsaisin, sindirim sistemini innerve edenler de dâhil olmak üzere, nosiseptif afferentleri akut olarak stimüle eder ve uzun süreli uygulanması fonksiyonlarını yitirmelerine neden olur. Böylelikle mide mukozal bütünlüğünün sağlanmasında rolü olan nöronların kimyasal olarak devre dışı kalmasına neden olur.

Nosiseptif afferentlerin hasarlara karşı mide mukozal direncini güçlendirdikleri yönündeki ilk çalışma 1980 yılında "International Congress of Physiological Sciences" başlıklı bilimsel toplantıda Janós Szolcsányi ve Loránd Barthó isimli iki bilim adamı tarafından sunulmuştur. Bu çalışmada ekstrinsik afferent nöronların kimyasal olarak knockout edilmesinin, deneysel mide hasarlarını daha da şiddetlendirdiği gösterilmiştir [14, 16].

Nörotoksik dozlarda kapsaisin sıçanlara uygulanınca doğrudan bir hasar oluşmamakla birlikte, stres, HCl, safra tuzu, asetilsalisilik asit (aspirin), indometazin ve etanol gibi hasar verici faktörlerin neden olduğu mukozal erozyonları daha da kötüleştirmektedir. Nosiseptif afferentlerin koruyucu potansiyelleri; çeşitli madde ve ilaçların mide mukozal hasarını önleyici etkilerinin nörotoksik dozlarda kapsaisin ile birlikte engellendiği yönündeki bulgularla daha da netleşmiştir. Örneğin, PGE₂, CCK, gastrin, proton pompası inhibitörü lansoprazol ve antiasit hidrotalsit gibi maddeler ile elde edilen mide korunması, kapsaisin ile muamele edilmiş sıçanlarda azalmış veya tamamen ortadan kalkmıştır [14, 16].

Nosiseptif afferentlerin mide korunmasındaki rolüne ilişkin çıkarımlar, kapsaisin'in neden olduğu nöron denervasyonunun zararlı etkilerinin yanında bu nöronların stimülasyonunun hasara karşı mide mukozal direncini güçlendirdiği yönündeki gözlemler ile desteklenmektedir [14, 16]. Eksitatör dozlarda kapsaisin'in akut olarak sıçan ve köpek midelerine uygulanmasının HCl, safra tuzu, aspirin, indometazin, etanol ve diğer zararlı faktörlerin neden olduğu makroskopik ve histolojik hasarı azalttığı görülmüştür. Saflaştırılmış kapsaisin'in mide mukozal homeostasisi üzerindeki faydalı etkileri yüksek miktarlarda kapsaisin içeren acı biber tozu ile de görülmektedir. Acı biberin, aspirinin neden olduğu erozyonlara karşı mideyi koruyucu etkisi insanlarda da gösterilmiştir [159]. Kapsaisin'in mide üzerine iritatan etkilerinin olduğuna yönelik geleneksel yaygın negatif görüşe rağmen, bu baharatın asit geri difüzyonunu ve vasküler permeabiliteyi değiştirmeye yönelik bir etkisi yoktur. Kapsaisin hem sıçanlarda hem de insanlarda mide mukozasında histolojik bir hasara neden olmamaktadır [14, 16].

2.9.6. Midedeki Nörojenik Korumanın Yolakları ve Mediatörleri

Kapsaisin'in mideyi koruyucu etkisi ekstrinsik afferentlerin sağlam durumdaki innervasyonuna bağlıdır. Kapsaisin mide mukozal savunmasını nosiseptif afferentleri stimüle ederek kuvvetlendirmektedir. Çok sayıda nörokimyasal ve farmakolojik çalışma kapsaisin'e duyarlı afferent nöronların mukozal korumayı periferik sinir sonlanmalarından CGRP ve NKA gibi taşıkinin'lerin salınması yoluyla gerçekleştirdiğini göstermiştir. Bununla birlikte, bu başlangıç sürecini takiben aktif hale geçen hedef hücreler, ekstrinsik otonomik ve intrinsik enterik nöronların da dâhil olduğu sinirsel yollar ve koruyucu sistemler henüz tam olarak gösterilmiş değildir [14].

CGRP'nin transmitter rolü ise daha fazla bilinmektedir. Bu peptidin, sıçan midesinde, büyük kısmı kaudal torasik spinal kanalın dorsal kök gangliyonundan çıkan ekstrinsik afferentler tarafından özel olarak salgılandığı bilinmektedir [14]. CGRP içeren aksonlar midenin mukoza da dâhil olmak üzere tüm katmanlarında bulunurlar ve submukozal arteriollerin etrafında yoğun bir plexus oluştururlar. Spinal afferentlerin periferik sonlanmalarından kapsaisin etkisi ile salınan CGRP, CGRP1 reseptörleri üzerinden etki göstererek deneysel hasarlara karşı direnci artırır. Peptidin bu patofizyolojik rolü, CGRP1-reseptör antagonisti olan CGRP8-37 kullanımı ile ve CGRP'nin immün-nötralizasyonu sonucunda kanıtlanmıştır. Bu iki yöntemin her ikisi de kapsaisin'in koruyucu etkilerini engeller. CGRP'ye karşı aktif immünizasyon, etanolün neden olduğu mukozal hassasiyeti daha da kötüleştirir. NKA ve ilişkili taşıkinin'ler midenin ekstrinsik afferent ve intrinsik enterik nöronla-

rından salgılanarak, NK2 reseptörleri aracılığıyla etanolün neden olduğu mide hasarına karşı geliştirilen sinirsel korumaya katkıda bulunurlar [160].

Birincil transmitterler olan CGRP ve NKA'nın koruyucu etkileri NO gibi ikincil mesajcıları da kapsar. Kapsaisin, CGRP ve NKA'nın mide mukozasındaki faydalı etkileri NO sentaz inhibitörleri tarafından baskılanır [14, 160]. Dolayısıyla, CGRP ve NKA'nın ekstrinsik afferent sinir liflerinden salınması sonucunda stimüle olan koruyucu yolların önemli araçlarının başında NO gelmektedir. Afferent sinir türevi peptidler ile NO arasındaki sinerjistik etkileşim, NO sentaz inhibitörlerinin etkilerinden de anlaşılabilir. NOS inhibitörleri normal sıçan midesinde asit hasarına yol açmasalar da, kapsaisin'e duyarlı afferentleri alınmış sıçanlarda önemli oranda asit hasarına neden olurlar [161]. Kapsaisin, CGRP ve NKA'nın lezyonu önleyici etkilerine katkıda bulunan NO'nin kaynağı tam olarak bilinmiyor olsa da, nöral ya da endotelial orijinli olması muhtemeldir. Bazı çalışmalarda PG sentezinin indometazin tarafından inhibisyonunun nörojenik korumayı zayıflattığı gözlenmiştir. Fakat kapsaisin'in PGE₂ ve PGI₂ üretimini stimüle edememesinden ötürü, prostaglandinlerin katkısı sadece afferent nöronların aktivasyonunu sağlamakla ilişkili bulunmuştur.

Nörojenik koruma mekanizmaları ile ilgili ilk çalışmalar kapsaisin'in lezyonu önleyici etkilerinin, ajanın doğrudan submukozal arteriyolları gevşetme yeteneği ve bu sayede mide mukozal akımını artırması ile ilişkili olduğu yönündeydi [162]. Bu düşünce daha sonra hem hipereminin hem de mide korunmanın afferent sinir liflerinden CGRP salınımı ve bunu takip eden NO üretimi aracılığı ile olduğu şeklindeki bulgularla da desteklendi [161, 162]. Araçların tanımlanabilmesi ve vasodilatasyon ile mide hasarının zayıflaması arasındaki ilişkinin bulunması sonucunda hipereminin, yüzey mukus katmanına HCO₃⁻ transferi gibi çeşitli savunma kuvvetlerini destekleyen birincil cevap olduğu öne sürüldü [14, 162].

Artık vasodilatasyon dışındaki koruma mekanizmalarının da nosiseptif sinir lifleri tarafından kontrol edildiği bilinmektedir [14, 161]. Kapsaisin'e duyarlı afferent nöronların düzenlediği hiperemi'den bağımsız koruma mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olsa da birçok farklı olasılık üzerinde durulabilir. Bir yaklaşıma göre CGRP'nin mide mukozal bütünlüğünü sağlaması damar endotelini hasarlardan koruma yoluyla gerçekleşmektedir. Diğer bir görüşe göre ise mide boşalmasının inhibisyonu ve artan sıvı sekresyonu mide sıvıları içindeki zarar verici faktörlerin dilüsyonunu sağlayarak mide mukozasının hasardan korunmasına neden olurlar [14]. Mide asitinin fazla sekresyonunun hasarlara katkıda bulunduğu bazı koşullarda CGRP'nin midedeki asit üretimini inhibe ederek [163] hasarı zayıflattığı düşünülebilir. Mide lümeni içerisinde asit birikmesi nosiseptif sinir liflerinin CGRP salınımını başlatır. Bu durum, CGRP1 reseptörleri yoluyla somatostatin salınımını kolaylaştırır ve gastrin, histamin ve asetilkolin salgılanmasını baskılar ve asit üretimi azaltılmış olur [163]. Diğer koruyucu etkiler de kapsaisin'in gastroduodenal mukozadaki mukus ve HCO₃⁻ sekresyonunu stimüle etme yeteneği ile ilişkilendirilebilir.

2.10. Nitrik Oksit'in Sindirim Sistemi Fizyolojisindeki Rolü

2.10.1. Nitrik Oksit Sentezi

NO, gaz formunda küçük bir moleküldür ve NOS enziminin, L-arjinin'in terminal nitrojen atomunu oksitleyip L-citrullin'e dönüştürmesi sırasında açığa çıkar. NOS enzimi kofaktör olarak flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), kalmodulin [68], tetrahidrobiopterin (BH4) ve demir'i kullanır [164, 165]. Üç farklı izoformu vardır [164, 166]:

- Yapısal NOS'lar (cNOS): Nöronal NOS (nNOS) ya da tip I NOS ve endotelial NOS (eNOS) ya da tip III NOS; Ca^{+2} bağımlı
- İndüklenebilir NOS [5] ya da tip II NOS; Ca^{+2} bağımsız

Her iki cNOS izoformu da saniyeler veya dakikalarla ölçülen aralıklarla az miktarlarda NO (pmol/l) üretir. nNOS, merkezi ve periferik sinir sistemindeki non-adrenerjik non-kolinerjik lifler içinde yer alır. nNOS kaynaklı NO'nun gastrointestinal sistemdeki esas rolü, düz kasların gevşemesini kontrol etmektir. eNOS temel olarak trombositler ve endotel hücreleri içerisinde bulunur ve mide mukozal kan akımını, epitelyal sekresyonu ve bariyer fonksiyonunu düzenlemek suretiyle gastrointestinal sistem mukozasının bütünlüğünün sağlanmasında görev alır. Ayrıca lökosit, trombosit ve mast hücreleri adezyonunun inhibisyonunda da rol oynar [167-169].

NOS aktivasyonunda başlıca etken hücrelerel kalsiyum düzeyi değişimleridir. NOS'un yapısal izoformları olan eNOS ve nNOS aktivitesi, hücre içinde kalsiyum düzeyinin ve dolayısıyla da CaM konsantrasyonunun yükselmesi sonucu fosforilasyon aktivitesinin çoğalması ile birlikte artar. Özellikle eNOS aktivitesi, protein kinaz Akt'nin de yer aldığı bir dizi kinaz ve fosfatazlar tarafından düzenlenir. Diğer taraftan iNOS aktivitesinin düzenlenmesi ise transkripsiyonel seviyededir [169].

iNOS izoformunun ekspresyonu sitokinler gibi belli başlı bazı immünolojik faktörler tarafından uyarılabilmektedir. Sitokinler bu yolla sürekli (saatler yada günler boyu) NO üretimine yol açabilirler ve bileşiğin hücrelerel konsantrasyonunu nmol/l düzeyinde artırır. iNOS izoformu endotel hücrelerinde, damar düz kasında, nötrofillerde, makrofajlarda ve hepatositlerde yer alır. İndüklenebilir izoformdan sentezlenen fazla miktarlarda NO'nun özellikle inflamasyon başta olmak üzere gastrointestinal sistem patolojilerinde rol oynadığı gösterilmiştir [166-169].

NO'nun biyolojik fonksiyonunu belirlemedeki en önemli faktörün NO'nun konsantrasyonu olduğu kanıtlanmıştır. Belirli hücrelerel süreçlerin düzenlenmesinde hücre içi NO konsantrasyonu önemlidir ve bu hücrelerel yanıtların oluşmasında beş farklı NO konsantrasyon düzeyinin etkili olduğu öne sürülmektedir: cGMP-aracılı süreçler ($[NO]=1-30$ nmol), Akt fosforilasyon ($[NO]=30-100$ nmol), HIF-1 alfa stabilizasyonu ($[NO]=100-300$ nmol) p53 fosforilasyonu ($[NO]>400$ nmol) ve nitrosatif stres ($1 \mu\text{mol}$) [170]. Şu ana kadar, her iki cNOS izoformu tarafından sentezlenen düşük seviyelerdeki NO'nun koruyucu olduğu – hücrenin hayatta kalımını ve proliferasyonunu artırdığı; bununla birlikte iNOS tarafından üretilen bol miktar-

lardaki NO'nun ise sitotoksositeye neden olacak şekilde zararlı etkilerinin bulunduğu kabul edilmektedir [170].

Yakın zamanda ise bu görüş sorgulanır hale gelmiştir. İlk başlarda nNOS ve eNOS ile ilgili düşünüldüğü gibi, iNOS aktivitesinin de azalan lökosit-endotel etkileşimi, trombosit agregasyonu ve mukozal mikrodolaşımın korunması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. iNOS ekspresyonunun düşük seviyesi, aynı zamanda herhangi bir soruna karşı pozitif bir konakçı-savunma cevabının da göstergesi olabilir [170].

NO'nun öncelikli koruyucu etkileri, NO yoğunluğunun pikomolar ve nanomolar düzeyleri için tanımlanmıştır [171]. Fizyolojik koşullarda, eNOS küçük miktarlarda NO üreterek (10-30 nmol/l) düz kas hücrelerinin gevşemesine ve endotel hücre proliferasyona neden olur [172, 173].

Düşük yoğunlukta NO'nun (<50 nmol) ekstraselüler sinyal tarafından regüle edilen kinaz (ERK) fosforilasyonunu, yüksek konsantrasyonlarda ise (>100 nmol), anjiyogenezi ve potansiyel karsinogenezi artıran bir proanjiyogenik transkripsiyon faktörü olan, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α 'yı (HIF1 α) geçici olarak artırdığı bulunmuştur [174]. iNOS tarafından üretilen >300 nmol/l'lik NO konsantrasyonunun sitostaz ve hücre ölümü ile sonuçlanan p53 fosforilasyonunun artışı ile ilgili antitümör ve antianjiyogenetik özellikleri bulunur [173].

2.10.2. Nitrik Oksit'in Hücre İçi Etki Mekanizmaları

NO, en dış orbitalinde eşleşmemiş bir elektron içeren serbest radikaldir ve bu özelliği biyolojik aktivitesinin esasını oluşturur [170]. NO, lipofilik özelliği yoluyla çabuk difüze olabilmekte ve hücre içi ve hücreler arası sinyalleri başlatabilmektedir.

Düşük konsantrasyonlarda (nanomolar) NO'nun en önemli etkisi çözülebilir guanilat siklazın (sGC) aktivasyonudur [170]. NO, sGC'nin demir grubuna bağlanır ve enzimin aktive olmasıyla birlikte siklik guanozin monofosfatın (cGMP) üretimi artar ve bunun ardından da protein kinaz G aktivasyonu başlar. Sonuç olarak efektör fonksiyonlara aracılık eden fosforilasyon kaskadı kademeli olarak başlatılmış olur [165, 167, 170].

Memelilerde, NO sinyallerine aracılık eden iki farklı tip cGMP-bağımlı protein kinaz vardır: cGK1 ve cGK2. NO/cGMP/cGK1 yolağının aktivasyonu, sitozoldeki kalsiyum düzeyini azaltarak ve/veya kontraktıl elementlerin kalsiyuma karşı duyarlılığını azaltarak düz kasların gevşemesini sağlar ve bu etki NO'nun gastrointestinal sistemdeki önemli mekanizmalarından birisidir [175].

Yakın zamanda, sGC aktivasyonunu bloke ederek NO sinyalini inhibe eden yeni bir cGMP-bağımlı yolak tanımlanmıştır. Bu inhibisyonda matriks protein trombospodin-1 (TSP1) rol oynamaktadır [176]. TSP1 bir glukoprotein olup makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından salgılanır. TSP1, çeşitli hücre yüzey reseptörleri yoluyla endotel ve vasküler düz kas hücre adezyonunu, proliferasyonunu, motiliteyi ve hayatta kalımı düzenler. Fizyolojik miktarlarda NO'nun varlığında TSP1'in antianjiyogenik kuvvetinin 100 kattan fazla arttığı gösterilmiştir [176].

Patolojik koşullarda, iNOS tarafından yüksek miktarlarda NO üretildiğinde, NO sinyal yolağı GC aktivasyonundan bağımsız olabilmektedir. Bu durumda NO, iyon kanallarını, enzimleri ve diğer proteinleri; örneğin DNA sentezinde yer alan ve Krebs döngüsü ile ilişkili enzimlerin, solunum zincir elektronlarının transportunun ve glusidik metabolizmanın inhibisyonuna neden olan proteinleri sistein tiollerinin nitrozilasyonu yoluyla doğrudan etkiler. NO sitotoksitesinin bir diğer mekanizması da nitrojen türlerinin oluşturulmasıdır. Bir serbest radikal olarak NO, süperoksit radikali gibi reaktif türlerle etkileşime girerek peroksinitriti (ONOO^-) ve dinitrojen trioksitin (N_2O_3) üretilmesine neden olur. ONOO^- , proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonundan sorumludur. Peroksinitröz asit ise kendisini oluşturan NO'dan ya da süperoksitten daha güçlü bir okside edici ajandır ve tiolleri, askorbatı ve diğer molekülleri okside eder. N_2O_3 ise farklı substratların nitrozilasyonuna neden olarak kronik inflamasyona ve karsinogenik süreçlere katkıda bulunabilir [167, 170]. Aktive olmuş makrofajlarda ONOO^- oluşumu faydalı iken, dokularda oksidatif hasar yapması nedeniyle zararlıdır [170]. ONOO^- 'in prekürsörlerinin eşleşmemiş elektronları artık eşleşmiş olduğundan, ONOO^- bir radikal değildir. Fakat ONOO^- , ana bileşikleri olan NO veya süperoksite kıyasla çok daha sitotoksik bir türdür [170]. Ayrıca, ONOO^- oluşumunun, nitroksil iyonu ve O_2 arasında bir reaksiyonla gerçekleşen alternatif bir yolu da vardır. ONOO^- , karbondioksit ile reaksiyona girerek nitrozoperoksikarbonat ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$) oluşturur. Vücut sıvılarındaki HCO_3^- konsantrasyonu yüksek olduğu için bu bileşiğin oluşumu, ONOO^- toksisitesi ile ilişkili olan diğer reaksiyonlara kıyasla daha da hızlı gerçekleşebilir [170].

NO'nun bir diğer cGMP bağımlı etkisi de proteinlerdeki tirozin rezidülerinin nitrasyonudur. ONOO^- kuvvetli bir oksidandır ve tirozin, triptofan, sistein ve metionin gibi amino asitler de dahil olmak üzere birçok biyolojik molekül ve bileşiği modifiye edebilir [170]. Tirozin nitrasyonuna, NO metabolizmasının ikincil ürünleri olan ONOO^- ve nitrojen dioksit ($\text{NO}_2^\cdot$) gibi reaktif nitrojen türleri aracılık eder. Bu ikincil ürünler, süperoksit radikalleri ($\text{O}_2^\cdot$), H_2O_2 ve geçiş metallerinin var olduğu durumda oluşurlar. ONOO^- 'in in vitro tirozin nitrasyonuna aracılık edebilme özelliğine rağmen, in vivo nitrasyondaki katkısı bilinmemektedir. Bu katkıyı açıklayabilmek için, nitrit- H_2O_2 -hemperoksidaz ve geçiş metallerine-bağımlı mekanizmalar gibi alternatif yollar düşünülmektedir [177]. In vivo NO-bağımlı oksidatif stres için geçerli bir biyomarker olarak proteinlerdeki 3-nitrotirozin içeriğine bakılması önerilmektedir. NO, apoptosiste ikili bir rolü olan pleiotropik bir moleküldür. Süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek ONNO^- oluşumuna izin verir ve membran permeabilitesindeki ve kalsiyum konsantrasyonundaki artışı tetikleyerek apoptosisi stimüle eder. Diğer taraftan, NO in vitro Bcl-2/Bcl- X_L 'yi aktive eder ve bu da Bax/Bak yolağının inhibe olması ve dolayısıyla da kaspaz kaskadının bloke olması ile sonuçlanır. NO'nun apoptosisi regüle edebileceği bir diğer mekanizma da p53'ü modüle etmektir. NO aracılı DNA hasarı p53 birikimine ve apoptosise neden olur [170].

2.10.3. Nitrik Oksit'in Sindirim Sistemi Motilitesi Üzerine Etkileri

nNOS tarafından sentezlenen NO, özofagus, mide ve bağırsak motilitesinin regülasyonunda önemli rol oynar. ESS'de baskın inhibitör bir non-adrenerjik, non-kolinerjik nörotransmitter olarak rol alır. Mide ile bağırsağın besin sindirimindeki vagal aracılı akomodasyon refleksine katkıda bulunduğu gibi peristaltik refleks sıra-

sındaki kontraktıl fonksiyonun koordineli kontrolünde de önemi büyüktür. Tüm bu rolleri sonucunda özofagusta düz kas fonksiyonunun ve ince bağırsak motilitesinin inhibisyonunu sağlar ve aynı zamanda mide akomodasyonu ve boşalmasını da destekler [178]. NO, alt özofagal sfinkter için en önemli post-ganglionik inhibitör nörotransmitterdir ve yapılan çalışmalar sfinkter gevşemesinde yeni bir nitrejik, preganglionik, vagal yolağın var olabileceğini göstermektedir [179]. NOS'un özofagustaki farmakolojik inhibitörleri, yutma ile distal özofagustaki kontraksiyon arasında görülen gecikme zamanını azaltılmasına katkıda bulunurlar, alt özofageal sfinkter basıncı ile peristaltik basıncı yükseltirler ve kısa süreli alt özofagus gevşemelerinin sayısını da düşürürler [170]. Midede ise NOS'un farmakolojik inhibitörleri mide kasılmalarının frekansını artırıp, bazal ve öğün sonrası fundus hacmini azaltırlar. Aynı inhibitörlerin ince bağırsaktaki işlevleri sonucunda açlık motor aktivitesi artar [169, 170].

Fare mide fundusu ve ince bağırsak dokularının, organ banyosunda elektriksel alan stimülasyonuna ve NO donörlerine maruz bırakıldığı deneysel bir modelde longitudinal kas striplerinin gevşemesi, sGC'nin spesifik inhibitörleri (ODQ ve ns2028) tarafından ortadan kaldırılmıştır. Bu bulgu, endojen NO'ya cevaben gastrik fundus ve ince bağırsakta ortaya çıkan gevşemelerin tamamıyla cGMP'ye bağımlı olduğunu gösterir [180].

Endojen NO'nun ince bağırsaktaki besin geçişini düzenlenmesi, ince bağırsak motilitesini regüle ederek gerçekleşir. Sağlıklı bireylerde L-NAME infüzyonunu takiben duodenal transit gecikmiş ve duodenal basınç dalgalarının frekans ve genliğinin de önemli derecede arttığı gösterilmiştir. NO ayrıca Oddi sfinkterinde de inhibitör bir nörotransmitterdir. Endojen NO üretiminin inhibisyonu kontraktileti artırırken ekzojen NO hem deneysel domuz modelinde hem de in vitro olarak sfinkter kontraktilesini ve elektriksel aktiviteyi azaltır [170].

2.10.4. Nitrik Oksit'in Mukozal Fonksiyon ve Kan Akımının Düzenlenmesi Üzerine Etkileri

eNOS tarafından sentezlenen NO'nun, sindirim sisteminde alkali üretimi, asit ve mide mukozası sekresyonunun düzenlenmesinde ve aynı zamanda vasküler perfüzyon ve doku rejenerasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca NO zarar verici ajanlara karşı mide mukozasını koruyucu etkiye de sahiptir [167, 169]. eNOS ve nNOS ekspresyonu yoluyla sürekli şekilde NO üretimi; sindirim sisteminde fizyolojik olarak motilite, tonus, permeabilite ve mide duvarı damarlarına kan akımının sağlanması gibi fonksiyonlara katkıda bulunur.

NO ve NOS izoformlarının aktivitesinin, I/R kaynaklı mukozal hasarın oluşturduğu mide lezyonlarına karşı koruyucu etkisi oldukça belirgin ve kesindir. Farelerde çölyak arter oklüzyonunun ardından gerçekleşen reperfüzyon sonrasında, önceden uygulanmış L-NAME'in (seçici olmayan bir NOS inhibitörü) mide mukozasındaki görünür hemorajik lezyonları önemli ölçüde kötüleştirdiği görülmüştür. Aynı zamanda, seçici iNOS inhibitörü (1400W) ise bu lezyonların oluşumunu engellemektedir [181].

NO, mide bezlerinde, histaminin stimüle ettiği asit sekresyonunu azaltır. Mide sekresyonunun NO ile inhibisyonu, sağlıklı insanlardan toplanan biyopsi materyallerinde görölen paryetal hücrelerdeki artan cGMP düzeyi ve GC aktivasyonu ile bağlantılıdır [182]. Ayrıca NO, mide ülserlerinin iyileşme sürecine de katkı sağlar. Ülserli bölgeye kan akımını artırır ve ülser yatağındaki granülasyon dokusunda bulunan kapillerlerin sayısını çoğaltır. NOS inhibisyonu, ülser iyileşmesini geciktirir. NO, endotel hücrelerine lökosit, trombosit ve mast hücresi adezyonunu inhibe eder ve bu mekanizma yoluyla dokuyu I/R hasarından da korumuş olur [170].

NO'nun lökosit adezyonu üzerindeki inhibitor etkisi P-selektin, beta integrinler, fosfolipaz A₂, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve lökotrien B₄ aracılığıyla olur. NO'nun trombosit fonksiyonları üzerindeki inhibitör etkisi ise cGMP-fosfoinositid 3-kinaz-bağımlı mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Bununla birlikte cGMP'den ve ONOO⁻-bağımlı protein nitrasyonundan bağımsız mekanizmaların da bu etkiye katkısının olduğu öne sürölmektedir [170].

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Deney Hayvanları Ünitesi ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilen çalışmada Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen erişkin, erkek 250-300 g ağırlığında 102 adet Wistar sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir.

3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü

Sıçanlar bütün gruplarda 18 saatlik açlık periyodundan sonra deneye alınmıştır. Bu süre içinde su alımı serbest bırakılmıştır.

3.1.1. Gruplandırma:

1) Sham grubu (n=10): Bu gruptaki hayvanlarda orta hat kesisiyle çöliak arter açığa çıkarılmış ve herhangi bir işlem yapılmadan jugular ven aracılığı ile 0,01 ml/kg/dk hızda, 3,5 saatlik fizyolojik serum infüzyonu uygulanmıştır.

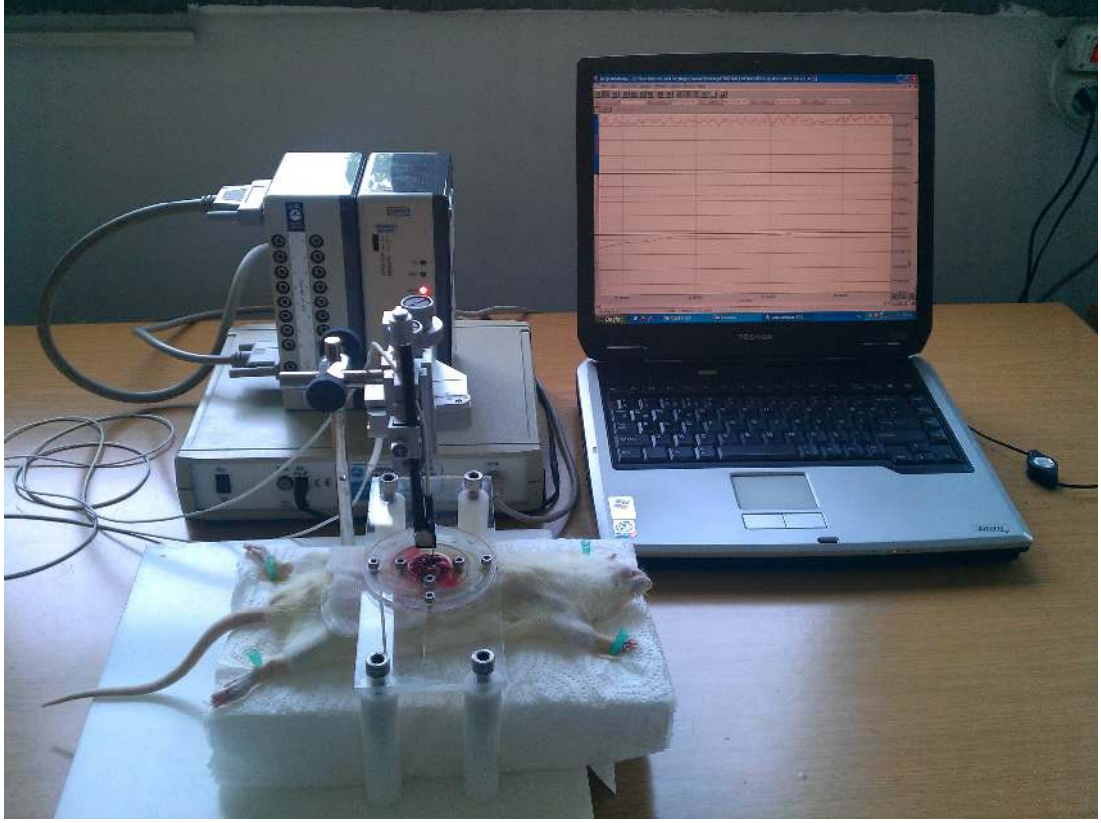
2) İskemi-reperfüzyon (I/R) grubu (n=10): Bu gruptaki hayvanlara çöliak arterin klemple kapatılması ile 30 dk iskemi ve klemp alındıktan sonra 3 saat reperfüzyon uygulanmıştır. I/R'la eşzamanlı olarak jugular ven aracılığı ile 0,01 ml/kg/dk hızda fizyolojik serum infüzyonu yapılmıştır [183].

3) I/R + OXA grubu (n=22): Jugular ven kateterizasyonu ve I/R uygulanan bu gruptaki hayvanlara I/R ile eşzamanlı olarak OXA infüzyonu (100, 200 ve 500 pmol/kg/dk; 0,01 ml/kg/dk hızda) uygulanmıştır. Elde edilen doz cevap eğrisiyle en etkin doz saptanmış ve sonraki gruplar için bu doz kullanılmıştır [6].

4) I/R + L-NAME grubu (n=10): I/R uygulamasından 30 dk önce bu gruptaki hayvanlara spesifik olmayan NOS enzimi inhibitörü L-NAME (Sigma, N-5751) 30 mg/kg dozda, i.v. olarak uygulanmıştır [20].

5) I/R + L-NAME + OXA grubu (n=10): 30 mg/kg L-NAME uygulamasından 30 dk sonra I/R ile eşzamanlı olarak OXA infüzyonu uygulanmıştır.

6) I/R + Kapsaisin grubu (n=10): Bu gruptaki hayvanlara duysal denervasyonu sağlamak için yüksek doz kapsaisin (Sigma, M-2028) uygulanmıştır. Kullanılan 125 mg/kg lık kapsaisin dozu; 1.gün 25 mg/kg, 2.gün 50 mg/kg ve 3.gün 50 mg/kg olmak üzere üç ayrı doz halinde, 100 g vücut ağırlığına karşılık 0,5 ml'lik hacim içinde s.c. olarak uygulanmıştır. Kapsaisin'in solunum sistemi üzerine olan zararlı etkisini ortadan kaldırmak için uygulamalar eter anestezisi altında yapılmıştır. Kapsaisin %10 etanol, %10 Tween 80 ve %80 serum fizyolojik (v/v/v) içeren bir solüsyon içinde



Şekil 3.1. Mide Mukozal Kan Akımı Ölçümü için Kullanılan Düzenek

3.2.2. Lezyon İndeksinin Tayini

Gundersen ve ark.'nın yöntemine göre yapılmıştır [187].

Yöntem: Kan akımı ölçüldükten sonra mideler dondurulmuş parafin üzerine tespit edilmiş ve doku üzerini kaplayacak şekilde soğuk 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 (sınırları belirgin hemorajik alanlar) Cavalieri Ölçüm Cetveli kullanılarak ölçülmüş ve lezyon indeksi mm^2 olarak ifade edilmiştir.

3.2.3. Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini

Stephan ve ark.'nın yöntemine göre yapılmıştır [188].

Prensip: Tetrametilbenzidin, miyeloperoksidaz enzimi ve H_2O_2 'nin bulunduğu ortamda oksitlenir. Oksidasyon ürünü olarak mavi renkli bileşik oluşur. Yöntem, mavi renkli bileşiğin neden olduğu absorbans değişiminin 1 dk süresince 655 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Reaktifler ve kimyasallar

- 1) Fosfat tamponu (50 mM, pH: 6,0): 50 mM Na_2HPO_4 (di-Sodium hydrogen phosphate, Merck 6586), 50 mM NaH_2PO_4 (Sodium phosphate, Sigma S-

9638) ile hazırlanır. 1N HCl (hydrochloric acid, Merck 314) ile pH: 6.0'ya ayarlanır.

2) Homojenizasyon tamponu: %1 oranında HTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide, Sigma, H-5882) içerir ve fosfat tamponu ile hazırlanır.

3) Reaksiyon tamponları:

1 mM H₂O₂ (Merck 8600)

20 mM Tetrametilbenzidin solüsyonu (Tetramethylbenzidine, Sigma, T-2885-1G ve Dimetilformamid, Applichem Dimethylformamide, A-3676 ile hazırlanır.)

80 mM NaH₂PO₄ (Sodium phosphate, Sigma S-9638)

İşlemler: 2,5 ml homojenizasyon tamponu içine konulan ~ 250 mg ağırlığındaki mide dokularına 3 kez 10 saniyelik sürelerle buz içinde sonikasyon yapılmıştır (Bandelin Sonopuls, UW 2070). Elde edilen homojenatlar analiz yapılncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Analiz öncesinde homojenatlar 15000 rpm'de, 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatandan 50 µl alınmış ve üzerine 790 µl, 80 mM NaH₂PO₄, 100 µl, 1 mM H₂O₂, 60 µl, 20 mM tetrametilbenzidin solüsyonu eklenip, kuvvet alt üst edildikten sonra spektrofotometrede 655 nm'de 1 dk süresince okunmuştur. Süpernatandan alınan örnekler kullanılarak, protein kiti ile (Pearce-comasie plus-23236) ile protein değerleri ölçülmüştür. Spektrofotometrede 655 nm de 1 dk süresince okunan absorbans değişimi protein değerlerine oranlanarak MPO enzim aktivitesi U/g protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. CGRP Miktarının Tayini

Frobert ve ark.'nın yöntemine göre spesifik enzim immünoassay (EIA) kiti kullanılarak ölçülmüştür [189, 190].

Prensip: Bu immünometrik yöntemde kullanılan “double-antibody sandwich” tekniğine göre; CGRP için spesifik olan bir monoklonal antikor ve bir asetilkolin estera konjugatı (AChE) CGRP molekülünün farklı bölgelerine bağlanarak molekülün plate üzerinde hareketsiz kalmasını sağlamaktadır. AChE'nin enzimatik aktivitesi ortama eklenen Ellman's ayıracıyla spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu ayıraçla oluşan sarı rengin yoğunluğu CGRP konsantrasyonuyla orantılıdır. Yöntem için hassasiyet sınırı 10 pg/ml'dir.

Reaktifler ve Kimyasallar:

- 1) Asetik asit (Asetic acid, Merck, Art.56)
- 2) Metanol (Methanol, Merck, 6008)
- 3) 8 M Üre (Urea, Merck, Art.8486)
- 4) Rat CGRP EIA kiti (SPI-BIO, cat no:A05482-96 Wells)
- 5) C18 ters faz kartuş (SPE cartridge, cat no: 400020)

İşlemler: Midelerden alınan ~250 mg'lık doku örnekleri havanda dövülüp parçalandıktan sonra 1 ml 2 N'lik asetik asit içine alınarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar 95°C'de 10 dakika bekletildikten sonra 21.000 rpm'de 45 dakika sant-

rifüj edilmiştir (Beckman Optima TL, Ultracentrifuge). Santrifüj sonrası alınan süpernatant %4'lük asetik asitle 1:4 oranında sulandırıldıktan sonra ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. Ekstraksiyon işlemi için C18 ters faz kolonlar kullanılmıştır. Kolonlar sırasıyla 5 ml metanol, 10 ml üre ve 10 ml bidistile su geçirilerek aktif hale getirilmiştir. Asetik asitle sulandırılmış numuneden 1 ml alınarak kolondan geçirilmiş ve kolon 10 ml %4'lük asetik asitle yıkandıktan sonra CGRP elüsyonu metanol:su ve asetik asit (90:10 v/v) karışımı bir solventle gerçekleştirilmiştir. Kolondan 3 kez 1 ml solvent geçirilerek (toplam 3 ml) toplanan CGRP numuneleri liyofilize edilerek -20 °C'de saklanmıştır. Bütün numuneler toplandıktan sonra numuneler EIA tamponu ile çözülmüş ve CGRP konsantrasyonları EIA yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçlar ng/g protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. Nitrit/Nitrat Tayini

Total Nitrik Oksit (NO) miktarı, NO yıkım ürünleri olan nitrit ve nitrat miktarları Griess metodu esaslı kalorimetrik kit aracılığı ile ölçülmüştür [191].

Prensip: NO'nun in vivo son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) iyonlarıdır. Nitrit ve nitrat oranları değişkendir ve mutlak ölçümleri mümkün değildir. Bu nedenle total NO üretimi NO_2^- ve NO_3^- miktarlarının toplamı olarak ifade edilmektedir. NO ölçümü için kullanılan kit iki aşamalı bir yöntemle total nitrit/nitrat konsantrasyonunu ölçmektedir. İlk basamakta nitrat redüktaz enzimi ile NO_3^- , NO_2^- 'e dönüştürülür. İkinci basamakta ise ortama eklenen Griess reaktifleri NO_2^- 'i koyu mor renkli bir azot bileşenine çevirir. Renkli bileşenin 540 nm'de ölçülen absorbansı total NO_2^- miktarını vermektedir.

Yöntem: Mideden alınan ~ 250 mg ağırlığındaki doku örnekleri havanda dövüldükten sonra 1 ml PBS (pH 7,4) tamponu içinde teflon uçlu doku homojenizatörü (TRI-R STIR-R, Model K43) ile buz içinde homojenize edilmiştir. Homojenizatlar 10.000 g'de 20 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar 30 kDa'luk, ultrasantrifüj için uygun filtreler kullanılarak 100.000 g'de 1 saat daha santrifüj edilmiştir. Filtre edilen örnekler plate'e alınarak nitrat redüktaz enzimiyle oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat sonunda plate'e Griess reaktifleri eklenmiş ve 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra 540 nm'de okunmuştur. Sonuçlar $\mu\text{M/g}$ protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.6. iNOS ve eNOS Ekspresyonunun Tayini

iNOS ve eNOS proteinlerinin analizi western blot yöntemine göre yapılmıştır.

Reaktifler ve Kimyasallar

- 1) %30'luk Akrilamid – Bisakrilamid karışım solüsyonu (Akrilamid, Merck, S-4385430-552, Bisakrilamid, Merck-K-33932646-526)
- 2) %10'luk Amonyum persülfat (APS, Merck, K-34485101-530)
- 3) TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin) (Merck, K-34460932-517)
- 4) Redüklenmemiş Numune Tamponu (Loading Dye, Laemli, 5X konsantre)

Laemli tamponu hazırlanırken,
10 ml Gliserol (Sigma, G-7757),
10 ml %10 SDS (Sigma, L-4509),
1.25 ml 1 M pH: 6.8 Tris (Merck, K-34776287-533),
7.5 ml β -merkaptoetanol (Merck, S-4365840-544) ve brom fenol blue (Sigma, B-6896) karıştırılıp final hacim 50 ml olacak şekilde bidistile su eklenmiştir.

- 5) Elektroforez tamponu (5X konsantre Stok Solüsyon)
Elektroforez tamponu hazırlanırken,
15 gr Tris,
72 gr Glisin (Merck, K-32710490-405)
5 g SDS 1000 ml distile su içinde çözülmüştür.
Elektroforez aşamasında bu stok solüsyon 1:5 oranında bidistile su ile dilüe edilmiştir.
- 6) Blotlama Tamponu, (10X Konsantre Stok Solüsyon)
12.11 g Tris (Merck, K-34776287-533)
30 g Glisin (Merck, K-32710490-405)
1 g Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA, ADR Lab. Chem. 139-13-9),
1 L bidistile suda çözülmüştür. Blotlama aşamasında 10X stok solüsyon 1:10 oranında bidistile su ile dilüe edilmiş, kullanım esnasında %10 metanol (Merck, K34212908-503) eklenmiştir.
- 7) TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer Salın, 10X Konsantre Stok Solüsyon)
TBS solüsyonu hazırlamak için 60.55 g Tris, 87.66 g NaCl 800 ml distile su-
da çözülmüş, pH, HCl ile 7.4'e ayarlanmış ve. final hacim 1000 ml olacak
şekilde bidistile su eklenmiştir. Kullanım esnasında 10X stok solüsyon 1:10
oranında bidistile su ile dilüe edilmiştir.
- 8) TBS-T Solüsyonu (Tris Buffer Salın-Tween 20)
TBS-T solüsyonunu hazırlamak için, TBS stok solüsyondan (10X), 100 ml
alınıp, bidistile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Solüsyona 1 ml Tween-20
(Merck, S4393684-601) eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- 9) iNOS Primer Antikoru (Sigma, N7782)
Kullanım esnasında 1:100 oranında dilüe edilmiştir.
- 10) eNOS Primer Antikoru (Cell signal, 9572)
Kullanım esnasında 1:100 oranında dilüe edilmiştir.
- 11) Beta Aktin Primer Antikoru (Cell signal)
Kullanım esnasında 1:500 oranında dilüe edilmiştir.
- 12) Peroksidaz Konjuge Sekonder Antikor (Chemicon, AP132P)
Kullanım esnasında 1:2000 oranında dilüe edilmiştir.

Doku Örneklerinin Hazırlanması

iNOS ve eNOS proteinlerinin tayini için mideden alınan ve sıvı nitrojen tankının içinde saklanan örnekler daha etkili bir sonikasyon için, buz üstünde küçük parçalara ayrılmıştır. 0.2 g doku için 600 µl lysis tamponu ve lysis tamponunun her 1 ml'si için 50 µl olacak şekilde protein inhibitör kokteyli (Sigma-9417) karışımı doku üzerine eklenmiştir. Buz içinde 30 dk bekletildikten sonra 15000 rpm'de, 4°C de, 25 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar hemen buz kalıbına alınmış ve protein değerleri ölçülmüştür. Örnekler SDS jele yüklenmeden önce laemli ile karıştırılarak 5 dk kaynatılmış ve yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

Elektroforez ve Antikorların Uygulanması

Örnekler içerdikleri proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları için %7,5'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jele yüklenmiştir. Her örnek 200 µg/ml protein içerecek şekilde hazırlanmıştır. Moleküler ağırlık standartı (Fermentas SM1811) ve numuneler jele yüklendikten sonra 2 saat süresince 80V da elektroforez edilmiştir (BioRad, PowerPac-300). Jeldeki proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra, membran, %5'lik süttozu (Biorad-170-6404) içeren TBS-T tamponunda, oda ısısında, 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 10 dk yıkanan membran, TBS-T ile hazırlanmış primer antikorlar ile 4°C'de, çalkalayıcı üzerinde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası membran TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika yıkanarak fazla antikorlar uzaklaştırılmış, ardından membran, TBS-T ile hazırlanan 1:2000 oranında dilüe edilmiş sekonder antikor ile oda ısısında, 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBS-T ile 3 kez 10'ar dk yıkama yapılmış ve membranlar görüntüleme aşaması için hazır hale getirilmiştir.

Görüntüleme ve Değerlendirme

Sekonder antikorla konjuge peroksidaz enziminin, kemiluminisans oluşturan ürünü için substrat içeren ECL reaktifleri (Cemilucient detection system, Chemicon-2600) 1:1 oranında karıştırılarak membranların üzerine uygulanmış ve membranlar karanlıkta 5 dk inkübe edilmiştir. Bekleme süresi sonrasında membranların üzerindeki fazla ECL solüsyonu kurutma kağıdı ile alınarak membranlar ve fotoğraf filmi kasete (Autoradiography cassette, 24x30 cm; Amersham, RPN11643) yerleştirilmiş ve membrandaki antikor bağlanmalarının görüntüsü fotoğraf filmine (Hyperfilm, 18x24 cm; Amersham, RPN21034) aktarılmıştır.

Görüntülerin yarı kantitatif analizi için filmler tarayıcı aracılığıyla bilgisayar ortamına aktarılmış ve image J paket programı ile bantların yoğunlukları hesaplanmıştır. Sonuçlar her grup için, iNOS/β aktin ve eNOS/β aktin oranı şeklinde ifade edilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

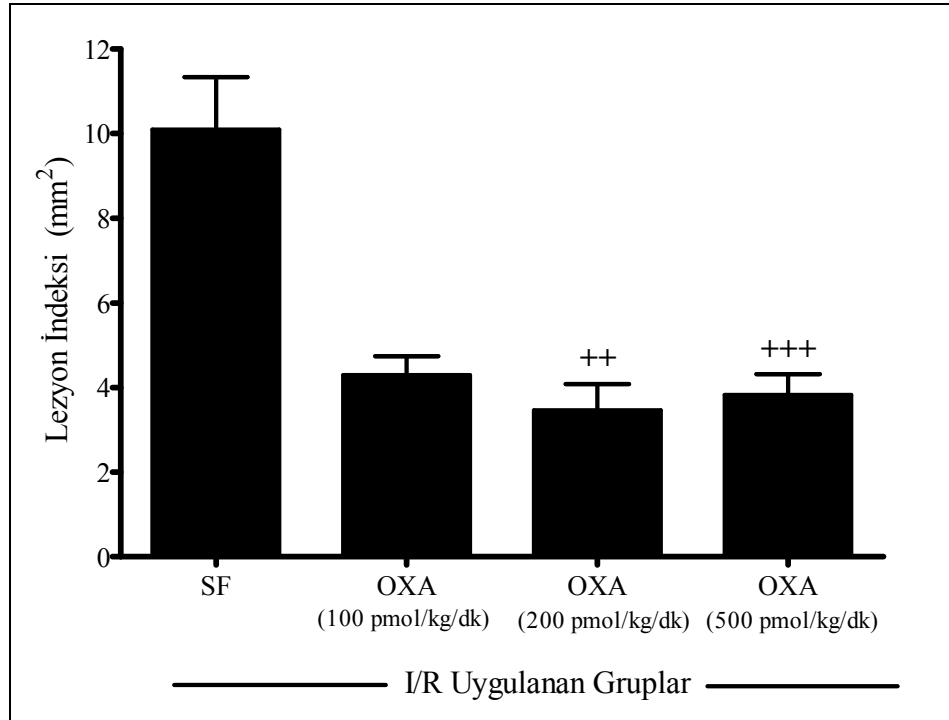
İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad (Prism 5) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar için Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve grupların ikili karşılaştırılmalarında Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart hata şeklinde ifade edilmiştir. Bütün analizlerde $p < 0,05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Oreksin-A Etkin Dozunun Belirlenmesi

Mide asit sekresyonunun stimülasyonunda etkili olduğu bilinen 100, 200 ve 500 pmol/kg/dk'lık OXA dozları ile yapılan deneyler sonucunda, çalışmamızda kullanılacak en etkin OXA dozu belirlenmiştir. Bu ön çalışmada, kullanılan OXA dozlarının mide lezyon indeksi ve mide mukozal kan akımı üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir.

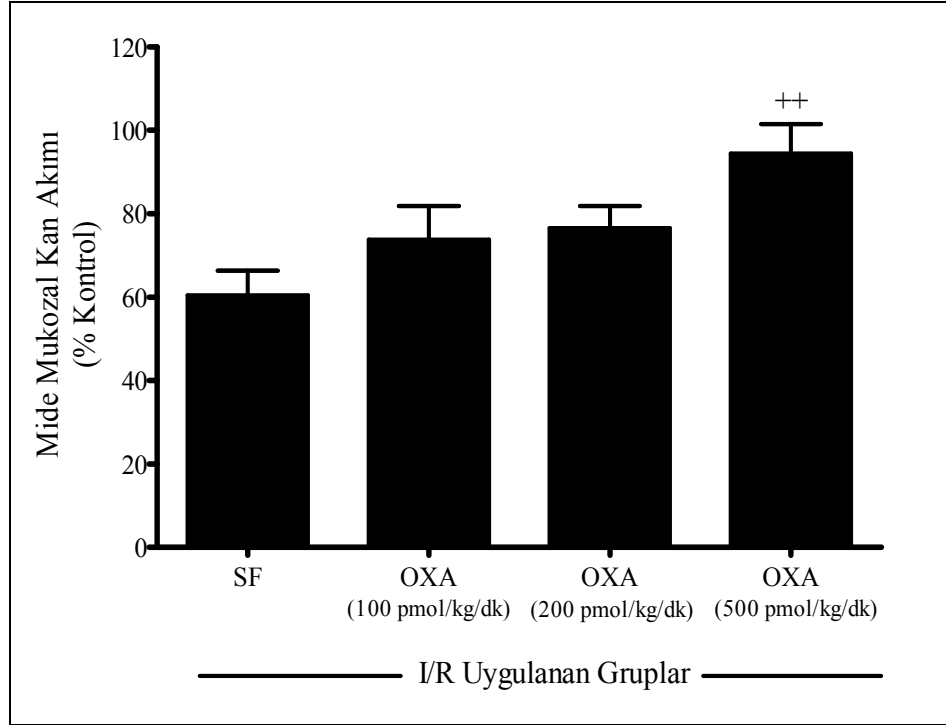
Lezyon indeksi çalışmasında 200 ve 500 pmol/kg/dk dozlarda OXA'nın I/R'nin neden olduğu mukozal hasarı ($10,09 \pm 1,24 \text{ mm}^2$) önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (sırasıyla; $3,46 \pm 0,62$; $p<0.01$ ve $3,82 \pm 0,49 \text{ mm}^2$; $p<0.001$) (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Farklı dozlarda OXA uygulamasının lezyon indeksine etkileri

++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ SF grubu ile karşılaştırma

Kontrole göre yüzde olarak hesaplanmış olan mide mukozal kan akımı sonuçları, 500 pmol/kg/dk'lık OXA dozunun I/R grubunda $60,40 \pm 5,97$ olan mukozal kan akımı değerini $94,40 \pm 7,10$ düzeyine çıkardığı gözlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Farklı dozlarda OXA uygulamasının mukoza kan akımına etkileri

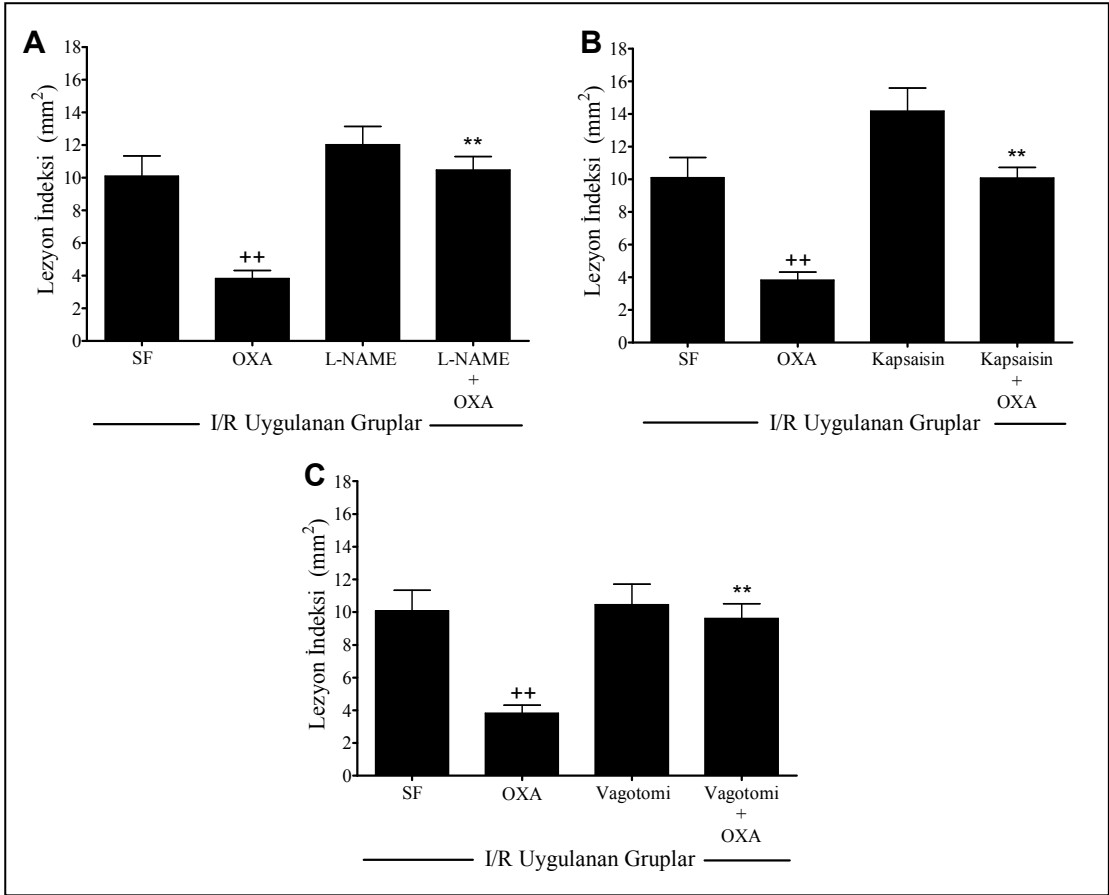
++ $p<0,01$ SF grubu ile karşılaştırma

Her iki değişkene ilişkin sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, 500 pmol/kg/dk'lık OXA dozunun en etkin doz olduğuna karar verilmiş ve çalışmanın devamında OXA uygulamaları için bu doz kullanılmıştır.

4.2. Lezyon İndeksi

3,5 saatlik I/R uygulaması mide mukozasında $10,09 \pm 1,24 \text{ mm}^2$ 'lik lezyon alanının oluşmasına neden olmuştur. 500 pmol/ml/dk'lık OXA infüzyonu, lezyon alanının $3,82 \pm 0,49 \text{ mm}^2$ 'ye düşmesini sağlamıştır ($p<0,01$). L-NAME uygulaması tek başına mide hasarı üzerine önemli bir etki göstermemiş, L-NAME + OXA uygulanan grupta OXA'nın I/R hasarına karşı koruyucu etkisinin ortadan kalktığı gözlenmiştir ($10,47 \pm 0,83 \text{ mm}^2$) ($p<0,01$).

Benzer şekilde, sadece kapsaisin ve vagotomi uygulanan gruplarda mide lezyon indeksi SF grubuna göre önemli bir fark göstermemiş, Kapsaisin + OXA ve Vagotomi + OXA gruplarında OXA'nın mide hasarını önleyici etkisinin önemli oranda ortadan kalktığı görülmüştür (sırasıyla $10,08 \pm 0,64 \text{ mm}^2$; $p<0,01$ ve $9,61 \pm 0,89 \text{ mm}^2$; $p<0,01$) (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Lezyon indeksi

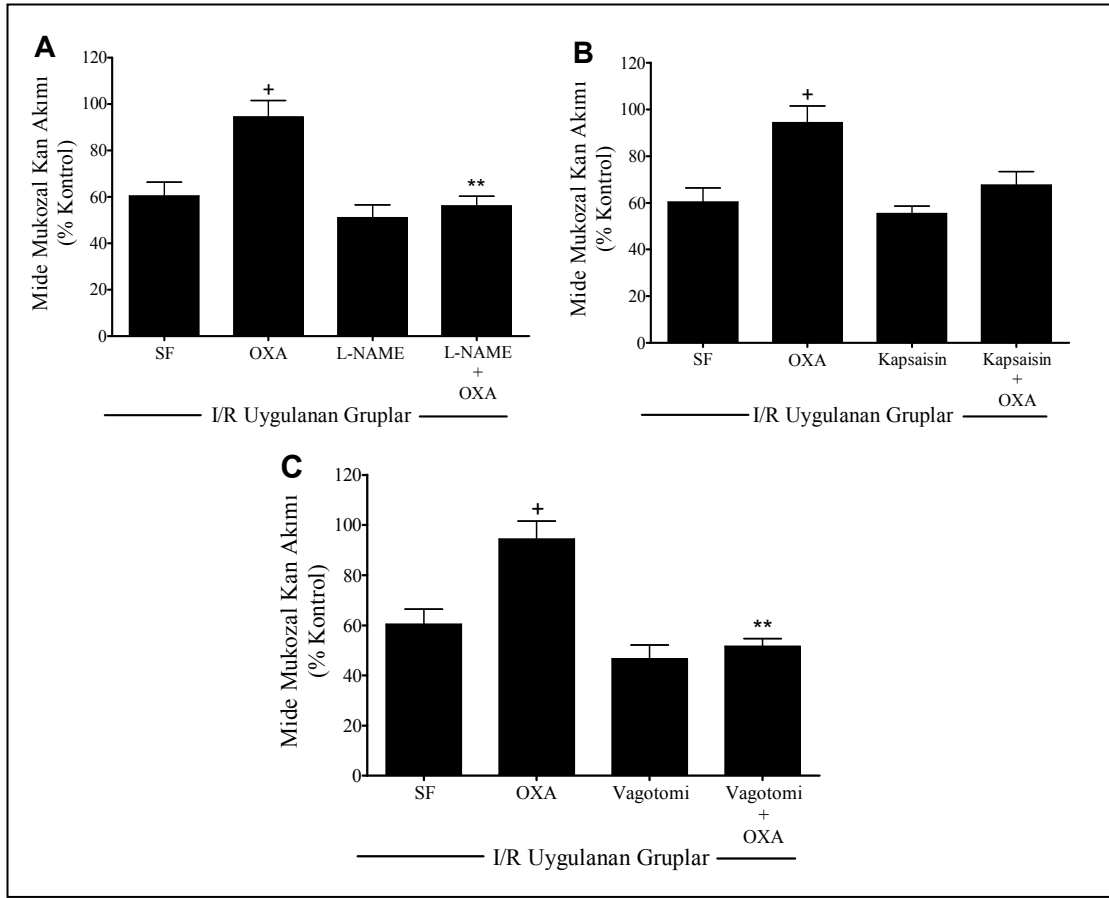
- A.** L-NAME (30 mg/kg; i.v) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
B. Kapsaisin (125 mg/kg;s.c.) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
C. Bilateral subdiyafragmatik vagotomi uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

++ $p<0,01$ SF grubu ile karşılaştırma

** $p<0,01$ OXA grubu ile karşılaştırma

4.3. Mukoza Kan Akımı

SF grubundaki hayvanlarda $60,40 \pm 5,97$ olarak saptanan mide mukozal kan akımı OXA uygulanan grupta $94,40 \pm 7,10$ düzeyine çıkmıştır ($p<0,05$). L-NAME, Kapsaisin ve Vagotomi gruplarında kan akımı değerleri SF grubuna göre farklı bulunmamıştır. L-NAME + OXA ve Vagotomi + OXA gruplarında ise OXA'nın kan akımını artırıcı etkisi önemli ölçüde azalmıştır (sırasıyla $56,18 \pm 4,06$; $p<0,05$ ve $51,61 \pm 3,15$; $p<0,01$). Kapsaisin + OXA grubunda gözlenen kan akımındaki azalma ise OXA grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Mukoza kan akımı değerleri

A. L-NAME (30 mg/kg; i.v) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

B. Kapsaisin (125 mg/kg;s.c.) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

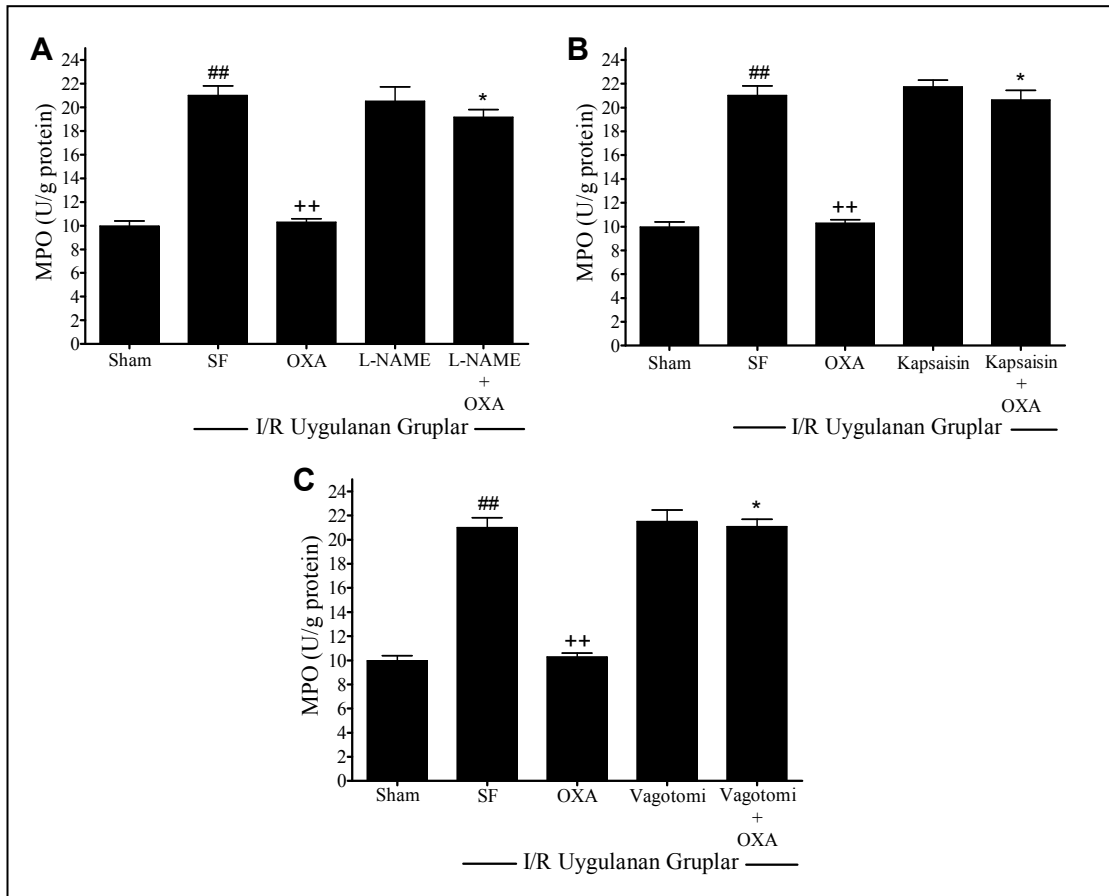
C. Bilateral subdiyafragmatik vagotomi uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

+ $p<0,05$ SF grubu ile karşılaştırma

** $p<0,01$ OXA grubu ile karşılaştırma

4.4. MPO Aktivitesi

Mide dokusunda nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan MPO enziminin aktivitesi sham grubunda $9,97 \pm 0,42$ U/g protein olarak ölçülmüştür. I/R uygulanan SF grubunda enzim aktivitesi $21,01 \pm 0,80$ U/g protein değerine ulaşmıştır ($p<0,01$). OXA infüzyonu, MPO aktivitesininin I/R'a bağlı artışını önemli ölçüde azaltmıştır ($10,28 \pm 0,30$ U/g protein; $p<0,01$). L-NAME, Kapsaisin ve Vagotomi gruplarında MPO aktivitesi SF grubundan farklı bulunmamıştır. L-NAME, kapsaisin ve vagotominin OXA ile birlikte uygulandığı gruplarda, OXA'nın MPO aktivitesine etkisi ortadan kalkmıştır (sırasıyla $19,16 \pm 0,66$ U/g protein, $20,65 \pm 0,80$ U/g protein ve $21,08 \pm 0,61$ U/g protein; $p<0,05$) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. MPO aktivitesi

- A. L-NAME (30 mg/kg; i.v) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
B. Kapsaisin (125 mg/kg;s.c.) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
C. Bilateral subdiyafragmatik vagotomi uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

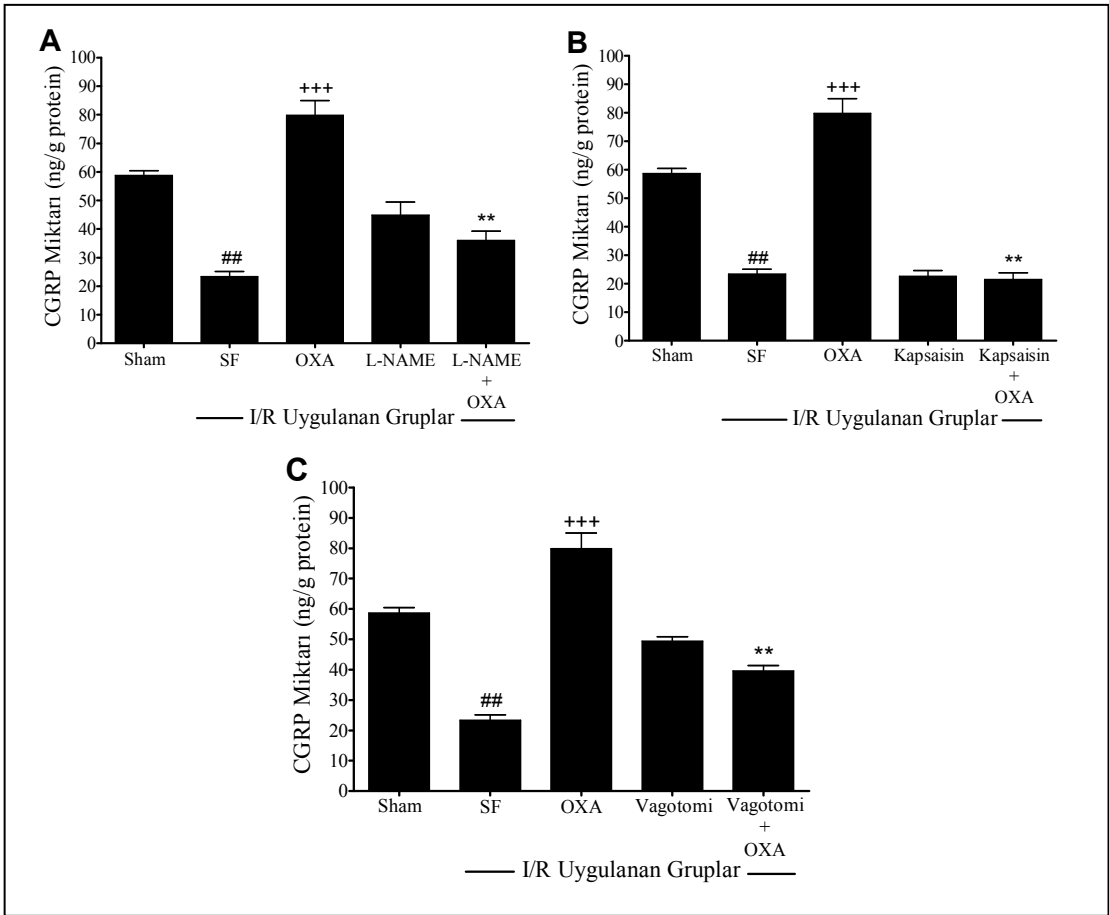
$p<0,01$, ### $p<0,001$ Sham grubu ile karşılaştırma

++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ SF grubu ile karşılaştırma

* $p<0,05$ OXA grubu ile karşılaştırma

4.5. CGRP Düzeyleri

I/R uygulanan SF grubundaki hayvanların mide dokusunda bulunan CGRP ($23,33 \pm 1,80$ ng/g protein), Sham grubuna göre ($58,69 \pm 1,76$ ng/g protein) önemli ölçüde azalmıştır ($p < 0,01$). OXA infüzyonu CGRP düzeyini SF grubuna göre anlamlı miktarda artırmıştır ($79,84 \pm 5,16$ ng/g protein; $p < 0,001$). L-NAME, kapsaisin veya vagotomi uygulanması mide dokusunda bulunan CGRP miktarını değiştirmemiş, L-NAME + OXA ($36,00 \pm 3,30$ ng/g protein), Kapsaisin + OXA ($21,55 \pm 2,25$ ng/g protein) ve Vagotomi + OXA ($39,55 \pm 1,81$ ng/g protein) gruplarında CGRP düzeyleri OXA grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0,01$) (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. CGRP düzeyleri

A. L-NAME (30 mg/kg; i.v) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

B. Kapsaisin (125 mg/kg;s.c.) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

C. Bilateral subdiyafragmatik vagotomi uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

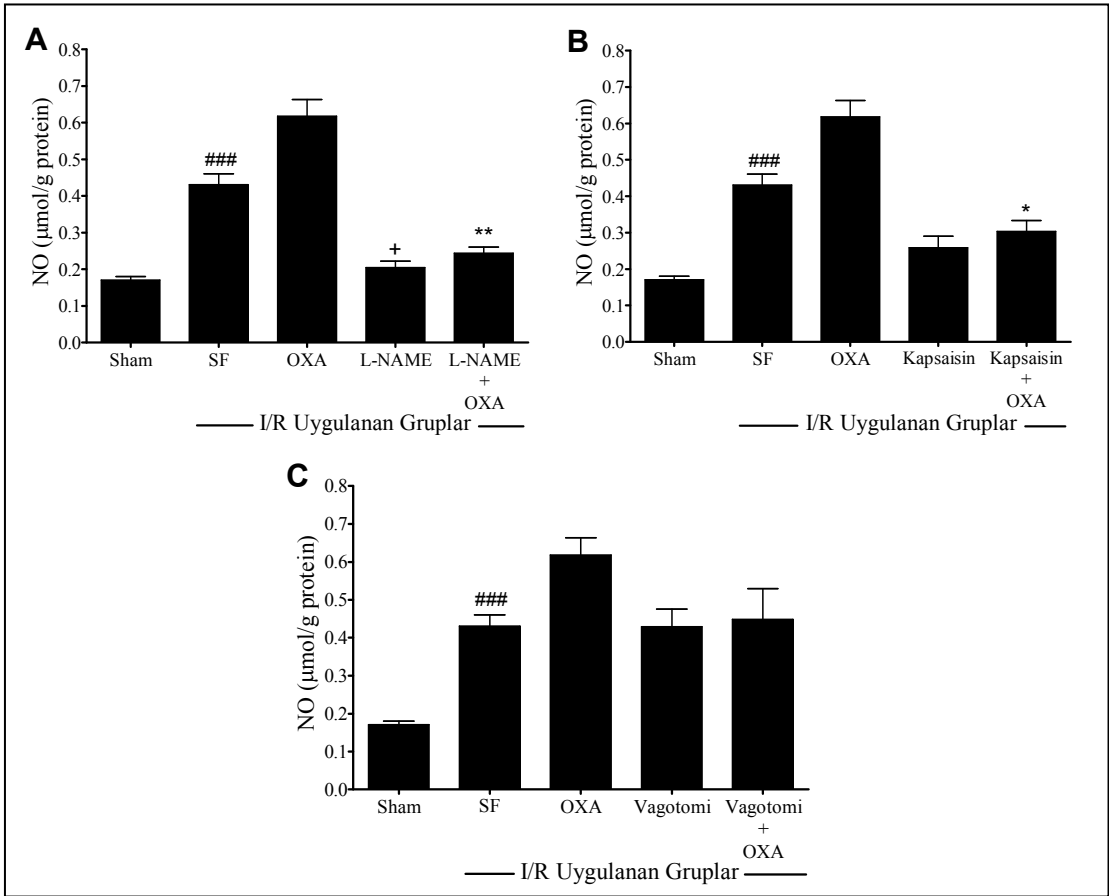
$p < 0,01$ Sham grubu ile karşılaştırma

+ $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ SF grubu ile karşılaştırma

** $p < 0,01$ OXA grubu ile karşılaştırma

4.6. NOx Değerleri

Mide dokusunda bulunan NO miktarı sham grubunda $0,17 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g}$ protein iken I/R uygulaması SF grubunda önemli bir artışa neden olmuştur ($0,43 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$ protein) ($p < 0,001$). OXA infüzyonu önemli bir değişiklik yapmamış, L-NAME grubunda ise NO değeri ($0,20 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ protein) SF grubuna göre önemli oranda azalmıştır ($p < 0,05$). L-NAME + OXA ve Kapsaisin + OXA gruplarında ölçülen NO miktarları (sırasıyla $0,24 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ protein; $p < 0,01$ ve $0,30 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$ protein; $p < 0,05$) OXA grubundan ($0,62 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/g}$ protein) düşük bulunmuştur (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. NOx değerleri

- A.** L-NAME (30 mg/kg; i.v) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
B. Kapsaisin (125 mg/kg; s.c.) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
C. Bilateral subdiyafragmatik vagotomi uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

$p < 0,001$ Sham grubu ile karşılaştırma

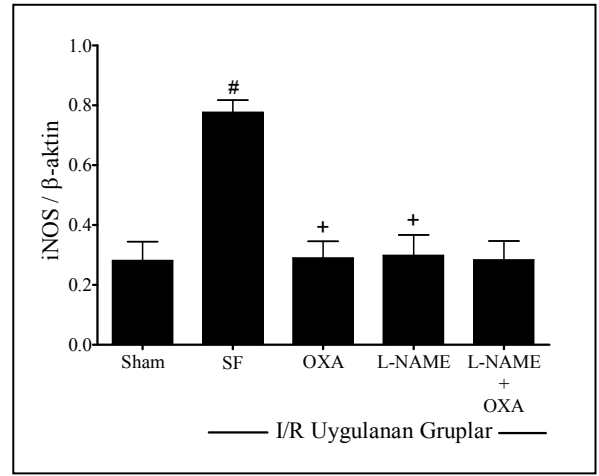
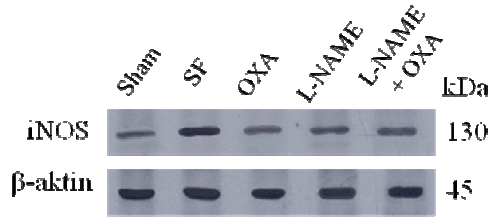
+ $p < 0,05$ SF grubu ile karşılaştırma

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ OXA grubu ile karşılaştırma

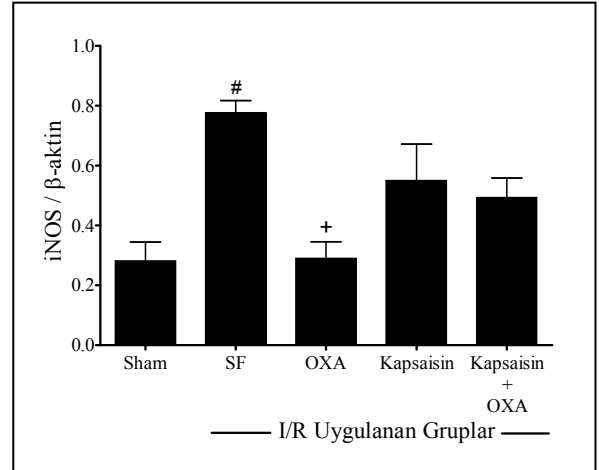
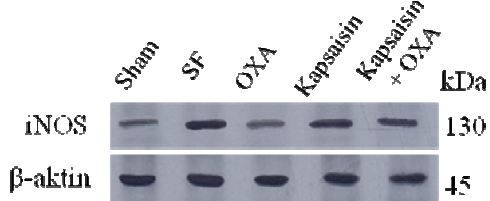
4.7. iNOS Protein Ekspresyonu

Sham grubunda $0,28 \pm 0,06$ olarak belirlenen iNOS/ β -aktin oranı SF grubunda önemli oranda artmıştır ($0,78 \pm 0,04$) ($p < 0,05$). OXA uygulaması iNOS protein ekspresyonunda, SF grubuna göre önemli bir düşüşe neden olmuştur ($0,29 \pm 0,06$) ($p < 0,05$). L-NAME grubunda iNOS/ β -aktin oranının SF grubuna göre önemli düzeyde azalmış olduğu tespit edilmiştir ($0,30 \pm 0,07$ ve $0,28 \pm 0,06$) ($p < 0,05$). L-NAME ve OXA'nın birlikte uygulandığı grupta iNOS/ β -aktin oranı OXA ve L-NAME grubundan farklı bulunmamıştır. Kapsaisin ($0,55 \pm 0,12$) ve vagotomi ($0,69 \pm 0,09$) gruplarında SF grubuna göre, Kapsaisin+OXA ($0,49 \pm 0,06$) ve L-NAME+OXA ($0,62 \pm 0,10$) gruplarında da OXA grubuna göre iNOS düzeylerinde önemli bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.8.).

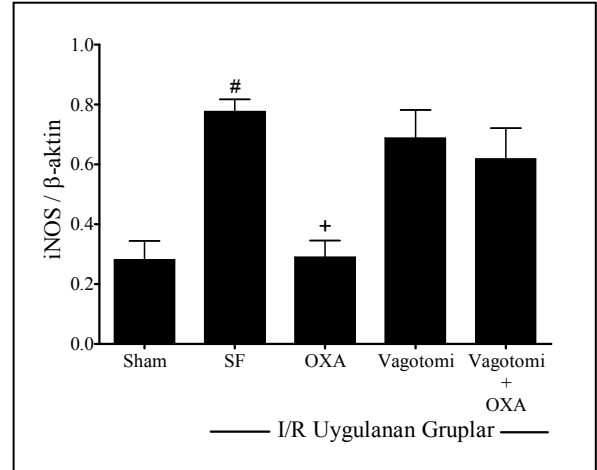
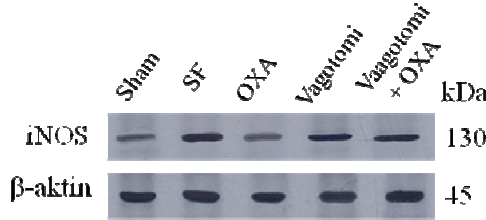
A



B



C



Şekil 4.8. iNOS protein ekspresyonu düzeyleri

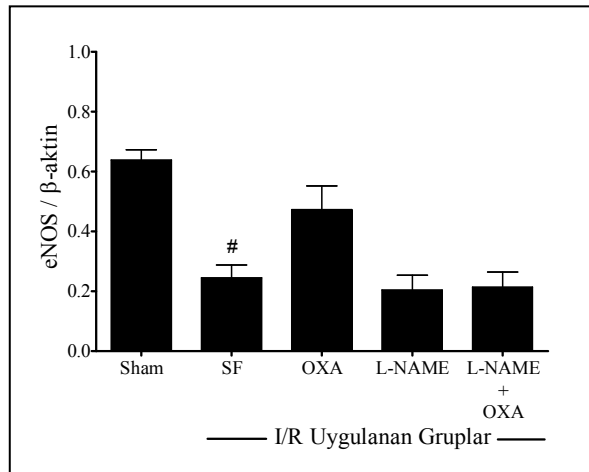
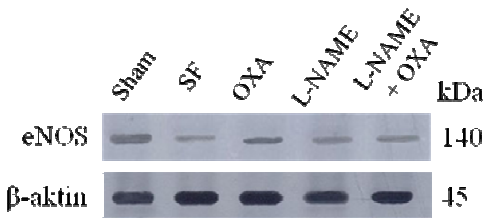
- A. L-NAME (30 mg/kg; i.v) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
 B. Kapsaisin (125 mg/kg;s.c.) uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması
 C. Bilateral subdiyafragmatik vagotomi uygulanan gruplarla SF ve OXA gruplarının karşılaştırılması

p<0,05 Sham grubu ile karşılaştırma

+ p<0,05 SF grubu ile karşılaştırma

4.8. eNOS Protein Ekspresyonu

Sham grubunda $0,64 \pm 0,03$ olarak belirlenen eNOS/β-aktin oranı I/R uygulamasıyla birlikte önemli oranda azalmıştır ($0,25 \pm 0,04$) ($p<0,05$). I/R ile eşzamanlı olarak uygulanan OXA; eNOS protein ekspresyonunda istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmamıştır ($0,47 \pm 0,08$). L-NAME ($0,20 \pm 0,05$) ve L-NAME + OXA ($0,21 \pm 0,05$) gruplarında ölçülen eNOS düzeyleri sırasıyla SF ve OXA gruplarından farklı bulunmamıştır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. eNOS protein ekspresyonu düzeyleri

p<0,05 Sham grubu ile karşılaştırma

TARTIŞMA

Mide mukozasında I/R hasarına karşı, OXA'nın koruyucu etki mekanizmasını konu alan çalışmamızda, NO, kapsaisine duyarlı duysal sinirler ve N. vagus'un rolü araştırılmıştır. Yapılan ön çalışmada infüzyon yoluyla verilen farklı dozlarda OXA'nın, midedeki mukoza hasarını önleyici etkin dozunun 500 pmol/kg/dk olduğu saptanmıştır. OXA'nın, I/R hasarına karşı mide mukozasını koruduğu gösterilmiş olup, NO sentezinin engellenmesi, kapsaisin ile duysal sinirlerin denervasyonu ve bilateral subdiyafragmatik vagotomi yapılması durumunda bu koruyucu etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. OXA'nın mukozal kan akımını ve CGRP salınımını artırarak, nötrofil infiltrasyonunu baskılayarak, bunun yanı sıra iNOS ekspresyonunu azaltıp, eNOS ekspresyonunu artırarak mide mukozasını I/R hasarına karşı korumuş olabileceği düşünülmüştür.

I/R hasarı mikrovasküler fonksiyon bozukluğu, nötrofil aktivasyonu ve ROS'ların aşırı miktarda yapımı ile ortaya çıkan akut mide lezyonları için iyi bilinen bir modeldir [13, 192, 193]. Yapılan çalışmalarda kısa süreli iskemi periyodlarının bile, inflamasyon sürecine ait çeşitli mediatörlerin salınımına ve lökosit aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Çöliak arterin klemplenmesi ile oluşturulan iskemi, mide mukozal bariyerini zayıflatıp, mukozadan asit geri emilimini artırarak mukozayı daha kolay tahrip edilebilir duruma getirmektedir. Reperfüzyon sonucu dokunun yeniden kanlanması ile oluşan ROS ve nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonunu artırarak mide asidinin zararlı etkisi ile birlikte hücre ölümüne ve mukozal hasara neden olmaktadır. Reperfüzyonun başlangıcında yüzeysel kanama şeklinde oluşan lezyonlar, dokuda nötrofil birikimi ile birlikte ülserleşmiş lezyonlar haline dönüşmektedir [183, 194, 195].

Kolesistokinin, gastrin, leptin ve ghrelin gibi iştah peptidlerinin mide mukozal bariyerini güçlendirerek ülser oluşumunu engelledikleri, aynı zamanda ülser iyileşmesinde önemli roller üstlendikleri önceki çalışmalarda gösterilmiştir [133, 192, 196-199]. Bu çalışmada, ekzojen OXA'nın I/R ile oluşan mide lezyonlarına karşı koruma sağladığı gösterilmiş olup, bu bulgu daha önceki çalışmamızı [95] desteklemektedir. OXA'nın mide korunmasında önemli rolü olduğuna ilişkin bulgularımız, sindirim sistemindeki sinir ve endokrin hücrelerin OXA immunoreaktivitesi gösterdiğine ilişkin mevcut kanıtlarla da uyum içerisinde [3, 4].

Bulgularımıza göre midede I/R hasarına karşı OXA'nın koruyucu etkisinin önemli bir bileşeninin mukozal kanlanma artışı olduğu söylenebilir. Vazodilatör etkileri nedeni ile kanlanmayı artırdıkları bilinen NO'nun ve CGRP'nin yapımının ve salınımının inhibe edilmesi, aynı zamanda vagotomiye bağlı olarak OXA'nın mide mukozasını koruyucu etkisinin ortadan kalkmış olması bu görüşümüzü desteklemektedir. OXA'nın I/R'nin neden olduğu kan akımı azalışını önlemesi ve mide kanlanmasını artırarak sağladığı koruma diğer iştah peptidleri ile yapılan çalışmalarla uyumludur [192, 193].

Mide mukozasının zararlı etkilere karşı korunma mekanizmasında kanlanma önemli yer tutmaktadır. Mukozal mikrodolaşım, oksijen ve besinlerin hücrelere ulaşması, aynı zamanda toksik maddelerin ortamdan uzaklaştırılması için gereklidir [122]. Mide mukozasının iritan maddelerle karşılaşması veya asit geri emilimi olması halinde mukozal kan akımı hızlı bir şekilde artar [130]. Kan akımının artışı, geri emilen asitin veya zararlı ajanların dilüsyonu veya tamamen uzaklaştırılmasını sağlar. Bu cevap mukozal savunma için gereklidir. Kan akımının mekanik olarak kısıtlanması ile, gerekli durumlarda kan akımı artışının sağlanamaması nekroza yol açar [130, 131]. Mide mukozasında zararlı etkenlerin varlığına bağlı olarak hiperemik yanıtın oluşumunda duysal sinirlerin rol aldığı gösterilmiştir [14, 16].

Yapılan çalışmalarda akut mide hasarına karşı mide mukozasının korunma mekanizmasında kapsaisin'e duyarlı duysal sinirlerin aktivasyonu sonucu salgılanan CGRP'nin vazodilatör etkisinin önemli olduğu gösterilmiştir [17, 133]. Midedeki duysal nöronlara ait çalışmalarda kapsaisin'in etkisinin doza bağlı olarak değişebileceği ortaya konmuştur. Kapsaisin'in düşük dozda uygulandığı zaman, nöronlar üzerine stimulan etki gösterdiği, mide mukozasını pilor ligasyonu, etanol veya aspirin gibi ülserojenler tarafından oluşturulan lezyonlara karşı koruduğu gösterilmiştir [200, 201]. Bu etki mide mukozasında kapsaisin'e duyarlı duysal sinirlerden salınan CGRP gibi vazodilatör peptidlerin artışına bağlanmıştır [190, 200]. Diğer taraftan bizim de çalışmamızda kullandığımız 125 mg/kg'lık yüksek doz kapsaisin'in uygulanması halinde duysal sinirlerin fonksiyonel denervasyonu sağlanmış ve lezyonların daha da arttığı gözlenmiştir [202, 203]. Duysal sinirlerden CGRP salınması, kan akımını ve ülser iyileşmesini artırıcı etkisi nedeniyle mukozal bütünlüğün sağlanmasında önemlidir. Bu sinirlerin fonksiyonel denervasyonu, CGRP miktarında ve buna bağlı olarak PGE₂ ve NO miktarındaki azalma ile birlikte ülserojenler ile oluşturulan mide lezyonlarında artışa neden olur [202, 203]. Çalışmamızda da bu çalışmaları destekler nitelikte, kapsaisin ile duysal sinirlerin denerve edilmesi durumunda OXA'nın kan akımını artırıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlı çıkmamış olsa da %30 oranında azalmıştır ve bu azalışın kapsaisin ile denervasyon sonucu OXA'nın mide lezyonlarını azaltıcı etkisinin bozulmuş olmasına eşlik ettiği görülmüştür. Midede akut mukozal tahribata cevap olarak salgılanan CGRP, NOS aktivasyonu yaparak NO salınımını artırmaktadır. NO vazodilatör etkisi nedeniyle mukozal kanlanmayı artırarak mukozal bariyeri güçlendirmektedir. Çalışmamızda da gösterdiğimiz gibi NOS inhibitörü kullanarak NO yapımının baskılanması, mukozal kanlanmayı azaltmakta ve lezyon indeksini artırmaktadır. Bulgularımız OXA'nın mide koruyucu etkisinde vagal yolağın da önemli olduğunu göstermiştir. N. vagus'un bütünlüğünün bozulması durumunda OXA'nın kan akımını artırıcı ve mukozayı koruyucu etkisinin ortadan kalktığı tespit edilmiştir.

Midede I/R hasarı mikrovasküler fonksiyon bozukluğunun yanı sıra, nötrofil aktivasyonu ve ROS'ların aşırı yapımının bir sonucudur. I/R hasarına yol açan ROS'ların esas kaynağı polimorfonükleer lökositlerdir. MPO nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan hem içeren bir enzimdir ve bu enzimin aktivitesi dokudaki nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesidir. Damar endotel hücrelerine lökositlerin yapışması, etanol, aspirin, hemorajik şok, iskemi-reperfüzyon gibi çok sayıda etkenle ortaya çıkan akut mide lezyonlarının patogeneğinde önemli yer tutmaktadır [204].

Lökositler mikrodamarları tıkayarak mide kan akımını azaltırlar, aynı zamanda lökotrienler, trombosit aktive edici faktör gibi mediatörleri salgılayarak mide mukozasının tahribatına neden olurlar [201]. Daha önceki çalışmamızda da gösterdiğimiz gibi OXA, I/R ile artan MPO aktivitesini belirgin şekilde azaltmaktadır [95]. OXA'nın bu etkisi NO yapımı inhibe edilerek, duysal sinirlere denervasyon yapılarak veya subdiyafragmatik vagotomi ile ortadan kaldırılmıştır. OXA'nın nötrofil infiltrasyonunu engelleyici etkisinin NO, CGRP ve N. vagus aracılı olduğunu gösteren bulgularımız, NO ve duysal sinir uçlarından salınan CGRP'nin nötrofil aktivasyonunu baskıladığını gösteren çalışmalarla uyum içindedir [205]. Ancak N. vagus'un mide dokusunda nötrofil infiltrasyonuna etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Vagotomi, I/R uygulanan sıçanların mide mukozasında OXA'nın etkisi ile gözlenen MPO aktivitesindeki düşüşü engelleyerek kontrol düzeyinde kalmasına neden olmuştur. N. vagus sindirim sisteminin ekstrinsik innervasyonunun önemli bir parçasıdır. Farklı tiplerde efferent ve afferent lifler (kolinerjik, katekolaminerjik, non-adrenerjik-non-kolinerjik) içeren sinirin, sindirim sistemine etkisi çok karmaşıktır. Yapılan çalışmalarda sindirim sisteminin zararlı etkenlere karşı direnç gösterebilmesi ve mukozanın korunabilmesi için N. vagus'un fonksiyonu gereklidir [206]. N. vagus'un mide mukozasına koruyucu etkisinde mukozal kan akımına yaptığı katkının yanı sıra, nötrofil infiltrasyonunu engellemesi de önemli rol oynayabilir. Mideye olan merkezi parasempatik akışın periferik OXA tarafından artırılabilmesi ve bu peptidin periferik uygulamasının neden olabileceği mide korumasında vagal efferent sinirlerin de katkısının olabileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir. OXA'nın mide asit sekresyonu üzerine stimülatör etkisi için vagal yolağa gereksinim duyduğu, çünkü vagotominin, merkezi olarak uygulanan OXA tarafından indüklenen mide asit sekresyonundaki artışı inhibe ettiği ileri sürülmektedir [8]. Ayrıca Kobashi ve ark. [93], vagotominin sıçanlarda OXA'nın indüklediği fazik kontraksiyonu ve proksimal mide gevşemesini zayıflattığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da vagotomi, OXA'nın mide mukozasını koruyucu etkisini zayıflatmış ve bu zayıflamaya eşlik ettiği görülen mide kan akımı artışı da intakt N. vagus'un OXA'nın neden olduğu koruma ve hiperemide önemli bir rolünün olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla I/R ile oluşturulan hasara karşı OXA'nın koruyucu etkisinin en azından kısmen de olsa beyin-bağırsak ekseninin ve vagal kolinerjik yolların stimülasyonunun, afferent duysal sinirlerden salınan endojen CGRP'nin koruyucu etkisine katkıda bulunduklarını söylemek mümkündür.

Mide mukozası ve submukozal damarlar primer afferent duysal sinirler ile innerve edilmiştir. Yüzey epitel hücrelerinin yakınında sonlanan bu sinir liflerinin uçları lümen içeriğine ve asite duyarlı kanallar aracılığı ile mukozaya geri dönen asite duyarlıdır. Midedeki duysal sinirlerin stimülasyonu büyük submukozal damarların yakınında veya duvarında sonlanan sinir uçlarından CGRP, SP gibi nörotransmitterlerin salınımına neden olur [16]. Duysal liflerin aktivasyonu sonucu salınan CGRP, submukozal arteriollerin tonusunu etkileyerek mukozal kan akımını artırır [14].

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre, OXA'nın mide mukozasını koruyucu etkisinin, duysal sinir aktivasyonuna da bağlı olabileceği ortaya çıkmaktadır. I/R sonucu %60,35 oranında azalmış olan mide mukozasındaki CGRP miktarı, OXA infüzyonu ile sham grubuna göre daha yüksek bir değere ulaşmıştır. Bulgula-

rımız OXA'nın bu etkisinin NO aracılı olabileceğini göstermektedir. NOS inhibitörü olan L-NAME uygulaması ile NO sentezinin baskılanması durumunda OXA'nın CGRP salınımını artırıcı etkisi bozulmuştur. Bu bulgumuz, NO sentaz inhibitörlerinin hem kapsaisin'e hem de CGRP'ye olan gastrik hiperemik reaksiyonu azalttığını gösteren çalışmalarla uyumludur [20, 207]. NO'nun CGRP salınımını artırıcı etkisi bilinmemektedir. Ancak Jenkins ve ark. [208] PGE₂'nin trigeminal nöron kültürlerinde EP2 ve EP4 reseptörlerine bağlanarak CGRP salınımını arttırdığını göstermişlerdir. NO, COX-1 enziminin aktivitesini artırarak PG sentezini artırmaktadır [190]. Buna göre OXA etkisi ile oluşan NO'nun PGE₂ sentezini, PGE₂'nin de CGRP salınımını arttırdığı düşünülebilir. Vagotomi de NO sentezinin baskılanmasına benzer şekilde mide dokusundaki CGRP miktarını azaltmıştır. Afferent sinir liflerinin midede mukozal savunmayı güçlendirici etkisinin vagal efferentler tarafından stimüle edildiği bilinmektedir. TRH'nın intrasisternal uygulanması ile vagus sinirindeki kolinerjik efferent liflerin aktivasyonu sonucu kapsaisin'e duyarlı afferent nöronlardan CGRP salınımı olması, N. vagus'un mide mukozasını koruyucu etki mekanizmasında duysal sinirlerin de rol aldığını göstermektedir [14, 162, 209].

Duysal nöronların mide mukozası üzerine regülatör etkilerinin CGRP'nin yanı sıra NO aracılığıyla olduğu bilinmektedir [14]. NO, NOS enzimi tarafından elektron oksidasyon reaksiyonu ile L-arjininden sentezlenen küçük biyoaktif bir moleküldür. NOS izoformlarından, nNOS ve eNOS Ca⁺⁺'a bağlı yapısal formlar olup (cNOS), doku homeostasisinden sorumludur. Ca⁺⁺'a bağlı olmayan indüklenebilir NOS formu ise iNOS'tur [168, 170].

Yapısal NOS'lar normal koşullarda dokularda az miktarda (pmol/L) NO yapmakla görevlidir. Sindirim sisteminde nNOS ile oluşan NO'nun ana rolü düz kasların gevşemesinin kontrolüdür. eNOS, trombositler ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır. eNOS mide mukozal kan akımı, epitel sekresyonu, bariyer fonksiyonunu düzenleyerek sindirim sistemi mukozasının bütünlüğünün korunmasında rol oynar. Aynı zamanda, eNOS kökenli NO, lökosit, trombosit ve mast hücre adezyonunun inhibisyonundan sorumludur [170].

eNOS ve nNOS aktivasyonu Ca ve CaM konsantrasyonundaki artışa bağlıdır. Özellikle eNOS, protein kinaz Akt ile fosfotazları ve kinazları regüle eder. Diğer taraftan iNOS aktivitesi, transkripsiyonel düzeyde regüle edilir. iNOS izoformunun ekspresyonu, sitokinler gibi stimulan faktörlerle oluşur ve iNOS aracılı NO yapımı nmol/L düzeyindedir. iNOS izoformu endotel hücreleri, düz kas hücreleri, nötrofiller ve makrofajlarda bulunmaktadır. iNOS sindirim sistemini etkileyen patolojik olaylarda (özellikle I/R gibi inflamatuvar süreçlerde) büyük miktarda NO yapımına neden olur [210, 211].

Mide mukozasındaki nitrit/nitrat konsantrasyonu (NO_x), mide mukozasındaki iNOS ve/veya cNOS'a bağlı NO yapımının bir göstergesi olarak düşünülebilir. Çünkü dokuda NOS etkisi ile yapılan NO hızla nitrit ve nitrata parçalanır. Dokuda NOS aktivitesinin inhibisyonu ise nitrit ve nitrat miktarını azaltır [212, 213].

Çalışmamızda I/R uygulanan sıçanlarda OXA infüzyonu ile mukozal kan akımı artışı, CGRP düzeyinin artışı, nötrofil infiltrasyonunun azaldığını gösteren

parametreleri destekler nitelikte mide dokusunda NO yapımının %44,18 oranında arttığı gözlenmiş, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Beklentimize uygun olarak L-NAME kullanımı I/R uygulanan sıçanların mide dokusunda NO yapımını azaltmış, aynı zamanda infüze edilen OXA'nın NO yapımı üzerine olan etkisini önlemiştir. Daha önce yapılan çalışmalara paralel şekilde, duysal sinirlerin kapsaisin ile denervasyonu da NO yapımında azalmaya neden olmuştur [197]. CGRP reseptörlerinin mide arteriyollerinin endotel hücreleri üzerindeki lokalizasyonu, CGRP'nin NO sentezini stimüle etmek için primer olarak endotel hücreleri üzerine etki ettiğini göstermektedir [20, 207]. Kapsaisin OXA'nın NO yapımını arttırıcı etkisini de azaltmıştır. Buna karşın vagotomi NOS aktivasyonu ve NO yapımını etkilememiştir.

Mideye uygulanan I/R, daha önce yapılan çalışmaların bulgularına paralel olarak [194, 214] iNOS ekspresyonunu belirgin şekilde artırmış, eNOS ekspresyonunda ise azalmaya neden olmuştur. Bu bulgu, eNOS ile sınırlı düzeyde yapılan NO'nun I/R hasarına karşı koruyucu olduğu, I/R sırasında artmış olan iNOS tarafından fazla miktarda yapılan NO'nun mukozada lezyon oluşumunu arttırıcı etkiye sahip olduğu fikrini vermektedir. Ohta ve ark. [213] iNOS'un spesifik inhibitörü olan aminoguanidin ile mukozal lezyon oluşumunun önlendiğini göstermişler, iNOS aktivitesi ile NOx arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir. Ohta ve ark. ve diğer araştırmacılar, iNOS aracılığıyla yapılan NO'nun lipid peroksidasyonu ve protein olmayan sülfidril oksidasyonuna neden olduğunu ileri sürmektedirler [213, 215-218]. Dokuda oluşan NO ve O₂⁻ radikallerinin oluşturduğu ONOO⁻, lipid peroksidasyonu ve diğer moleküllerin oksidasyonu ile lezyon oluşumuna neden olmaktadır [217, 219]. Dokuda oluşan az miktarda NO tek başına düşünüldüğü zaman vazodilatör, endotele nötrofil yapışmasını engelleyici etkisi nedeni ile koruyucudur. NO'nun süperoksit radikali ile birleşmesi sonucu oluşan ONOO⁻'in, lipid peroksidasyonu nedeniyle mide mukozası üzerine olan zararlı etkileri gösterilmiştir [170].

Her iki bulguyu birlikte değerlendirdiğimizde, I/R sonrası mide dokusunda tespit ettiğimiz yüksek NO konsantrasyonunun iNOS ekspresyonuna bağlı olduğu ortaya çıkmaktadır. OXA infüzyonu, I/R uygulanan mide dokusunda iNOS ekspresyonunun artışını engellemiş, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da eNOS ekspresyonunda artışa neden olmuştur. OXA grubunun mide dokusundaki NO miktarında gözlenen %44,18'lik artışa paralel şekilde eNOS ekspresyonu da %88 oranında artmıştır. OXA'nın mide mukozasındaki koruyucu etkisine muhtemelen eNOS tarafından yapılan NO'nun aracılık ettiği düşünülmektedir. L-NAME uygulaması, iNOS ve eNOS ekspresyonunu baskılamıştır. OXA ile birlikte L-NAME verilmesi, OXA ile birlikte duysal sinirlerin denervasyonu veya OXA ile birlikte vagotomi uygulaması mide dokusunun iNOS ve eNOS ekspresyonunda bir değişikliğe neden olmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada; OXA'nın mide mukozasındaki I/R hasarına karşı koruyucu etkisi ve bu etki mekanizmasında kapsaisin'e duyarlı duysal afferent sinirlerin ve NOS-NO sisteminin rolü olduğu gösterilmiştir.

SONUÇLAR

1. 500 pmol/kg/dk dozda uygulanan OXA'nın I/R ile oluşan mide hasarına karşı mide mukozasını koruduğu, kan akımında belirgin bir artış sağladığı, mide mukozasındaki lezyon alanlarını ve mukozaya nötrofil infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir.
2. OXA infüzyonunun L-NAME, kapsaisin ve vagotomi ile beraber uygulanması OXA'nın koruyucu etkisini ortadan kaldırmıştır. Bu ajanların uygulandığı gruplarda lezyon indeksi ve MPO aktivitesinin sadece OXA uygulanan gruba göre yüksek olduğu ve mukoza kan akımı değerlerinin de önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular OXA'nın koruyucu etkisinde NO'nun ve duysal sinirlerin rol oynadığını göstermektedir.
3. Duysal nöronların regülatör etkilerinin CGRP ve NO aracılığı ile olduğu bilinmektedir. NO ve duysal sinir uçlarından salınan CGRP miktarlarının OXA uygulamasıyla birlikte arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla NO ve CGRP'nin OXA infüzyonu ile birlikte gözlenen kan akımı artışı ve nötrofil infiltrasyonunun azalmasına aracılık ettikleri düşünülmüştür.
4. I/R uygulaması inflamasyon ve hasar oluşumuyla ilişkili olduğu bilinen iNOS ekspresyonunda artışa, mukozal damarların dilatasyonunda önemli role sahip olan eNOS ekspresyonunda ise azalmaya neden olmuştur. OXA infüzyonu iNOS ekspresyonunu belirgin şekilde azaltmış, fakat eNOS ekspresyonunda önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Korczynski W, Ceregrzyn M, Matyjek R, Kato I, Kuwahara A, Wolinski J, Zabielski R. Central and local (enteric) action of orexins. *J Physiol Pharmacol* 2006, 57 Suppl 6:17-42.
2. Levin BE. Orexins: neuropeptides for all seasons and functions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006, 291(4):R885-888.
3. Kirchgessner AL. Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev* 2002, 23(1):1-15.
4. Kirchgessner AL, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 1999, 24(4):941-951.
5. Bueno L, Fioramonti J, Delvaux M, Frexinos J. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology* 1997, 112(5):1714-1743.
6. Ehrstrom M, Levin F, Kirchgessner AL, Schmidt PT, Hilsted LM, Gryback P, Jacobsson H, Hellstrom PM, Naslund E. Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regul Pept* 2005, 132(1-3):9-16.
7. Miyasaka K, Masuda M, Kanai S, Sato N, Kurosawa M, Funakoshi A. Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus. *Pancreas* 2002, 25(4):400-404.
8. Takahashi N, Okumura T, Yamada H, Kohgo Y. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 254(3):623-627.
9. Okumura T, Takeuchi S, Motomura W, Yamada H, Egashira Si S, Asahi S, Kanatani A, Ihara M, Kohgo Y. Requirement of intact disulfide bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 280(4):976-981.
10. Naslund E, Ehrstrom M, Ma J, Hellstrom PM, Kirchgessner AL. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 282(3):G470-479.

11. Kawai T, Joh T, Iwata F, Itoh M. Gastric epithelial damage induced by local ischemia-reperfusion with or without exogenous acid. *Am J Physiol* 1994, 266(2 Pt 1):G263-270.
12. Hassan M, Kashimura H, Matsumaru K, Nakahara A, Iwata R, Hayashi T, Muto H, Tanaka N, Goto K, Fukutomi H. Gastric mucosal injury induced by local ischemia-reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical. *Dig Dis Sci* 1997, 42(7):1375-1380.
13. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Drozdowicz D, Kwiecien S, Pajdo R, Bielanski W, Hahn EG. Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 2000, 398(1):147-158.
14. Holzer P. Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology* 1998, 114(4):823-839.
15. Holzer P, Michl T, Danzer M, Jovic M, Schicho R, Lippe IT. Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons. *J Physiol Pharmacol* 2001, 52(4 Pt 1):505-521.
16. Holzer P, Pabst MA. Visceral Afferent Neurons: Role in Gastric Mucosal Protection. *News Physiol Sci* 1999, 14:201-206.
17. Holzer P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Curr Opin Pharmacol* 2007, 7(6):563-569.
18. Holzer P. Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: Blood flow regulation and tissue protection. *Auton Neurosci* 2006, 125(1-2):70-75.
19. Larauche M, Anton PM, Peiro G, Eutamene H, Bueno L, Fioramonti J. Role of capsaicin-sensitive afferent nerves in different models of gastric inflammation in rats. *Auton Neurosci* 2004, 110(2):89-97.
20. Chen RY, Guth PH. Interaction of endogenous nitric oxide and CGRP in sensory neuron-induced gastric vasodilation. *Am J Physiol* 1995, 268(5 Pt 1):G791-796.
21. Elliott SN, Wallace JL. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol* 1998, 33(6):792-803.
22. Holzer P, Sametz W. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. *Gastroenterology* 1986, 91(4):975-981.
23. Lippe IT, Holzer P. Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion. *Br J Pharmacol* 1992, 105(3):708-714.

24. Yamada H, Tanno S, Takakusaki K, Okumura T. Intracisternal injection of orexin-A prevents ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *J Gastroenterol* 2007, 42(5):336-341.
25. Farr SA, Banks WA, Kumar VB, Morley JE. Orexin-A-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptides* 2005, 26(5):759-765.
26. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998, 92(4):573-585.
27. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998, 18(23):9996-10015.
28. Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(2):748-753.
29. Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev* 1993, 17(2):141-193.
30. Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 1999, 160(3):R7-12.
31. Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM. Feeding response to central orexins. *Brain Res* 1999, 821(2):535-538.
32. Dube MG, Kalra SP, Kalra PS. Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res* 1999, 842(2):473-477.
33. Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 267(2):527-531.
34. Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Yanagisawa M, Matsukura S. Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 256(3):495-499.
35. Sutcliffe JG, de Lecea L. The hypocretins: excitatory neuromodulatory peptides for multiple homeostatic systems, including sleep and feeding. *J Neurosci Res* 2000, 62(2):161-168.

36. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24:429-458.
37. Schwartz GJ. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 2000, 16(10):866-873.
38. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(1):322-327.
39. Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, Parsons AA. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain* 2001, 92(1-2):81-90.
40. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 1998, 402(4):442-459.
41. Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 1999, 827(1-2):243-260.
42. Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 1998, 402(4):460-474.
43. Horvath TL, Diano S, van den Pol AN. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 1999, 19(3):1072-1087.
44. van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 1998, 18(19):7962-7971.
45. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 1999, 20(1):68-100.
46. Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T. Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 2000, 859(2):404-409.

47. Jain MR, Horvath TL, Kalra PS, Kalra SP. Evidence that NPY Y1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. *Regul Pept* 2000, 87(1-3):19-24.
48. Yettefti K, Orsini JC, Perrin J. Characteristics of glycemia-sensitive neurons in the nucleus tractus solitarii: possible involvement in nutritional regulation. *Physiol Behav* 1997, 61(1):93-100.
49. Powley TL. Vagal circuitry mediating cephalic-phase responses to food. *Appetite* 2000, 34(2):184-188.
50. Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ. Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 2000, 37(4):335-344.
51. Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001, 435(1):6-25.
52. Zhang X, Fogel R, Renehan WE. Stimulation of the paraventricular nucleus modulates the activity of gut-sensitive neurons in the vagal complex. *Am J Physiol* 1999, 277(1 Pt 1):G79-90.
53. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 1998, 438(1-2):71-75.
54. Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 2001, 103(3):777-797.
55. Heinonen MV, Purhonen AK, Makela KA, Herzig KH. Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf)* 2008, 192(4):471-485.
56. Bengtsson MW, Makela K, Sjoblom M, Uotila S, Akerman KE, Herzig KH, Flemstrom G. Food-induced expression of orexin receptors in rat duodenal mucosa regulates the bicarbonate secretory response to orexin-A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 293(2):G501-509.
57. Ebrahim IO, Howard RS, Kopelman MD, Sharief MK, Williams AJ. The hypocretin/orexin system. *J R Soc Med* 2002, 95(5):227-230.
58. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 283(6):C1567-1591.
59. Anand BK, Brobeck JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 1951, 24(2):123-140.

60. Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Blundell JE. Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul Pept* 2000, 96(1-2):71-84.
61. Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter RA, Arch JR. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 2000, 96(1-2):45-51.
62. Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Upton N, Porter RA, Johns A, Blundell JE. SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 2001, 13(7):1444-1452.
63. Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 1999, 20(9):1099-1105.
64. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999, 98(3):365-376.
65. Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 1999, 849(1-2):248-252.
66. Lubkin M, Stricker-Krongrad A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 253(2):241-245.
67. Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 2000, 20(20):7760-7765.
68. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999, 98(4):437-451.
69. Beiras-Fernandez A, Gallego R, Blanco M, Garcia-Caballero T, Dieguez C, Beiras A. Merkel cells, a new localization of prepro-orexin and orexin receptors. *J Anat* 2004, 204(2):117-122.
70. de Gusmao FM, Becker C, Carvalho MH, Barros LF. Angiotensin II inhibition during myocardial ischemia-reperfusion in dogs: effects on leukocyte infiltration, nitric oxide synthase isoenzymes activity and left ventricular ejection fraction. *Int J Cardiol* 2005, 100(3):363-370.

71. Russell SH, Small CJ, Kennedy AR, Stanley SA, Seth A, Murphy KG, Taheri S, Ghatei MA, Bloom SR. Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. *Endocrinology* 2001, 142(12):5294-5302.
72. Blanco M, Lopez M, Garcia-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Senaris R, Casanueva F, Dieguez C, Beiras A. Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(4):1616-1619.
73. Mitsuma T, Hirooka Y, Mori Y, Kayama M, Adachi K, Rhue N, Ping J, Nogimori T. Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res* 1999, 31(11):606-609.
74. Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci* 2004, 24(50):11439-11448.
75. Martins PJ, D'Almeida V, Pedrazzoli M, Lin L, Mignot E, Tufik S. Increased hypocretin-1 (orexin-a) levels in cerebrospinal fluid of rats after short-term forced activity. *Regul Pept* 2004, 117(3):155-158.
76. Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 270(1):318-323.
77. Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 1999, 48(11):2132-2137.
78. Oomura Y, Ooyama H, Sugimori M, Nakamura T, Yamada Y. Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus. *Nature* 1974, 247(439):284-286.
79. Mayer J. Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1955, 63(1):15-43.
80. Cai XJ, Evans ML, Lister CA, Leslie RA, Arch JR, Wilson S, Williams G. Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes* 2001, 50(1):105-112.
81. Shiraishi T, Oomura Y, Sasaki K, Wayner MJ. Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 2000, 71(3-4):251-261.

82. Ehrstrom M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner A, Gryback P, Jacobsson H, Hellstrom PM, Naslund E. Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(4):2370-2377.
83. Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2003, 205(1-2):43-50.
84. de Miguel MJ, Burrell MA. Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of the developing mouse gut. *J Histochem Cytochem* 2002, 50(1):63-69.
85. Tache Y, Yang H. Brain regulation of gastric acid secretion by peptides. Sites and mechanisms of action. *Ann N Y Acad Sci* 1990, 597:128-145.
86. Okumura T, Takakusaki K. Role of orexin in central regulation of gastrointestinal functions. *J Gastroenterol* 2008, 43(9):652-660.
87. Krowicki ZK, Burmeister MA, Berthoud HR, Scullion RT, Fuchs K, Hornby PJ. Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potently stimulate gastric motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 283(2):G465-472.
88. Hwang LL, Chen CT, Dun NJ. Mechanisms of orexin-induced depolarizations in rat dorsal motor nucleus of vagus neurones in vitro. *J Physiol* 2001, 537(Pt 2):511-520.
89. Grabauskas G, Moises HC. Gastrointestinal-projecting neurones in the dorsal motor nucleus of the vagus exhibit direct and viscerotopically organized sensitivity to orexin. *J Physiol* 2003, 549(Pt 1):37-56.
90. Smart D, Sabido-David C, Brough SJ, Jewitt F, Johns A, Porter RA, Jerman JC. SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2001, 132(6):1179-1182.
91. Ducroc R, Voisin T, El Firar A, Laburthe M. Orexins control intestinal glucose transport by distinct neuronal, endocrine, and direct epithelial pathways. *Diabetes* 2007, 56(10):2494-2500.
92. Yamada H, Takahashi N, Tanno S, Nagamine M, Takakusaki K, Okumura T. A selective orexin-1 receptor antagonist, SB334867, blocks 2-DG-induced gastric acid secretion in rats. *Neurosci Lett* 2005, 376(2):137-142.
93. Kobashi M, Furudono Y, Matsuo R, Yamamoto T. Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats. *Neurosci Lett* 2002, 332(3):171-174.

94. Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR. Orexin-A projections to the caudal medulla and orexin-induced c-Fos expression, food intake, and autonomic function. *J Comp Neurol* 2005, 485(2):127-142.
95. Bulbul M, Tan R, Gemici B, Ongut G, Izgut-Uysal VN. Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. *J Gastroenterol* 2008, 43(3):202-207.
96. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg* 2011, 396(1):13-29.
97. Takagi T, Yoshida N, Isozaki Y, Shimozawa M, Katada K, Manabe H, Hanada O, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. CV-11974, angiotensin II type I receptor antagonist, protects against ischemia-reperfusion injury of the small intestine in rats. *Eur J Pharmacol* 2006, 535(1-3):283-290.
98. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 2007, 39(2):481-484.
99. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005, 20(4):336-343.
100. Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas JT, Thomas FT, Thomas JM, Curiel DT. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 1999, 230(2):185-193.
101. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991, 161(4):488-503.
102. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985, 76(5):1713-1719.
103. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci* 2000, 5:E103-109.
104. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003, 35(6):881-900.
105. Matsui N, Kasajima K, Hada M, Nagata T, Senga N, Yasui Y, Fukuishi N, Akagi M. Inhibitor of NF-kappaB activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Toxicol Sci* 2005, 30(2):103-110.
106. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001, 181(2):160-166.

107. Werther JL. The gastric mucosal barrier. *Mt Sinai J Med* 2000, 67(1):41-53.
108. Lichtenberger LM. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol* 1999, 15(6):463-472.
109. Ham M, Kaunitz JD. Gastroduodenal defense. *Curr Opin Gastroenterol* 2007, 23(6):607-616.
110. Szabo S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *J Clin Gastroenterol* 1991, 13 Suppl 2:S21-34.
111. Kobayashi K, Arakawa T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. *J Clin Gastroenterol* 1995, 21 Suppl 1:S12-17.
112. Allen A, Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005, 288(1):C1-19.
113. Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, 280(5):G922-929.
114. Ho SB, Takamura K, Anway R, Shekels LL, Toribara NW, Ota H. The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig Dis Sci* 2004, 49(10):1598-1606.
115. Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 2000, 46(3):312-320.
116. Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 2002, 32(7):519-527.
117. Darling RL, Romero JJ, Dial EJ, Akunda JK, Langenbach R, Lichtenberger LM. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. *Gastroenterology* 2004, 127(1):94-104.
118. Rossmann H, Bachmann O, Vieillard-Baron D, Gregor M, Seidler U. Na⁺/HCO₃⁻ cotransport and expression of NBC1 and NBC2 in rabbit gastric parietal and mucous cells. *Gastroenterology* 1999, 116(6):1389-1398.
119. Takeuchi K, Yagi K, Kato S, Ukawa H. Roles of prostaglandin E-receptor subtypes in gastric and duodenal bicarbonate secretion in rats. *Gastroenterology* 1997, 113(5):1553-1559.
120. Tanaka K, Tsutsumi S, Arai Y, Hoshino T, Suzuki K, Takaki E, Ito T, Takeuchi K, Nakai A, Mizushima T. Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. *Mol Pharmacol* 2007, 71(4):985-993.

121. Oyake J, Otaka M, Matsuhashi T, Jin M, Odashima M, Komatsu K, Wada I, Horikawa Y, Ohba R, Hatakeyama N, Itoh H, Watanabe S. Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. *Life Sci* 2006, 79(3):300-305.
122. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 2008, 135(1):41-60.
123. Yang YH, Wu WK, Tai EK, Wong HP, Lam EK, So WH, Shin VY, Cho CH. The cationic host defense peptide rCRAMP promotes gastric ulcer healing in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 318(2):547-554.
124. Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4(9):721-732.
125. Modlin IM, Kidd M, Lye KD, Wright NA. Gastric stem cells: an update. *Keio J Med* 2003, 52(2):134-137.
126. Leedham SJ, Brittan M, Preston SL, McDonald SA, Wright NA. The stomach periglandular fibroblast sheath: all present and correct. *Gut* 2006, 55(2):295-296.
127. Nguyen T, Chai J, Li A, Akahoshi T, Tanigawa T, Tarnawski AS. Novel roles of local insulin-like growth factor-1 activation in gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, re-epithelialization, and induces cyclooxygenase-2 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *Am J Pathol* 2007, 170(4):1219-1228.
128. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002, 8(3):289-293.
129. Chiou SK, Tanigawa T, Akahoshi T, Abdelkarim B, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin: a novel target for indomethacin-induced gastric injury. *Gastroenterology* 2005, 128(1):63-73.
130. Guth PH. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. *Yale J Biol Med* 1992, 65(6):677-688.
131. Peskar BM. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *J Physiol Pharmacol* 2001, 52(4 Pt 1):555-568.
132. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 2006, 131(1):259-271.
133. Stroff T, Plate S, Respondek M, Muller KM, Peskar BM. Protection by gastrin in the rat stomach involves afferent neurons, calcitonin gene-related peptide, and nitric oxide. *Gastroenterology* 1995, 109(1):89-97.

134. Atay S, Tarnawski AS, Dubois A. Eicosanoids and the stomach. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2000, 61(3-4):105-124.
135. Halter F, Tarnawski AS, Schmassmann A, Peskar BM. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. Gut 2001, 49(3):443-453.
136. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. J Physiol Pharmacol 2005, 56 Suppl 5:33-55.
137. Redfern JS, Lee E, Feldman M. Effect of immunization with prostaglandin metabolites on gastrointestinal ulceration. Am J Physiol 1988, 255(6 Pt 1):G723-730.
138. Redfern JS, Feldman M. Role of endogenous prostaglandins in preventing gastrointestinal ulceration: induction of ulcers by antibodies to prostaglandins. Gastroenterology 1989, 96(2 Pt 2 Suppl):596-605.
139. Kato S, Aihara E, Yoshii K, Takeuchi K. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005, 289(1):G64-69.
140. Tanaka S, Tache Y, Kaneko H, Guth PH, Kaunitz JD. Central vagal activation increases mucus gel thickness and surface cell intracellular pH in rat stomach. Gastroenterology 1997, 112(2):409-417.
141. Chatzaki E, Lambropoulou M, Constantinidis TC, Papadopoulos N, Tache Y, Minopoulos G, Grigoriadis DE. Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 2 in the human stomach: protective biological role by inhibition of apoptosis. J Cell Physiol 2006, 209(3):905-911.
142. Kaneko H, Tache Y, Kusugami K. Importance of medullary thyrotropin-releasing hormone in brain-gut circuits regulating gastric integrity: preclinical studies. J Gastroenterol 2002, 37 Suppl 14:128-132.
143. Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, Konturek SJ, Pawlik M, Sliwowski Z, Pawlik WW, Hahn EG. Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence. Inflammopharmacology 2005, 13(1-3):45-62.
144. Filaretova LP, Filaretov AA, Makara GB. Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats. Am J Physiol 1998, 274(6 Pt 1):G1024-1030.
145. Filaretova L, Bagaeva T, Podvigina T, Makara G. Various ulcerogenic stimuli are potentiated by glucocorticoid deficiency in rats. J Physiol Paris 2001, 95(1-6):59-65.

146. Filaretova L, Podvigina T, Bagaeva T, Bobryshev P, Takeuchi K. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. *J Pharmacol Sci* 2007, 104(3):195-201.
147. Nakagiri A, Murakami M. Roles of NADPH oxidase in occurrence of gastric damage and expression of cyclooxygenase-2 during ischemia/reperfusion in rat stomachs. *J Pharmacol Sci* 2009, 111(4):352-360.
148. Peskar BM, Ehrlich K, Schuligoi R, Peskar BA. Role of lipoxygenases and the lipoxin A(4)/annexin 1 receptor in ischemia-reperfusion-induced gastric mucosal damage in rats. *Pharmacology* 2009, 84(5):294-299.
149. Imatake K, Matsui T, Moriyama M. The effect and mechanism of action of capsaicin on gastric acid output. *J Gastroenterol* 2009, 44(5):396-404.
150. Feng G, Xu X, Wang Q, Liu Z, Li Z, Liu G. The protective effects of calcitonin gene-related peptide on gastric mucosa injury after cerebral ischemia reperfusion in rats. *Regul Pept* 2010, 160(1-3):121-128.
151. Holzer P. Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. II. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. *Am J Physiol* 1998, 275(1 Pt 1):G8-13.
152. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 2000, 85(1-3):1-17.
153. Gebhart GF. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 278(6):G834-838.
154. Phillips RJ, Powley TL. Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 34(1-2):1-26.
155. Cervero F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev* 1994, 74(1):95-138.
156. Raybould HE. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1999, 277(4 Pt 1):G751-755.
157. Sternini C, Wong H, Pham T, De Giorgio R, Miller LJ, Kuntz SM, Reeve JR, Walsh JH, Raybould HE. Expression of cholecystokinin A receptors in neurons innervating the rat stomach and intestine. *Gastroenterology* 1999, 117(5):1136-1146.
158. Yeoh KG, Kang JY, Yap I, Guan R, Tan CC, Wee A, Teng CH. Chili protects against aspirin-induced gastroduodenal mucosal injury in humans. *Dig Dis Sci* 1995, 40(3):580-583.

159. Kang JY, Yeoh KG, Chia HP, Lee HP, Chia YW, Guan R, Yap I. Chili--protective factor against peptic ulcer? *Dig Dis Sci* 1995, 40(3):576-579.
160. Stroff T, Plate S, Ebrahim JS, Ehrlich KH, Respondek M, Peskar BM. Tachykinin-induced increase in gastric mucosal resistance: role of primary afferent neurons, CGRP, and NO. *Am J Physiol* 1996, 271(6 Pt 1):G1017-1027.
161. Whittle BJ. Thirteenth Gaddum Memorial Lecture. Neuronal and endothelium-derived mediators in the modulation of the gastric microcirculation: integrity in the balance. *Br J Pharmacol* 1993, 110(1):3-17.
162. Holzer P, Livingston EH, Saria A, Guth PH. Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. *Am J Physiol* 1991, 260(3 Pt 1):G363-370.
163. Manela FD, Ren J, Gao J, McGuigan JE, Harty RF. Calcitonin gene-related peptide modulates acid-mediated regulation of somatostatin and gastrin release from rat antrum. *Gastroenterology* 1995, 109(3):701-706.
164. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001, 357(Pt 3):593-615.
165. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992, 6(12):3051-3064.
166. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med* 2000, 109(2):150-158.
167. Martin MJ, Jimenez MD, Motilva V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 2001, 7(10):881-908.
168. Barrachina MD, Panes J, Esplugues JV. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Curr Pharm Des* 2001, 7(1):31-48.
169. Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004, 126(3):903-913.
170. Stanek A, Gadowska-Cicha A, Gawron K, Wielkoszynski T, Adamek B, Cieslar G, Wiczowski A, Sieron A. Role of nitric oxide in physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Mini Rev Med Chem* 2008, 8(14):1549-1560.
171. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* 2007, 151(3):305-321.
172. Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(37):13147-13152.

173. Roberts DD, Isenberg JS, Ridnour LA, Wink DA. Nitric oxide and its gatekeeper thrombospondin-1 in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007, 13(3):795-798.
174. Ridnour LA, Thomas DD, Switzer C, Flores-Santana W, Isenberg JS, Ambis S, Roberts DD, Wink DA. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide* 2008, 19(2):73-76.
175. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 2003, 35(1):21-27.
176. Isenberg JS, Frazier WA, Roberts DD. Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(5):728-742.
177. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(12):4003-4008.
178. Kasperek MS, Linden DR, Kreis ME, Sarr MG. Gasotransmitters in the gastrointestinal tract. *Surgery* 2008, 143(4):455-459.
179. Sidhu AS, Triadafilopoulos G. Neuro-regulation of lower esophageal sphincter function as treatment for gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol* 2008, 14(7):985-990.
180. De Man JG, De Winter BY, Herman AG, Pelckmans PA. Study on the cyclic GMP-dependency of relaxations to endogenous and exogenous nitric oxide in the mouse gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 2007, 150(1):88-96.
181. Kobata A, Kotani T, Komatsu Y, Amagase K, Kato S, Takeuchi K. Dual action of nitric oxide in the pathogenesis of ischemia/reperfusion-induced mucosal injury in mouse stomach. *Digestion* 2007, 75(4):188-197.
182. Berg A, Redeen S, Grenegard M, Ericson AC, Sjostrand SE. Nitric oxide inhibits gastric acid secretion by increasing intraparietal cell levels of cGMP in isolated human gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, 289(6):G1061-1066.
183. Wada K, Kamisaki Y, Kitano M, Kishimoto Y, Nakamoto K, Itoh T. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life Sci* 1996, 59(19):PL295-301.
184. Yonei Y, Holzer P, Guth PH. Laparotomy-induced gastric protection against ethanol injury is mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gastroenterology* 1990, 99(1):3-9.
185. Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Kwiecien S, Pawlik M, Pajdo R, Konturek SJ, Pawlik WW, Hahn EG. Neural aspects of ghrelin-induced gastroprotection against mucosal injury induced by noxious agents. *J Physiol Pharmacol* 2006, 57 Suppl 6:63-76.

186. Nie SN, Sun HC, Wu XH, Qian XM. Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. *World J Gastroenterol* 2004, 10(23):3537-3541.
187. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988, 96(5):379-394.
188. Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC, Brennan ML, Lusic AJ, Moore KP, Freeman BA. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 2001, 108(12):1759-1770.
189. Frobert Y, Nevers MC, Amadesi S, Volland H, Brune P, Geppetti P, Grassi J, Creminon C. A sensitive sandwich enzyme immunoassay for calcitonin gene-related peptide (CGRP): characterization and application. *Peptides* 1999, 20(2):275-284.
190. Harada N, Okajima K, Uchiba M, Katsuragi T. Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003, 285(6):G1214-1224.
191. Konturek SJ, Brzozowski T, Pajdo R, Konturek PC, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pawlik M, Ptak A, Drozdowicz D, Hahn EG. Gastric preconditioning induced by short ischemia: the role of prostaglandins, nitric oxide and adenosine. *Med Sci Monit* 2001, 7(4):610-621.
192. Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D, Kwiecien S, Burnat G, Konturek SJ, Pawlik WW. Prostaglandin/cyclooxygenase pathway in ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 319(1):477-487.
193. Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, Burnat G, Hess T, Hahn EG, Konturek SJ. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2006, 536(1-2):171-181.
194. Wada K, Nakajima A, Takahashi H, Yoneda M, Fujisawa N, Ohsawa E, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Matsushashi N, Saubermann LJ, Nakajima N, Blumberg RS. Protective effect of endogenous PPARgamma against acute gastric mucosal lesions associated with ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 287(2):G452-458.

195. Derin N, Izgut-Uysal VN, Agac A, Aliciguzel Y, Demir N. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J Physiol Pharmacol* 2004, 55(3):595-606.
196. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Bielanski W, Pajdo R, Drozdowicz D, Kwiecien S, Hahn EG. Central leptin and cholecystokinin in gastroprotection against ethanol-induced damage. *Digestion* 2000, 62(2-3):126-142.
197. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Drozdowicz D, Bielanski W, Pajdo R, Ptak A, Nikiforuk A, Pawlik WW, Hahn EG. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept* 2004, 120(1-3):39-51.
198. Konturek PC, Brzozowski T, Burnat G, Kwiecien S, Pawlik T, Hahn EG, Konturek SJ. Role of brain-gut axis in healing of gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 2004, 55(1 Pt 2):179-192.
199. Stroff T, Lambrecht N, Peskar BM. Nitric oxide as mediator of the gastroprotection by cholecystokinin-8 and pentagastrin. *Eur J Pharmacol* 1994, 260(1):R1-2.
200. Brzozowski T, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pytko-Polonczyk J, Szlachcic A, Drozdowicz D. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection against acid-independent and acid-dependent ulcerogens. *Digestion* 1996, 57(6):424-432.
201. Brzozowski T, Drozdowicz D, Szlachcic A, Pytko-Polonczyk J, Majka J, Konturek SJ. Role of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by capsaicin and papaverine. *Digestion* 1993, 54(1):24-31.
202. Ren J, Gao J, Ojeas H, Lightfoot SA, Kida M, Brewer K, Harty RF. Involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons in stress-induced gastroduodenal mucosal injury in rats. *Dig Dis Sci* 2000, 45(4):830-836.
203. Vongthavaravat V, Mesiya S, Saymeh L, Xia Y, Ward A, Harty RF. Transforming growth factor alpha-mediated gastroprotection against stress ulceration in the rat: involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Life Sci* 2003, 72(16):1803-1811.
204. Qui BS, Mei QB, Liu L, Tchou-Wong KM. Effects of nitric oxide on gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress. *World J Gastroenterol* 2004, 10(4):594-597.
205. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett* 1998, 425(2):243-248.

206. Karadi O, Nagy Z, Bodis B, Mozsik G. Atropine-induced gastrointestinal cytoprotection dependences to the intact of vagal nerve against indomethacin-induced gastrointestinal mucosal and microvascular damage in rats. *J Physiol Paris* 2001, 95(1-6):29-33.
207. Holzer P, Lippe IT, Jovic M, Wachter C, Erb R, Heinemann A. Nitric oxide-dependent and -independent hyperaemia due to calcitonin gene-related peptide in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 1993, 110(1):404-410.
208. Jenkins DW, Feniuk W, Humphrey PP. Characterization of the prostanoid receptor types involved in mediating calcitonin gene-related peptide release from cultured rat trigeminal neurones. *Br J Pharmacol* 2001, 134(6):1296-1302.
209. Holzer P, Pabst MA, Lippe IT, Peskar BM, Peskar BA, Livingston EH, Guth PH. Afferent nerve-mediated protection against deep mucosal damage in the rat stomach. *Gastroenterology* 1990, 98(4):838-848.
210. Mashimo H, Goyal RK. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol* 1999, 277(4 Pt 1):G745-750.
211. Petersson J, Schreiber O, Steege A, Patzak A, Hellsten A, Phillipson M, Holm L. eNOS involved in colitis-induced mucosal blood flow increase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 293(6):G1281-1287.
212. Yamamoto H, Tanaka A, Kunikata T, Hirata T, Kato S, Takeuchi K. Inducible types of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in adaptive cytoprotection in rat stomachs. *J Physiol Paris* 1999, 93(5):405-412.
213. Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001, 43(6):535-541.
214. El Eter E, Al Tuwaijiri A, Hagar H, Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, 22(11):1791-1799.
215. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Relation of inducible nitric oxide synthase activity to lipid peroxidation and nonprotein sulfhydryl oxidation in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Nitric Oxide* 1998, 2(4):215-223.
216. Ribbons KA, Zhang XJ, Thompson JH, Greenberg SS, Moore WM, Kornmeier CM, Currie MG, Lerche N, Blanchard J, Clark DA, et al. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. *Gastroenterology* 1995, 108(3):705-711.

- 217.** Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek P, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 2002, 53(4 Pt 2):761-773.
- 218.** Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver* 2001, 21(1):1-12.
- 219.** Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 2002, 53(1):39-50.

ÖZGEÇMİŞ

Ruken TAN, 1977 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Elazığ'da, lise öğrenimini Ankara'da tamamlayarak 1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde üniversite eğitime başladı. Lisans eğitimini 2000 yılında tamamladı ve 2001 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. 2004 yılında yüksek lisans tezini verdikten sonra 2005 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitime başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.

EKLER

PROSTAGLANDINS, CAPSAICIN-SENSITIVE SENSORY NERVES AND NEUTROPHIL INFILTRATION, BUT NOT NITRIC OXIDE, CONTRIBUTE TO COLD RESTRAINT STRESS-INDUCED GASTRIC ADAPTATION IN RATS

Ruken Tan,* Mehmet Bülbül,* Gözde Öngüt,[†] Özgür Tosun,[‡] and V Nimet İzgüt-Uysal*

Departments of *Physiology, [†]Microbiology and Clinical Microbiology and [‡]Biostatistics, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

SUMMARY

1. The aim of the present study was to determine the role of prostaglandins (PG), nitric oxide (NO) and capsaicin-sensitive sensory nerves in neutrophil infiltration in gastric adaptation to cold restraint stress in rats.

2. Wistar rats were exposed to single or repeated cold restraint stress for 3.5 h every other day for up to 4 days. Prior to repeated stress, rats were pretreated with *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, s.c.), indomethacin (10 mg/kg, s.c.) or capsaicin (125 mg/kg, s.c.). The extent of gastric mucosal lesions was evaluated histologically and myeloperoxidase (MPO) activity, PGE₂, NO and calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels were measured in gastric tissue.

3. Cold restraint stress produced haemorrhagic lesions and reduced PGE₂ and CGRP levels in the stomach, with an increase in MPO activity and NO levels. Repeated stress insults reduced stress-induced gastric damage, NO production and MPO activity, with an increase in PGE₂ and CGRP levels compared with rats exposed to single cold restraint stress. Adaptation to cold restraint stress was prevented by indomethacin and capsaicin pretreatment, but not by L-NAME.

4. We conclude that the stomach has the ability to adapt to repeated exposure to cold restraint stress and that the adaptation, via inhibition of neutrophil infiltration, is mediated, at least in part, by endogenous PG and CGRP.

Key words: calcitonin gene-related peptide, capsaicin, cold restraint stress, gastric adaptation, nitric oxide, prostaglandin E₂.

INTRODUCTION

Gastric adaptation is a special feature of the stomach to resist the damage caused by repeated exposure to strong mucosal irritants. Gastric adaptation was originally observed in rats exposed to non-steroidal anti-inflammatory drugs,¹ but has also been observed in stomachs exposed to topical irritants including 70% ethanol,² 0.2 mol/L NaOH,³ hypertonic NaCl⁴ and stress.⁵

Correspondence: Dr V Nimet İzgüt-Uysal, Faculty of Medicine, Department of Physiology, 07070 Antalya, Turkey. Email: nimetu@akdeniz.edu.tr

Received 7 September 2005; revision 20 March 2006; accepted 26 March 2006.

© 2006 The Authors

Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

It is well known that stress produces acute haemorrhagic lesions in the gastric mucosa of experimental animals.^{6–8} Cold restraint stress is a commonly used and clinically relevant experimental model for acute gastric damage.^{7,9} A sudden reduction of blood flow to the gastric mucosa and increased free radical formation due to leucocyte activation play fundamental roles in the formation of ulcers.^{9,10} Repeated stress insults have been found to increase the tolerance of the gastric mucosa to stress ulcerogenesis and to attenuate the formation of acute gastric lesions.^{11–13}

The release of vasoactive mediators is crucial for the gastric mucosa to resist the continual onslaught of aggressive factors. Previous findings have suggested that there are interactions between vasodilator mediators, including prostaglandins (PG) that can regulate gastric mucosal microcirculation and integrity and the highly labile humoral vasodilator substance nitric oxide (NO).^{14,15} However, the sensory nerves play an important role in gastroprotection against harmful effects, probably via release of sensory neuropeptides, such as calcitonin gene-related peptide (CGRP), which mediates vascular relaxation.¹⁶

The present study was designed to determine whether gastric adaptation to repeated stress could be related to inhibition of stress-induced leucocyte infiltration to gastric mucosa and, if so, to elucidate the contribution of endogenous PG, NO and capsaicin-sensitive sensory nerves to the gastroprotection against repeated cold restraint stress.

METHODS

Male Wistar rats, weighing 180–220 g, were used in all experiments. Before each experiment, rats were deprived of food and allowed free access to tap water for 18 h. All experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Akdeniz University.

General procedures

Animals were divided into control (*n* = 12) and experimental (*n* = 52) groups. The experimental group was divided into five groups, consisting of one group receiving a single exposure to cold restraint stress and four groups receiving multiple exposures (*n* = 10 in each group; Table 1) to repeated cold restraint stress for 4 consecutive days. The single exposure group was put into individual loose-fitting tubular restraint cages made of wire mesh and were kept there for 3.5 h at 4°C.¹⁷ The multiple exposure groups were treated similarly except that after the stress period animals were removed from the cages, placed at room temperature and rechallenged with cold restraint stress for 3.5 h the next morning.¹⁸ Animals were killed after 4 consecutive days. The

Table 1 Experimental groups

Group	<i>n</i>
Control	12
Experimental groups	
Single exposure	12
Multiple exposure	
Vehicle	10
Indomethacin (10 mg/kg, s.c.)	10
L-NAME (10 mg/kg, s.c.)	10
Capsaicin (125 mg/kg s.c.)	10

L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester.

multiple exposure groups were pretreated with either saline (0.5 mL/100 g, s.c.), indomethacin (10 mg/kg, s.c.), N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, s.c.) or capsaicin (125 mg/kg, s.c.) 0.5 h before each of the four exposures to cold restraint stress.¹⁹ Indomethacin was used as a non-selective cyclo-oxygenase (COX) inhibitor and L-NAME was used as a non-selective NO synthase (NOS) inhibitor.

Denervation of primary sensory nerves by capsaicin

Ablation of capsaicin-sensitive afferent neurons was accomplished by high-dose capsaicin administration, as described previously.^{20,21} Rats received a total dose of 125 mg/kg capsaicin administered in divided over 3 days with 25 mg/kg on the 1st day, 50 mg/kg on the 2nd day and 50 mg/kg on the 3rd day. All injections of capsaicin or its vehicle (see below) were performed with the rats under light ether anaesthesia. After 10 days, both capsaicin- and vehicle-treated rats were used for the study of gastric adaptation to 3.5 h cold restraint stress and underwent the same schedule of repeated stress insults. One day before the first exposure to cold restraint stress, the effectiveness of capsaicin treatment was checked by instilling a drop of 0.001% capsaicin in saline into one eye of each rat that were then observed for any protective wiping movements. Those capsaicin-treated rats that showed any wiping movement were excluded from the study.

Preparation of drugs

All chemicals were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Indomethacin was suspended in saline with a drop of Tween 80, whereas L-NAME was dissolved in saline. Capsaicin was dissolved in vehicle consisting of 10% ethanol, 10% Tween 80 and 80% saline. Each agent was prepared immediately before use and administered s.c. in a volume of 0.5 mL per 100 g bodyweight. In the present study, we used three vehicle groups that were treated with saline (*n* = 10), saline containing a drop of Tween 80 (*n* = 6) or saline containing 10% ethanol and 10% Tween 80 (*n* = 6). At the end of the study, the results for the three vehicle-treated groups were not statistically different from each other and so we used the data obtained for the saline-treated group to prepare the graphs and in all statistical analyses (Fig. 1).

Measurement of gastric lesions

At the end of the experimental period, the animals were anaesthetized by ether and exsanguinated via the abdominal aorta. Their stomachs were removed, opened by an incision along the greater curvature and pinned onto a platform. Lesion areas were examined with a ruler under a stereoscopic microscope (Stemi SV 11; Zeiss, Jena, Germany; ×20) and the total area of haemorrhagic erosions was determined to be the lesion index (in mm²), as described previously.²²

After calculation of the lesion index, stomachs were divided into four pieces throughout the greater curvature for CGRP, myeloperoxidase (MPO),

nitrite/nitrate (NO_x) and PGE₂ determination. Each piece contained all anatomical parts of the stomach assigned to each measurement protocol.

Measurement of gastric MPO activity

Leucocyte infiltration in the gastric mucosa was assessed by determining gastric MPO activity using a modification of the method described by Krawisz *et al.*²³ Briefly, stomach segments were weighed and suspended in 5 mL of 50 mmol/L phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% hexadecyltrimethylammonium bromide. Samples were then homogenized and the homogenate was sonicated and stored in a deep freezer at −80°C until the assay. Samples were centrifuged at 4500 *g* for 30 min at 4°C. Aliquots (0.1 mL) of supernatant to be measured were then mixed with 0.55 mL reaction buffer (50 mmol/L phosphate, pH 6.0, containing 0.0005% hydrogen peroxide and 1.25 mg/mL *o*-dianisidine dihydrochloride). The change in absorbance at 460 nm over a 6.5 min period was measured in a spectrophotometer (UV 1600; Shimadzu, Kyoto, Japan). One unit (U) of MPO activity was defined as the amount of enzyme causing a change in absorbance of 0.001/min. Results are expressed as U/g protein.

Determination of gastric PGE₂ levels

The gastric PGE₂ assay was performed according to the methods described by Cockrell and Ellis.²⁴ The PGE₂ content of the gastric mucosa was measured using a Varian HPLC (model 5000; Varian Instrument Group, Walnut Creek, CA, USA). The mucosa of gastric segments was scraped rapidly with a glass slide. Mucosal scrapings were weighed and placed in a Kreb's solution containing 128 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 3.3 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 14.3 mmol/L NaHCO₃, 11.1 mmol/L glucose and 28 μmol/L indomethacin (to prevent any neo-formation of PG during the extraction process). The tissue sample was then homogenized with a tissue homogenizer (TRI-R, STIR-R, model K43; TRI-R Instruments, New York, NY, USA) for 20 s under ice-cold conditions, followed by centrifugation at 15 000 *g* for 20 min at 4°C. The supernatant was stored at −20°C until the assay.²⁵ A sample (2 mL) from each supernatant was added to 2 mL chloroform. After being vortexed for 1 min, the extracts were evaporated under azot and dissolved in 1 mL mobile phase composed of water : acetonitril : benzene : acetic acid (767 : 230 : 2 : 1, v/v/v/v) and loaded onto a reverse-phase column (SP C18; 150 × 4 mm; 3 μm particle size; Varian Instrument Group, Walnut Creek, CA, USA) with a mobile phase flow rate of 1 mL/min. Eluted mucosal extracts were detected by UV absorbance at 280 nm at 28°C. Quantitative integration of chromatographic separations was performed using a Varian integrator (model 4290; Varian Instrument Group) and PGE₂ standard as a reference.

Measurement of NO_x in gastric tissue

Stomach segments were weighed and suspended in 2 mL of 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4). Samples were then homogenized for 20 s under ice-cold conditions. After deproteinization and centrifugation (5000 *g*, 10 min), nitrite was measured by a colourimetric assay using the Griess method.²⁶ Equal volumes of Griess reagents (1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride) were mixed and incubated with the samples for 10 min at room temperature and absorbance was measured at 540 nm. An aliquot of sodium nitrite solution (5 μmol/L) was used as a standard, in accordance with the detectable biological concentration. Nitrate levels were measured by an enzymatic one-step methodology based on the reduction of nitrate to nitrite by nitrate reductase from *Aspergillus* in the presence of β-NADPH.²⁷ A 100 μL aliquot of the sample was incubated with 250 μL potassium phosphate buffer (100 mmol/L pH 7.5), 50 μL distilled water, 50 μL flavin adenine dinucleotide (FAD; 0.2 mmol/L) and 10 μL β-NADPH (12 mmol/L). Tubes were equilibrated to 25°C the enzymatic reaction was started by the addition of 40 μL nitrate reductase (500 U/L). The reaction was allowed to develop in the dark because of the photolability of FAD. After 45 min precisely, absorbance was recorded at 340 nm and the nitrate concentration in the sample was calculated as described previously.²⁷ Nitrite + nitrate (NO_x) levels are expressed as μmol/g tissue.

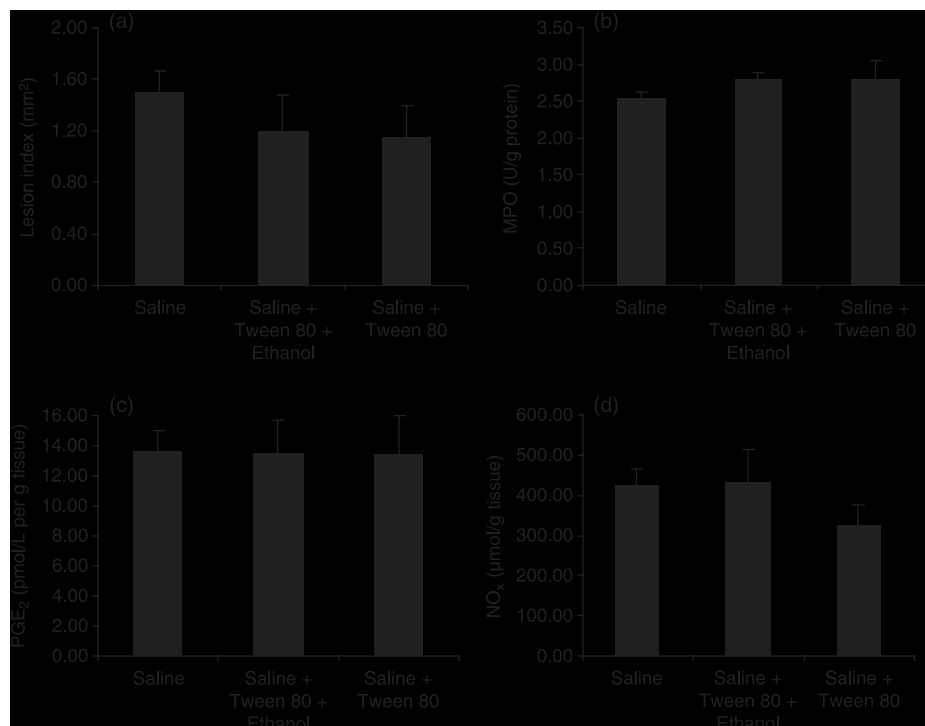


Fig. 1 Comparisons of vehicle-treated groups treated with saline, saline + Tween 80 or saline + Tween 80 + ethanol in terms of (a) lesion index, (b) myeloperoxidase (MPO) activity and (c) prostaglandin (PG) E₂ and (d) NO_x levels. Data are the mean ± SEM.

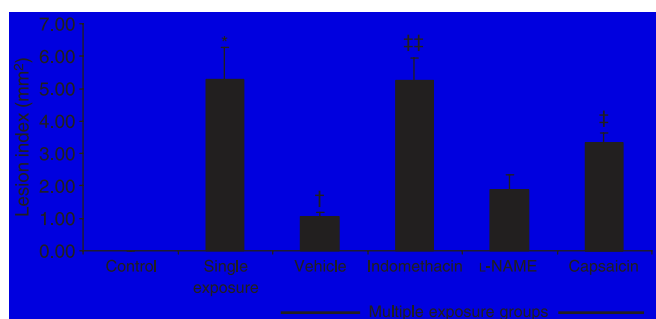


Fig. 2 Lesion areas of the gastric mucosa. Gastric mucosal injury was induced by 3.5 h cold restraint stress in a single exposure group and repeated for 4 days in the multiple exposure groups. Indomethacin (10 mg/kg, s.c.) or *N*⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, s.c.) was administered 0.5 h before each of the four exposures to cold restraint stress. Functional denervation of capsaicin-sensitive sensory nerves was induced by s.c. injection of capsaicin once daily for 3 consecutive days (total dose 125 mg/kg) 10 days before the experiment. Data are the mean ± SEM. **P* < 0.001 compared with control; †*P* < 0.001 compared with single exposure; ‡*P* < 0.01, ‡‡*P* < 0.001 compared with vehicle.

Determination of gastric CGRP levels

Gastric CGRP levels were determined by a modification of methods described previously.^{21,28} Stomach segments were weighed and then homogenized in 1 mL of 2 mol/L acetic acid. The homogenates were bathed in 95°C water for 10 min and then centrifuged at 20 000 *g* for 45 min. Calcitonin gene-related peptide was extracted from the supernatant by using reverse-phase C18 columns (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) after diluting the supernatant 1 : 4 with 4% acetic acid. Columns were activated by first passing 5 mL methanol, 10 mL of 8 mol/L urea and then 10 mL bidistilled water through the column before use. A 1 mL aliquot of the sample was applied to the column, followed by washing with 10 mL of 4% acetic acid. Calcitonin gene-related peptide was eluted with 3 mL methanol : water with

4% acetic acid (90 : 10, v/v) and the solvent was evaporated under a stream of nitrogen gas. The concentration of CGRP was assayed by using a specific enzyme immunoassay kit (SPI-BIO Massy Cedex, France). The sensitivity of the CGRP assay was 10 pg/mL. Results are expressed as ng CGRP/g tissue.

Statistics

Statistical analyses were performed using spss version 13 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Data are presented as the mean ± SEM. The Kolmogorov–Smirnov test of normality was used to check the normality of group data distributions. No data transformation was required. The statistical significance of differences between group means was compared with one-way analysis of variance (ANOVA). Fisher's least significance difference method was used as a post hoc test. The level of significance was accepted as *P* < 0.05.

RESULTS

Lesion Index

As shown in Fig. 2, the total area of the lesions was expressed as a morphological index of gastric injury. In contrast with the normal colour and appearance of the gastric mucosa of control rats, exposure of rats to 3.5 h cold restraint stress caused numerous haemorrhagic lesions in the stomach, the lesion score being 5.30 ± 0.99 mm². Repeated stress for 4 days significantly reduced the lesion area to 1.06 ± 0.13 mm². The effect of repeated stress was significantly reversed when animals were pretreated with indomethacin (5.26 ± 0.68 mm²) or capsaicin (3.34 ± 0.30 mm²). The administration of L-NAME did not prevent the adaptation of the gastric mucosa to repeated stress (1.87 ± 0.46 mm²).

Gastric MPO Activity

Myeloperoxidase activity in the gastric mucosa, an index of tissue neutrophil infiltration, was significantly higher in the single exposure

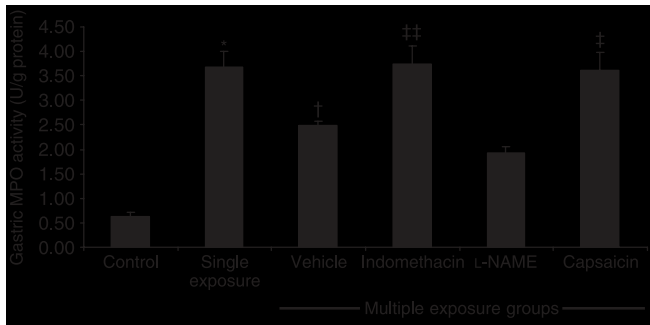


Fig. 3 Changes in gastric mucosal myeloperoxidase (MPO) activity in single exposure and multiple exposure groups. Indomethacin (10 mg/kg, s.c.) or *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, s.c.) was administered 0.5 h before each of the four exposures to cold restraint stress. Functional denervation of capsaicin-sensitive sensory nerves was induced by s.c. injection of capsaicin once daily for 3 consecutive days (total dose 125 mg/kg) 10 days before the experiment. Data are the mean ± SEM. **P* < 0.001 compared with control; †*P* < 0.01 compared with single exposure; ‡*P* < 0.05, §§*P* < 0.01 compared with vehicle.

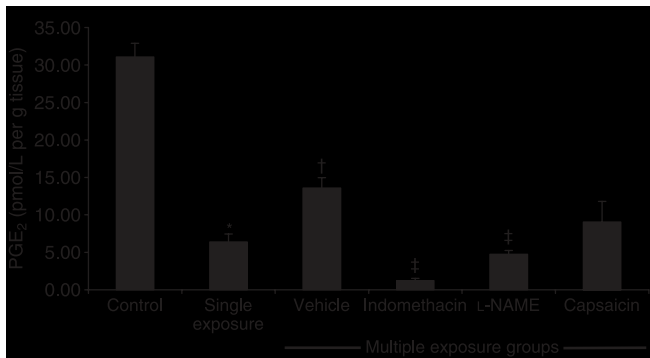


Fig. 4 Changes in gastric mucosal levels of prostaglandin (PG) E₂ in single exposure and multiple exposure groups. Indomethacin (10 mg/kg, s.c.) or *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, s.c.) was administered 0.5 h before each of the four exposures to cold restraint stress. Functional denervation of capsaicin-sensitive sensory nerves was induced by s.c. injection of capsaicin once daily for 3 consecutive days (total dose 125 mg/kg) 10 days before the experiment. Data are the mean ± SEM. **P* < 0.01 compared with control; †*P* < 0.01 from single exposure; ‡*P* < 0.01 compared with vehicle.

group compared with the control group (3.67 ± 0.34 and 0.63 ± 0.09 U/g protein, respectively). In the vehicle-treated multiple exposure group, MPO activity was reduced to 2.50 ± 0.09 U/g protein. Pre-administration of indomethacin (3.73 ± 0.38 U/g protein) and capsaicin (3.61 ± 0.36 U/g protein) suppressed the effect of repeated stress on MPO activity, whereas the administration of L-NAME had no effect (1.93 ± 0.13 U/g protein; Fig. 3).

Mucosal levels of PGE₂

The PGE₂ levels in the intact gastric mucosa were found to be 31.07 ± 1.84 pmol/L per g tissue but, when cold restraint stress was applied once, PGE₂ generation decreased significantly to 6.38 ± 1.07 pmol/L per g tissue weight. In the vehicle-treated multiple exposure group, PGE₂ levels increased significantly, reaching 13.60 ± 1.37 pmol/L per g tissue weight. Although PGE₂ levels were significantly reduced in the indomethacin- and L-NAME-pretreated

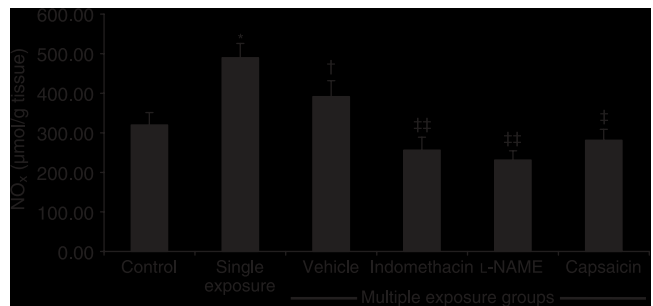


Fig. 5 Changes in gastric mucosal nitrite/nitrate (NO_x) concentration in single exposure and multiple exposure groups. Indomethacin (10 mg/kg, s.c.) or *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, s.c.) was administered 0.5 h before each of the four exposures to cold restraint stress. Functional denervation of capsaicin-sensitive sensory nerves was induced by s.c. injection of capsaicin once daily for 3 consecutive days (total dose 125 mg/kg) 10 days before the experiment. Data are the mean ± SEM. **P* < 0.001 compared with control; †*P* < 0.05 compared with single exposure; ‡*P* < 0.05, §§*P* < 0.01 compared with vehicle.

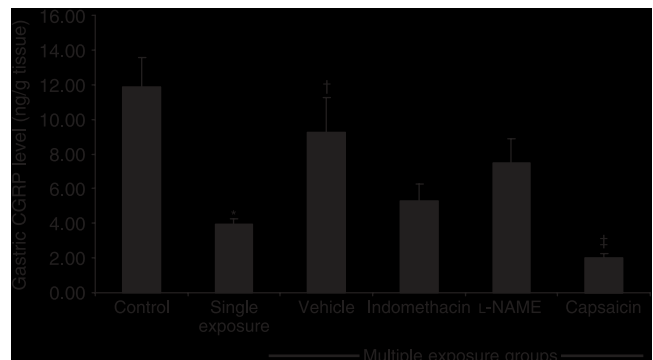


Fig. 6 Changes in gastric mucosal levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in single exposure and multiple exposure groups. Indomethacin (10 mg/kg, s.c.) or *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, s.c.) was administered 0.5 h before each of the four exposures to cold restraint stress. Functional denervation of capsaicin-sensitive sensory nerves was induced by s.c. injection of capsaicin once daily for 3 consecutive days (total dose 125 mg/kg) 10 days before the experiment. Data are the mean ± SEM. **P* < 0.01 compared with control; †*P* < 0.05 compared with single exposure; ‡*P* < 0.01 compared with vehicle.

multiple exposure groups (1.23 ± 0.29 and 4.70 ± 0.50 pmol/L per g tissue, respectively), the reduction in PGE₂ levels in the capsaicin-pretreated multiple exposure group was not significant (9.03 ± 2.73 pmol/L per g tissue; Fig. 4).

Gastric tissue levels of NO_x

The gastric tissue NO_x levels of the control group were 319.96 ± 31.13 μmol/g tissue. Cold restraint stress increased NO_x levels within 3.5 h to 489.88 ± 35.99 μmol/g tissue. In the vehicle-pretreated multiple exposure group, NO_x levels were significantly reduced and values reached those seen in the control group (391.37 ± 40.48 μmol/g tissue). In the indomethacin-, L-NAME- and capsaicin-pretreated multiple exposure groups, NO_x levels were much lower than those observed in the vehicle-treated multiple exposure group (256.30 ± 32.80 , 231.23 ± 27.45 and 281.35 ± 23.46 μmol/g tissue, respectively; Fig. 5).

Gastric tissue levels of CGRP

Cold restraint stress was associated with a significant reduction in the CGRP content of gastric tissues (11.89 ± 1.68 and 3.97 ± 0.27 ng/g tissue in the control and single exposure groups, respectively). Repeated stress reversed the decrease in gastric tissue levels of CGRP (9.26 ± 1.98 ng/g tissue) and pretreatment with L-NAME and indomethacin had no effect on the decrease in gastric CGRP brought about by repeated cold restraint stress (7.46 ± 1.40 and 5.31 ± 0.96 ng/g tissue, respectively). Pretreatment of rats with neurotoxic doses (125 mg/kg, s.c.) of capsaicin significantly reduced the CGRP content to 2.00 ± 0.24 ng/g tissue (Fig. 6).

DISCUSSION

The present study confirms that the stomach is capable of adapting to repeated stress insults by reducing the activation of neutrophils, which is probably mediated by capsaicin-sensitive sensory nerves, CGRP and PG. The gastric adaptive response to stress-induced ulcerogenesis reached a maximum after four repeated exposures to 3.5 h cold restraint stress performed every other day.

The major factors implicated in the pathogenesis of stress ulcerations include an increase in aggressive factors, such as acid-pepsin secretion and gastric motility, decreased blood flow to the mucosa, activation of neutrophils and increased free radical generation, resulting in increased lipid peroxidation.^{29,30}

In a cold restraint stress model, gastric ulcer formation was associated with MPO activity.^{31,32} Because MPO is mainly produced by neutrophils, MPO activity is considered an index of neutrophil infiltration.³³ Because activated neutrophils produce many enzymes and free radicals that damage the gastric mucosa, neutrophil infiltration is considered as an aggressive factor in ulcer formation.³¹⁻³³

Gastric mucosa exposed to a hostile environment is capable of adapting to repeated exposures to various noxious agents.³⁰ Gastric adaptation that occurs to repeated cold restraint stress has been studied little. Guth and Mendick³⁴ observed that the incidence of gastric mucosal ulceration in animals subjected to chronic restraint stress was markedly reduced compared with a single exposure to stress. We demonstrated that the severity of stress-induced gastric lesions decreased with repeated stress and this gastric adaptation to stress is accompanied by an increase in gastric PGE₂ and CGRP levels and a decrease in gastric MPO activity. It is known that PGE₂ has an inhibitory effect on neutrophil functions, including chemotaxis.^{35,36} We confirmed that pretreatment with indomethacin to suppress the mucosal biosynthesis of endogenous PG almost completely abolished the gastric adaptation to repeated stress insults. Inhibition of PG synthesis prevented the reduction in both lesion index and MPO activity in the gastric mucosa during the development of adaptation. These data suggest that endogenous PG are involved in the gastric adaptation to cold restraint stress.

Previous studies confirmed that NO has a cytoprotective activity in the gastric mucosa.³⁷⁻³⁹ However, the present data demonstrate that increased gastric NO_x concentrations were associated with increased lesion index after a single stress insult compared with no insult; in addition, the dose of L-NAME (10 mg/kg) used in the present study, which caused 40% inhibition of NO synthesis, was not related to gastric MPO activity. Previous studies have shown that, in water immersion and restraint stress, increases in NO concentration are accompanied with increases in inducible NOS (iNOS) activity and

decreases in constitutive NOS (cNOS) activity.^{15,40} Such findings reflect two ideas: limited concentrations of NO produced by cNOS have a protective effect against stress, whereas high concentrations of NO produced by iNOS during stress augment lesion formation.^{15,40} It has been reported that infiltration of neutrophils into gastric mucosal tissue largely contributes to gastric mucosal lesion development in rats with stress.^{15,35,40}

It has been indicated that NO exerts an inhibitory action on neutrophil infiltration into tissues.^{15,40} In addition, in rats exposed to water immersion and restraint stress, a decrease in cNOS activity in gastric mucosal tissue could contribute to increased neutrophil infiltration into gastric mucosal tissue, resulting in the development of gastric mucosal lesions.^{15,41} It has also been suggested that activated neutrophils that have infiltrated the gastric mucosal tissues of stressed rats could be one of the sources of increased iNOS in the tissue.^{15,40,41} Consequently, we conclude that NO has no discernable role in the gastroprotective mechanism of the adaptation process against cold restraint stress.

The other finding of the present study is the observation that deactivation of capsaicin-sensitive sensory neurons by systemic pretreatment with capsaicin partially abolished adaptation of the gastric mucosa.^{16,30} Previous studies have demonstrated that capsaicin has a dual action on the stomach. When administered orally in low doses, capsaicin protects the mucosa against the formation of gastric lesions. This action has been attributed to CGRP released from capsaicin-sensitive sensory nerves in the gastric mucosa. Conversely, systemic administration of large doses of capsaicin (125 mg/kg, s.c.) cause functional ablation of afferent capsaicin-sensitive sensory neurons.³⁷ The release of CGRP from the capsaicin-sensitive sensory nerves has also been implicated in the maintenance of mucosal integrity, because functional ablation of these neurons results in a decrease in immunoreactive CGRP in the mucosa and leads to an aggravation of gastric lesions induced by various ulcerogens.^{16,37}

The present findings are in keeping with these observations in showing that capsaicin denervation of sensory neurons eliminated gastric adaptation to repeated stress insults. The increases in lesion index and MPO activity in gastric mucosa from rats exposed to repeated stress insults and pretreated with large doses of capsaicin indicate that capsaicin-sensitive sensory nerves mediate neutrophil infiltration into the gastric mucosa during the adaptation process and contribute to the enhancement of the tolerance of the gastric mucosa to repeated cold restraint stress.

Capsaicin-induced denervation abolished the ability of the stomach to adapt to repeated stress, indicating that the capsaicin-sensitive sensory nerves play an important role in this adaptation, probably via release of the sensory neuropeptide CGRP. We demonstrated that denervation of capsaicin-sensitive sensory nerves with capsaicin reversed the decrease in both lesion index and MPO activity of the gastric mucosa due to repeated stress.

In conclusion, the present study has demonstrated that: (i) the stomach is capable of adapting to repeated stress insults by reducing the neutrophil activation; and (ii) adaptation to stress in the gastric mucosa is probably mediated by PG- and CGRP-containing capsaicin-sensitive sensory nerves.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Research Foundation of Akdeniz University (project no. 2002.02.0122.005).

REFERENCES

- Shorrock CJ, Prescott RJ, Rees WD. The effects of indomethacin on gastroduodenal morphology and mucosal pH gradient in the healthy human stomach. *Gastroenterology* 1990; **99**: 334–9.
- Lacy ER. Gastric mucosal resistance to a repeated ethanol insult. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1985; **110**: 63–72.
- Robert A, Lancaster C, Olafsson AS, Zhang W. Gastric adaptation to repeated administration of a necrotizing agent. In: Garner A, O'Brien PE (eds). *Mechanism of Injury, Protection and Repair of the Upper Gastrointestinal Tract*. Wiley, Chichester. 1991; 357–70.
- Lacy ER, Cowart KS, Hund 3rd P. Effects of chronic superficial injury on the rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1992; **103**: 1179–91.
- Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Drozdowicz D, Stachura J. Adaptation of the gastric mucosa to stress. Role of prostaglandin and epidermal growth factor. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1992; **193**: 39–45.
- Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005; **20**: 332–9.
- Duan YM, Li ZS, Zhan XB, Xu GM, Tu ZX, Gong YF. Changes in endothelin-1 gene expression in the gastric mucosa of rats under cold-restraint-stress. *Chin. J. Dig. Dis.* 2004; **5**: 28–34.
- Yabana T, Yachi A. Stress-induced vascular damage and ulcer. *Dig. Dis. Sci.* 1988; **33**: 751–61.
- Izgit-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J. Gastroenterol.* 2001; **36**: 231–6.
- Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003; **285**: 414–23.
- Ernst H, Konturek PC, Brzozowski T, Lochs H, Hahn EG, Konturek SJ. Adaptation of gastric mucosa to stress. Effect of ranitidine. *J. Physiol. Pharmacol.* 1998; **49**: 405–19.
- Nie S, Li Z, Zhan X *et al.* Role of the pS (2) in gastric mucosa adaptive cytoprotection from stress. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; **82**: 172–5 (in Chinese).
- Nie SN, Sun HC, Wu XH, Qian XM. Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. *World J. Gastroenterol.* 2004; **10**: 3537–41.
- Clancy R, Varenika B, Huang W *et al.* Nitric oxide synthase/COX cross-talk: Nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J. Immunol.* 2000; **165**: 1582–7.
- Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol. Res.* 2001; **43**: 535–41.
- Brzozowski T, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pytko-Polonczyk J, Szlachet A, Drozdowicz D. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection against acid-independent and acid-dependent ulcerogens. *Digestion* 1996; **57**: 424–32.
- Takeuchi K, Kato S, Ogawa Y, Kanatsu K, Umeda M. Role of endogenous prostacyclin in gastric ulcerogenic and healing responses: a study using IP-receptor knockout mice. *J. Physiol.* 2001; **95**: 75–80.
- Brzozowski T, Konturek SJ, Pytko-Polonczyk J, Warzecha Z. Gastric adaptation to stress: Role of sensory nerves, salivary glands, and adrenal glands. *Scand. J. Gastroenterol.* 1995; **30**: 6–16.
- Yamamoto H, Tanaka A, Kunikata T, Hirata T, Kato S, Takeuchi K. Inducible types of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in adaptive cytoprotection in rat stomachs. *J. Physiol.* 1999; **93**: 405–12.
- Yonei Y, Holzer P, Guth PH. Laparotomy-induced gastric protection against ethanol injury is mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gastroenterology* 1990; **99**: 3–9.
- Harada N, Okajima K, Uchiba M, Katsuragi T. Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003; **285**: G1214–24.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; **96**: 379–94.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; **87**: 1344–50.
- Cockrell CS, Ellis EF. Simple single-step high-performance liquid chromatographic method for the separation of cyclooxygenase and lipoygenase enzyme metabolites of arachidonic acid. *J. Chromatogr.* 1984; **308**: 316–21.
- Ko JK, Cho CH. Co-regulation of mucosal nitric oxide and prostaglandin in gastric adaptive cytoprotection. *Inflamm. Res.* 1999; **48**: 471–8.
- Valdivielso JM, Perez-Barriocanal F, Garcia-Estan J, Lopez-Novoa JM. Role of nitric oxide in the early renal hemodynamic response after unilateral nephrectomy. *Am. J. Physiol.* 1999; **276**: R1718–23.
- Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin. Chem.* 1995; **41**: 904–7.
- Frobert Y, Nevers MC, Amadesi S, Volland H, Brune P, Geppetti P. A sensitive sandwich enzyme immunoassay for calcitonin gene-related peptide (CGRP). Characterization and application. *Peptides* 1999; **20**: 275–84.
- Warzecha Z, Dembinski A, Brzozowski T *et al.* Gastroprotective effect of histamine and acid secretion on ammonia-induced gastric lesions in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 2000; **35**: 916–24.
- Konturek PC. Physiological, immunohistochemical and molecular aspects of gastric adaptation to stress, aspirin and to *H. pylori*-derived gastrotaxins. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997; **48**: 3–42.
- Qui BS, Mei QB, Liu L, Tchou-Wong KM. Effects of nitric oxide on gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress. *World J. Gastroenterol.* 2004; **10**: 594–7.
- Coskun T, Yegen BC, Alican I, Peker O, Kurtel H. Cold restraint stress-induced gastric mucosal dysfunction. Role of nitric oxide. *Dig. Dis. Sci.* 1996; **41**: 956–63.
- Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Relation of inducible nitric oxide synthase activity to lipid peroxidation and nonprotein sulfhydryl oxidation in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Nitric Oxide* 1998; **2**: 215–23.
- Guth PH, Mendick R. The effect of chronic restraint stress on gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 1964; **46**: 285–6.
- Harada N, Okajima K, Murakami K, Isobe H, Liu W. Gastric prostacyclin (PGI₂) prevents stress-induced gastric mucosal injury in rats primarily by inhibiting leukocyte activation. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 1999; **57**: 291–303.
- Suzuki K, Araki H, Komoike Y, Takeuchi K. Permissive role of neutrophils in pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Med. Sci. Monit.* 2000; **6**: 908–14.
- Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek PCh, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J. Physiol. Pharmacol.* 2002; **53**: 761–73.
- Harada N, Okajima K, Liu W, Uchiba M. Activated neutrophils impair gastric cytoprotection role of neutrophil elastase. *Dig. Dis. Sci.* 2000; **45**: 1210–16.
- Pshennikova MG, Bondarenko NA, Shimkovich MV. Nitric oxide as a factor of genetically determined resistance to stress damages and adaptive protection. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2001; **132**: 1048–50.
- Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett.* 1998; **425**: 243–8.
- Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Preventive effect of teprenone on stress-induced gastric mucosal lesions and its relation to gastric mucosal constitutive nitric oxide synthase activity. *Pharmacol. Res.* 1999; **39**: 325–32.