

AYŞE BURÇİN UYUMLU

DOKTORA 2011

TBİO D-15

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA CERULEİN İLE
İNDÜKLENEN AKUT PANKREATİT
ÜZERİNE VERAPAMİL, DANTROLEN
VE 2-AMİNOETOKSİDİFENİL
BORAT'IN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**AYŞE BURÇİN UYUMLU
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Kadir Batçioğlu**

MALATYA- 2011

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA CERULEİN İLE İNDÜKLENEN
AKUT PANKREATİT ÜZERİNE
VERAPAMİL, DANTROLİN VE 2-
AMİNOETOKSİDİFENİL BORAT’IN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

AYŞE BURÇİN UYUMLU

Danışman Öğretim Üyesi: Doç.Dr. Kadir Batıcıoğlu

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2010/81 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İsmail TEMEL

İnönü Üniversitesi

İmza

Üye: Prof. Dr. Abdullah TULİ

Çukurova Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU

İnönü Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Alaadin POLAT

İnönü Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Çağatay TAŞKAPAN

İnönü Üniversitesi

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu/...../ 2011 tarih ve 2011 /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca ve doktora tez çalışmamda her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım çok değerli hocam Sayın Doç.Dr. Kadir Batcıoğlu'na, yardım ve ilgisini hiç eksik etmeyen birlikte çalıştığım arkadaşım Sayın Arş.Grv. Basri Satılmış'a, tüm imkanlarını sunan Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı ve çalışanlarına, hayatımın her alanında sevgi ve desteklerini üzerimde hissettiğim aileme ve fedakarlıklarından dolayı eşime sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birim'ine 2010/81 nolu projemize desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum.

ÖZET

Akut pankreatit, çeşitli yakın ve uzak organ sistemlerini etkileyebilen pankreasın akut inflamasyon hastalığıdır. Safra taşları ve alkol en sık görülen sebepleridir. Akut pankreatitin etiyolojik faktörlerinin bilinmesine rağmen hastalığın patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Sindirimde görev alan zimojenlerin, duodenuma ulaşmadan önce asiner hücrelerde erken aktive olması, pankreatit patogenezinde merkezi bir rol oynamaktadır. Patolojik intraasiner zimojen aktivasyonu, anormal intrasellüler Ca^{+2} artışı ile ilişkilidir.

Bu çalışma, ratlarda IP3R, RyR ve L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalları için sırasıyla 2-APB, Dantrolen ve Verapamil gibi kalsiyum kanal blokörlerinin cerulein ile indüklenen akut pankreatiti iyileştirebileceği hipotezi üzerine kurulmuştur. Bu amaçla, serumda amilaz ve lipaz, pankreatik dokuda ise tripsin, tripsinojen, TAP, PSTI ve Katepsin B ölçümleri, histopatolojik gözlemler ile desteklendi. Sonuçlarımızda, cerulein grubunda artan amilaz, lipaz, tripsin ve TAP seviyelerinin kalsiyum kanal blokörleri ile anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Buna ek olarak, bütün gruplar arasında PSTI ve tripsinojen seviyeleri düşerken Katepsin B düzeylerinde önemli bir fark bulunmadı.

Sonuç olarak, bulgularımız, cerulein ile indüklenen akut pankreatit üzerine kalsiyum kanal blokörlerinin tedavi edici etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Ancak, akut pankreatitte, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonundaki anormal yükseliş ile ilişkili patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılması için daha gelişmiş moleküler analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akut pankreatit, 2-APB, Dantrolen, Verapamil

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VERAPAMIL,
DANTROLENE AND 2-AMINOETHOXYDIPHENYL BORATE ON
CAERULEIN INDUCED ACUTE PANCREATITIS IN RATS**

ABSTRACT

Acute pancreatitis is an acute inflammatory disease of the pancreas, with variable involvement of other regional tissues or remote organ systems. Gallstones and alcohol are the commonest causes of acute pancreatitis. Although etiologic factors of acute pancreatitis have been known, the pathophysiology has not been elucidated yet. The premature activation of digestive zymogens within acinar cells prior to reaching the duodenum has been proposed as a critical step in the pathogenesis of pancreatitis. Pathological intraacinar zymogen activation is associated with an aberrant rise in intracellular Ca^{+2} .

We hypothesized that calcium channel blockers such as 2-APB, Dantrolene and Verapamil for IP3R, RyR and L-type voltage-gated calcium channel respectively, could ameliorate cerulein-induced acute pancreatitis in rats. For that purpose, we measured amylase and lipase levels in serum and trypsin, trypsinogen, TAP, PSTI and Cathepsin B levels in pancreatic tissue. These biochemical measurements have been supported by histopathological observations. In our results, we found that increased amylase, lipase, trypsin and TAP levels in cerulein group, significantly decreased by calcium channel blockers. Additionally, while there is no important difference in Cathepsin B level, PSTI and Tripsinogen levels decreased among all groups.

Consequently, our findings show that calcium channel blockers can have therapeutic effects on cerulein-induced AP. But it needs further advanced molecular analysis to elucidate pathophysiological mechanisms related with aberrant rise in intracellular $[\text{Ca}^{+2}]$ in acute pancreatitis.

Keywords: Acute Pancreatitis, 2-APB, Dantrolene, Verapamil

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Pankreas	5
2.1.1. Anatomi ve Histoloji	5
2.1.2. Pankreasın Ekzokrin Salgısı	8
2.1.3. Pankreasın Endokrin Salgısı	10
2.1.4. Pankreas Damarları ve Sinirleri	11
2.2. Pankreatit	11
2.2.1. Akut Pankreatitin Sınıflandırılması	12
2.2.2. Etiyoloji	13
2.2.2.1. Safra Yolları Hastalıkları	14
2.2.2.2. Alkol	15
2.2.2.3. Travma	15
2.2.2.4. Pankreas Divisum	16
2.2.2.5. İlaçlar	16
2.2.2.6. İnfeksiyonlar	17
2.2.2.7. Genetik Faktörler	17
2.2.2.8. Hiperlipidemi	17
2.2.2.9. Hiperkalsemi	17
2.2.3. Patogenez	18
2.3. İyon Kanalları	20

	Sayfa
2.3.1. İyon Kanallarının Genel Yapısı	22
2.4. Kalsiyum Kanalları	24
2.4.1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı	26
2.4.1.1. L-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı	27
2.4.1.2. T-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı	28
2.4.1.3. N-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı	28
2.4.1.4. P/Q-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı	28
2.4.2. İntrasellüler Kalsiyum Salım Kanalları	29
2.4.2.1. İnoзитol Trifosfat Reseptör Kanalı	29
2.4.2.2. Ryanodin Reseptör Kanalı	30
2.5. Kalsiyum Kanal Blokörleri	31
2.5.1. Dantrolen	31
2.5.2. Verapamil	32
2.5.3. 2-Aminoetoksidifenil Borat	33
2.6. Cerulein	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Hazırlanması	35
3.1.1. Akut Pankreatit Oluşturulması	35
3.1.2. Kalsiyum Kanal Blokörlerinin Verilmesi	35
3.1.3. Ratların Ötenazisi	36
3.2. Pankreas Dokularının Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması	36
3.3. Biyokimyasal Analizler	37
3.3.1. Serumda Pankreatik Amilaz Düzeyinin Ölçülmesi	37
3.3.2. Serumda Pankreatik Lipaz Düzeyinin Ölçülmesi	39
3.3.3. Protein Miktar Tayini	40
3.3.4. Tripsin Tayini	42
3.3.5. Pankreatik Sekretuar Tripsin İnhibitör Tayini	43
3.3.6. Tripsinojen Tayini	45
3.3.7. Tripsinojen Aktivatör Peptit Tayini	47
3.3.8. Katepsin B Aktivite Ölçümü	49
3.4. Pankreas Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi	50

	Sayfa
3.5. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR	52
4.1. Pankreas Doku Hasarının Histolojik Değerlendirilmesi	53
4.2. Serum Amilaz Düzeylerinin Değerlendirilmesi	57
4.3. Serum Lipaz Düzeylerinin Değerlendirilmesi	59
4.4. Pankreas Dokusu Tripsin Düzeylerinin Değerlendirilmesi	61
4.5. Pankreas Dokusu PSTI Düzeylerinin Değerlendirilmesi	63
4.6. Pankreas Dokusu TAP Düzeylerinin Değerlendirilmesi	66
4.7. Pankreas Dokusu Katepsin B Düzeylerinin Değerlendirilmesi	68
4.8. Pankreas Dokusu Tripsinojen Düzeylerinin Değerlendirilmesi	70
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	84
EK : Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı	100
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	: Asetilkolin
ALT	: Alanin aminotransferaz
BSA	: Sığır Serum Albumini
C°	: Santigrad Derece
Ca ⁺²	: Kalsiyum
[Ca ⁺²] _e	: Ekstrasellüler Serbest Ca ⁺² Konsantrasyonu
[Ca ⁺²] _i	: İntrasellüler Serbest Ca ⁺² Konsantrasyonu
cADP-R	: Siklik adenzin 5'-difosfat riboz
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CCK	: Kolesistokinin
Cl ⁻	: Klor
cm	: Santimetre
DAG	: Diaçilgliserol
Dev/dak	: Devir/dakika
dL	: Desilitre
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERCP	: Endoskopik Retrograd Kolanjiyo Pankreatografi
g	: Gravity
GABA	: γ-aminobütirik Asit
GluR	: Glutamat Reseptörü
g	: Gram
ICAM-1	: İntersellüler Adhezyon Molekül-1
İP ₃ R	: İnoзитol Trifosfat Reseptör
K ⁺	: Potasyum
kD	: Kilodalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molarite
Mg ⁺²	: Magnezyum
mg	: Miligram
mL	: Mililitre

mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
M.Ö	: Milattan Önce
N	: Normalite
Na^+	: Sodyum
nAChRs	: Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAADP	: Nikotinik Asit Adenin Dinükleotit Fosfat
NF- κB	: Nükleer Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
PBS	: Fosfat tamponu
PCA	: Karboksipeptidaz
P2XRs	: ATP reseptörü
PLC $\beta 1$	: Fosfolipaz C $\beta 1$
PLC $\gamma 1$	: Fosfolipaz $\gamma 1$
pmol	: Pikomol
PSTI	: Pankreatik Sekretuar Tripsin İnhibitörü
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
RyR	: Ryanodin Reseptör Kanalı
SR	: Sarkoplazmik Retikulum
SPINK1	: Serin Proteaz İnhibitor Kazal tip 1
TAP	: Tripsinojen Aktivatör Peptidi
v.a	: Vücut Ağırlığı
2-APB	: 2-Aminoetoksidifenil Borat

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Pankreasın Konumu	6
Şekil 2.2.a 5 haftalık İnsan Embriyo Pankreası	7
Şekil 2.2.b 6 haftalık İnsan Embriyo Pankreası	7
Şekil 2.3 Pankreas Kanalları	8
Şekil 2.4 Asiner ve Kanal Hücreleri	9
Şekil 2.5 Pankreastaki Langerhans Adacıkları	11
Şekil 2.6 Asiner Hücredeki Kolokalizasyon Mekanizması	20
Şekil 2.7 Farklı Sinyallerle İyon Kanallarının Açılması	22
Şekil 2.8 Ligand Kapılı İyon Kanalının Yapısı	23
Şekil 2.9 Voltaj Kapılı İyon Kanalının Tek Bir Alt Ünitesi	23
Şekil 2.10 Voltaj Kapılı İyon Kanalının Açılması	24
Şekil 2.11 Ca_v1 Kanalının Alt Üniteleri	27
Şekil 2.12 IP3R Kanalının Topolojik Bir Modeli	30
Şekil 2.13 Dantrolen Sodyumun Kimyasal Yapısı	31
Şekil 2.14 Verapamil Hidroklorürün Kimyasal Yapısı	32
Şekil 2.15 2-APB'in Kimyasal Yapısı	33
Şekil 2.16 Cerulein'in Kimyasal Yapısı	34
Şekil 3.1 Amilaz Standart Grafiği	39
Şekil 3.2 Lipaz Standart Grafiği	40
Şekil 3.3 Protein Standart Grafiği	42
Şekil 3.4 Tripsin Standart Grafiği	43
Şekil 3.5 PSTI Standart Grafiği	45
Şekil 3.6 Tripsinojen Standart Grafiği	47
Şekil 3.7 TAP Standart Grafik 1	49
Şekil 3.8 TAP Standart Grafik 2	49
Şekil 4.1.a Kontrol Grubuna Ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü	54
Şekil 4.1.b Cerulein Grubuna Ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü	55

Şekil 4.1.c Cerulein+2-APB Grubuna Ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü	55
Şekil 4.1.d Cerulein+Dantrolen Grubuna Ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü	56
Şekil 4.1.e Cerulein+Verapamil Grubuna Ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü	56
Şekil 4.2 Gruplar Arası Amilaz Seviyelerinin Karşılaştırılması	58
Şekil 4.3 Gruplar Arası Lipaz Seviyelerinin Karşılaştırılması	60
Şekil 4.4 Gruplar Arası Tripsin Seviyelerinin Karşılaştırılması	63
Şekil 4.5 Gruplar Arası PSTI Seviyelerinin Karşılaştırılması	65
Şekil 4.6 Gruplar Arası TAP Seviyelerinin Karşılaştırılması	67
Şekil 4.7 Gruplar Arası Katepsin B Seviyelerinin Karşılaştırılması	69
Şekil 4.8 Gruplar Arası tripsinojen Seviyelerinin Karşılaştırılması	71

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Akut Pankreatit Sınıflandırması	12
Tablo 2.2 Akut Pankreatitin Etiyolojik Faktörleri	14
Tablo 2.3 Akut Pankreatit İle İlişkili İlaçlar	16
Tablo 2.4 Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Sınıflandırması	26
Tablo 4.1 Deney Gruplarına ait Pankreatik Hasar Skorları	53
Tablo 4.2 Total Pankreatik Hasara ait İkili Karşılaştırmalar	53
Tablo 4.3 Amilaz’a ait ANOVA Verileri	57
Tablo 4.4 Amilaz’a ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri	57
Tablo 4.5 Amilaz’a ait İkili Karşılaştırmalar	58
Tablo 4.6 Lipaz’a ait ANOVA Verileri	59
Tablo 4.7 Lipaz’a ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri	59
Tablo 4.8 Lipaz’a ait İkili Karşılaştırmalar	60
Tablo 4.9 Tripsin’e ait ANOVA Verileri	61
Tablo 4.10 Tripsin’e ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri	62
Tablo 4.11 Tripsin’e ait İkili Karşılaştırmalar	62
Tablo 4.12 PSTI’e ait ANOVA Verileri	63
Tablo 4.13 PSTI’e ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri	64
Tablo 4.14 PSTI’e ait İkili Karşılaştırmalar	64
Tablo 4.15 TAP’e ait ANOVA Verileri	66
Tablo 4.16 TAP’e ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri	66
Tablo 4.17 TAP’e ait İkili Karşılaştırmalar	67
Tablo 4.18 Katepsin B’ye ait ANOVA Verileri	68
Tablo 4.19 Katepsin B’ye ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri	69
Tablo 4.20 Tripsinoje’e ait Grup Ortalama Değerleri	70
Tablo 4.21 Tripsinojen’e ait Kruskal-Wallis Değerleri	70
Tablo 4.22 Tripsinojen’e ait İkili Karşılaştırmalar	71

1. GİRİŞ

Akut pankreatit, pankreasın inflamasyonu şeklinde tarif edilmekte olup, serumda amilaz ve lipaz düzeylerinin yükselmesi ve karın ağrısı ile karakterize (1), spesifik bir tedavisi olmayan ve mortalitesi yüksek önemli bir hastalıktır (2).

Normal şartlar altında kendi dokusu içinde inaktif olarak bulunan sindirim enzimlerinin etiyolojik faktörler ile aktif hale geçerek pankreası sindirmeleri sonucu ortaya çıkan akut pankreatit, pankreas ödeme, lokal ve sistemik etkilere yol açmaktadır (3).

Akut pankreatitin patogenezinde rol alan çok sayıda etyolojik faktör söz konusudur. En sık görülen nedenleri safra taşları ve alkolizm olmakla birlikte (1), daha az sıklıkla görülen diğer faktörler arasında hipertrigliseridemi (4), hiperkalsemi, hiperparatiroidizm (5), pankreas divisum (6), ilaçlar (7) ve viral enfeksiyonlar sayılabilir (8,9).

Akut Pankreatit kendini sınırlayan hafif form ile mortalitesi yüksek şiddetli forma kadar değişen geniş bir spektruma sahiptir ve prognozu da şiddeti ile ilişkili olarak değişkenlik göstermektedir (10, 11). Akut pankreatitin şiddetli formu, nötrofil infiltrasyonu ve makrofajlarla oluşan masif inflamatuvar reaksiyonu takiben pankreas dokusu ve etrafındaki bölgelerin nekrozu ile karakterizedir. Sistemik inflamasyonun da dahil olduğu bu formun diğer ekstrapankreatik etkileri ise yağ nekrozu, akut akciğer hasarı ve şoktur (12).

Akut pankreatitin etyolojisi ve patogenezi üzerine uzun yıllardır çalışmalar yapılmaktadır. 1856'da Fransız fizyolog Claude Bernard, ana pankreatik kanala safra akışının akut pankreatiti başlatabileceğini öne sürmüştür (13). Reginald Huber Fitz, 1889'da akut pankreatit üzerine, safra kanalının inflamasyonuna neden olan gastroduodenit hastalığının bir komplikasyonu olduğunu bildirmiştir (14). 19. Yüzyılın sonlarında Chiari, hastalığın ana patolojik mekanizmasının pankreatik otosindirim olduğunu ileri sürmüştür. 1901'de ise Eugen Opie tarafından öne sürülen

ortak kanal teorisine göre, ampullada bir safra taşının olması her iki pankreatik ve safra kanalının tıkanmasına yol açarak, safra içeriğinin pankreatik kanala akması ile pankreatik enzimler aktive olmakta ve pankreatiti oluşturmaktadır (15).

Yüz yıldan daha fazla bir süredir akut pankreatit üzerinde yoğun araştırmalar yapılmasına rağmen hastalığın patogenezindeki moleküler mekanizmalar tamamen aydınlatılamamıştır (16).

Pankreas, hem ekzokrin hem de endokrin salgı görevi yapan bir organdır. Pankreasın endokrin kısmı, pankreatik adacık hücrelerinden oluşmakta ve insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptit gibi hormonların sentezlenmesini gerçekleştirmektedir. Pankreasın ekzokrin kısmı ise asiner hücrelerden oluşmaktadır ve birincil fonksiyonu sindirim enzimlerini sentezlemek, salgılamak ve depo etmektir. Bu sindirim enzimleri, α -amilaz, lipaz ve zimojen proteazlardır (17).

Akut pankreatit oluşumunda pankreasın asiner hücreleri merkezi rol oynamaktadır. Hastalığın patogenezindeki kritik olay ise asiner hücrelerdeki pankreatik zimojenlerin erken intrasellüler aktivasyonudur. Birçok pankreatik sindirim enzimi asiner hücrelerde zimojenler olarak sentezlenmekte ve depolanmaktadır. Duodenumda, fırçamsı kenarlardan salgılanan enterokinaz ile tripsinojen tripsine aktive olmakta, aktif tripsin ise diğer zimojenleri aktif formlarına dönüştürmektedir (18, 19). Pankreas, asiner hücrelerde zimojen aktivasyonunu önlemek için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalardan bazıları, pankreatik tripsin inhibitör (20), zimojen formda kalmasını sağlayan pH ve aktif enzimleri yıkan proteazlardır. Patolojik durumlarda bu koruyucu mekanizmaların azalabildiği ve pankreatitin oluşabildiği bildirilmektedir (18).

Pankreatik zimojenlerin intrasellüler aktivasyonunda öne sürülen en önemli mekanizmalar tripsinojenin otoaktivasyonu (21), lizozomal hidrolaz olan Katepsin B ile tripsinojen aktivasyonu (22) ve intrasellüler pankreatik tripsin inhibitör aktivitesinin azalması gibi mekanizmalardır (18). Tripsinojenin otoaktivasyonu, asidik bir pH'ya ihtiyaç duymaktadır ve Ca^{+2} varlığında artmaktadır. Pankreatik

tripsin inhibitörünün afinitesi nötral pH'da en yüksektir ve asidik pH'da azalmaktadır (18, 23). Son yıllarda yapılan çalışmalarda tripsinojen aktivasyonunda Ca^{+2} 'un önemli bir rolünün olduğu bildirilmektedir. Kolesistokinin analogu olan cerulein hiperstimülasyonu ve pankreatik kanal tıkanması ile indüklenen pankreatitin, intrasellüler Ca^{+2} miktarında artışa ve asiner hücre Ca^{+2} sinyalizasyonunda bozulmalara neden olduğu gösterilmektedir (24).

Pankreasın normal enzim sekresyonu ve intrasellüler zimojen aktivasyonunun her ikisi de asiner hücrede artan sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonuna gereksinim duymaktadırlar, fakat artan Ca^{+2} 'un intrasellüler kaynağı açık değildir (25). Son araştırmalar, ekstrasellüler ya da pankreatik asiner hücrelerdeki artan Ca^{+2} konsantrasyonunun, proteaz prekürsörü olan tripsinojenin erken aktivasyonunda ve akut pankreatit oluşumunda bir risk faktörü olduğunu desteklemektedir (26). Çoğu hücrede intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artışı, membranda bulunan Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} girişi ya da hücre içi depolardan Ca^{+2} 'un salımı yolu ile olmaktadır (27). Membranda bulunan voltaj kapılı kalsiyum kanalları, yüksek derecede Ca^{+2} 'a seçici olmakla birlikte membran depolarizasyonu ile aktive olarak Ca^{+2} girişini sağlamaktadır.

Pankreatik asiner hücrelerde, endoplazmik retikulumdan (ER) Ca^{+2} 'un salımına aracılık eden iki farklı Ca^{+2} kanalı vardır. Bunlar; İnozitol trifosfat reseptör kanalı (IP_3R) ve Ryanodin reseptör kanalıdır (RyR) (25, 28). IP_3R , IP_3 bağlanması ile aktifleşen ligand kapılı Ca^{+2} kanallarıdır. Pankreatik sekretagoglar, özellikle asetilkolin (ACh) ve kolesistokinin (CCK), asiner hücrelerin bazolateral plazma membranı üzerinde bulunan G protein bağlı trans membran reseptörlere bağlanarak G proteinini aktive etmektedir (29). G proteini aracılı olarak aktiflenen fosfolipaz C, membrana bağlı fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat molekülünü diaçilgliserol (DAG) ve IP_3 gibi ikincil habercilere dönüştürmektedir (30). Serbestleşen IP_3 , endoplazmik retikulumdaki spesifik IP_3 reseptörlerine bağlanarak intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artışına sebep olmaktadır (30, 31).

Kalsiyum iyon konsantrasyonunda uzayan artış, birçok hücre tipi için toksik olmakta, mitokondriyal disfonksiyona, hücre iskeletinin bozulmasına ve katabolik enzimlerin yıkımına sebep olmaktadır. Hiperstimülasyon ile indüklenen deneysel akut pankreatitte, normal kalsiyum sinyal yolağının bozulmasının, erken olaylardan biri olduğu düşünülmektedir. Pankreatik asiner hücreleri için toksik düzeyde olan kalsiyum iyonları, intrasellüler zimojen aktivasyonunu, vakuolizasyonu ve hücre iskelet hasarını başlatmaktadır (24, 26, 30).

Akut pankreatitin, tanımlanmasının ardından neredeyse yüz yıl geçmiş olmasına ve üzerinde çok fazla klinik ve deneysel çalışmalar yapılmış olmasına rağmen etiyolojik faktörler ve patogenez arasındaki ilişki ve mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Akut pankreatitin, morbidite ve mortalite oranı yüksek olmakla birlikte, spesifik bir tedavisi bulunmamaktadır. Bu bağlamda, araştırmacılar, hastalığın patogenezi anıyabilmek ve yeni destekleyici terapötik uygulamalar bulmak amacıyla birçok yeni ajanla çalışmalar yürütmektedirler.

Bu çalışmada, akut pankreatit hastalığının patogeneziindeki anahtar mekanizma olan intrasellüler tripsinojen aktivasyonu üzerine, hücrelerde Ca^{+2} homeostazisinde görevli olan L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı, IP_3 ve ryanodin reseptör blokörlerinin olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Cerulein ile indüklenen akut pankreatitte, L-tipi kalsiyum kanalı blokörü Verapamil, IP_3R blokörü 2-Aminoetoksi difenil borat (2-APB) ve ryanodin reseptör blokörü Dantrolen gibi Ca^{+2} kanal blokörlerinin erken zimojen aktivasyonu üzerine etkileri incelenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas

Pankreas, tarihte ilk kez M.Ö.300'lerde yunan anatomistler Herophilus, Erasistratos ve Eudemos tarafından tanımlanmış ve bundan yaklaşık 400 yıl kadar sonra, bu organ, Ephesus'lu Rufus tarafından, kıkırdak ve kemik dokusunun olmamasına dayanarak, "pankreas" (pan: tüm,+ creas:et) olarak isimlendirilmiştir. Ana pankreatik kanal, 1642 yılında Johann Wirsüng (1589-1643), aksesuar kanal ise 1724 yılında Giovanni Domenico Santorini (1681-1737) tarafından tanımlanmıştır (32, 33).

Pankreas hem endokrin hem de ekzokrin salgı görevlerini yapan bir organdır. Pankreasın endokrin kısmı, Langerhans adacığı olup, pankreas hacminin % 2'sini oluşturmaktadır. Endokrin fonksiyonun en önemli görevi kan dolaşımına salınan hormonlar aracılığı ile glikoz metabolizmasını düzenlemektir (34). Pankreasın ekzokrin salgısı, asiner hücrelerden salgılanan ve karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve nükleik asitler gibi temel besin maddelerinin sindirimini sağlayan pankreatik sindirim enzimlerini ve kanal hücrelerinden salgılanan ve oniki parmak bağırsağı içeriğinin nötralize edilmesine yardımcı olan, bikarbonatça zengin sıvıyı içermektedir (35).

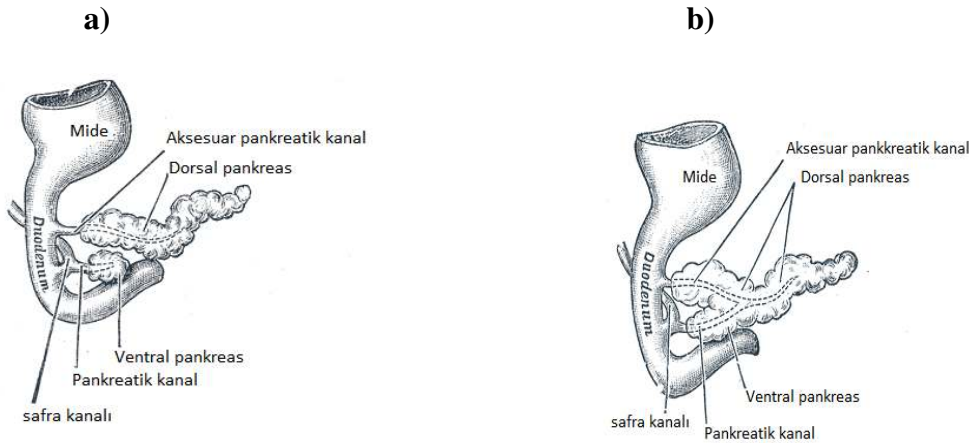
2.1.1. Anatomi ve Histoloji

Pankreas, üst karın bölgesinin arka duvarına yakın bir konumda yerleşip, sağda duodenum, solda dalak arasında retroperitoneal olarak transvers bir şekilde uzanır (Şekil 2.1) (36). Erişkin insanda pankreas bezi 70 g ağırlığında, ortalama 16-20 cm uzunluğunda, 5-6 cm eninde ve 2-3 cm kalınlığındadır (37).

Aortanın ön kısmında yer alan gövde bölümü, boyun bölümünün sol yanından kuyruğa kadar uzanan, pankreasın en uzun ve giderek daralan bölümüdür. Gövdenin üst kenarı sağda çöliak aks ve hepatik arter, solda splenik damarlarla komşudur. Gövdenin ön yüzü omental bursanın arka duvarının pankreas ve mide yüzeyini ayıran çift peritoneal tabakası ile örtülüdür. Arka yüzeyi aort, sol adrenal, sol böbrek damarları, sol böbrek ve splenik ven ile komşudur.

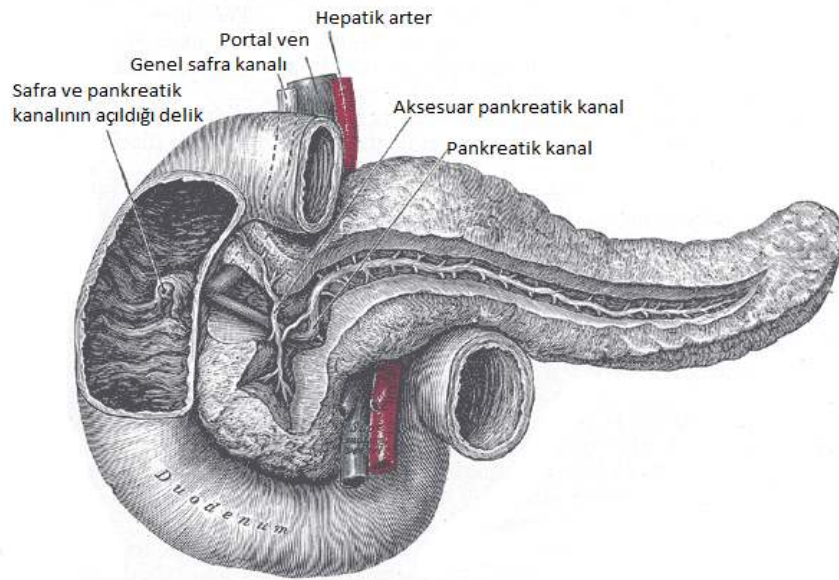
Pankreasın kuyruk bölümü, splenorenal ligamanın içinde yer almaktadır. Dalak hilusuna kadar uzanmakta olup göreceli hareketlidir (36).

Pankreas, fetal hayatın dördüncü haftasına kadar, duodenumun endodermle döşeli iki cepten, her biri kendi kanalı ile ventral ve dorsal pankreas olarak gelişir. Ventral pankreas, pankreasın, baş kısmını oluşturur ve safra kanalı ile birleşir. Dorsal pankreas, pankreasın, baş, gövde ve kuyruk kısmını oluşturur. Onikinci haftaya kadar, kanallardan pankreatik asinuslar gelişir. Endokrin pankreas, ekzokrin pankreas ile aynı anda gelişir. Endokrin hücreleri ilk defa on iki ile on altıncı haftaya gelince farklılaşan ekzokrin asinusların tabanı boyunca gözlenirler (34, 40).



Şekil 2.2.a) Beş haftalık insan embriyo pankreası **b)** Altı haftalık insan embriyo pankreası (38)

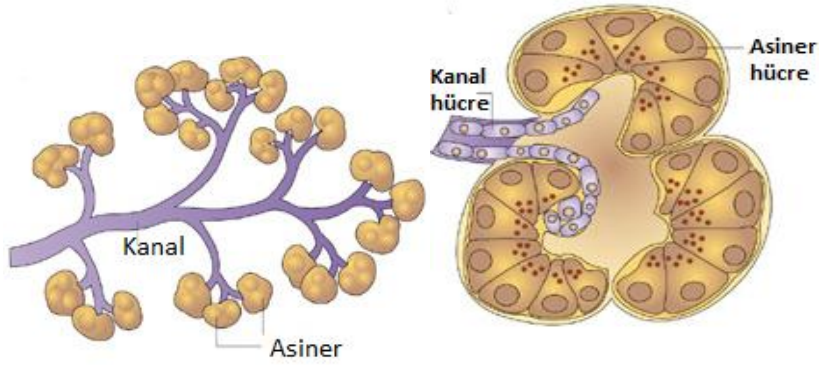
Dorsal pankreas kanalının büyük kısmı ventral pankreas kanalı ile birleşir ve ana pankreas kanalını (Wirsung) oluşturur. Küçük bir kısım aksesuar kanal (Santorini) olarak kalır. Wirsung kanalı, kuyruk ve ana gövde boyunca ilerler ve kanal dalları boyunca salgıları toplar. Pankreasın baş kısmına ulaştığında aşağı doğru döner ve direkt olarak, ortak safra kanalı ile birleşimi sonrası, Vater ampullasında duodenuma boşalır. Dairesel bir düz kas sfinkteri (Oddi sfinkteri), ortak pankreas kanalı ve safra kanalının duodenum duvarını geçtiği bölgede izlenir. Aksesuar kanal ise baş kısmını drene eder ve daha kısadır (34, 40).



Şekil 2.3. Pankreas Kanalları (38)

2.1.2. Pankreasın Ekzokrin Salgısı

Ekzokrin pankreasın işlevsel histolojik birimi asinustur. Asinus lümeni, salgı kanalının başlangıcı olup, sadece pankreasta bulunan bir yapı olan sentroasiner hücreleri içerir. Asinus lümeni, alçak prizmatik epitel ile döşeli olan lopçuk içi (intralobüler) boşaltım kanallarına açılır. İntralobüler kanallar çizgili olmayıp, tek tük enteroendokrin hücrelerinin yer aldığı lopçuklar arası kanalları oluşturmak üzere birleşirler. Lopçuklar arası kanallar ana pankreas kanallarını oluşturmak üzere birbirleriyle anastomoz yapmaktadırlar.



Şekil 2.4. Asiner ve Kanal Hücreleri (41)

Pankreas asinüsü, salgılanan ürünün kanallardan hücrelerarası alanlara kaçışını engelleyen ve birbirlerine apikal bağlantı kompleksleri ile bağlanan piramidal hücrelerle örtülüdür. Bir pankreas asiner hücresinin bazal bölgesi bazal lamina ile ilişkide olup, bir çekirdek ve iyi gelişmiş bir kaba endoplazmik retikulumu içermektedir. Apikal bölge çok sayıda zimojen granül ve golgi aygıtı bulundurmaktadır (34).

Pankreasın temel ekzokrin salgı ünitesi olan asinüslerden günde ortalama 1000-2000 mL berrak, izotonik ve alkali (pH: 8.0- 8.3) bir ekzokrin pankreas sıvısı salgılanmaktadır. Asinerlerden salgılanan pankreatik sindirim enzimleri, büyük hacimlerde sodyum bikarbonat sıvısı ile birlikte ana pankreatik kanalına ulaşarak duodenuma boşalmaktadır.

Pankreas sıvısında bulunan sindirim enzimleri başlıca üç temel besin maddesi olan proteinler, karbonhidratlar ve yağların sindiriminde görev alan enzimlerdir. En önemli pankreatik proteolitik enzimler tripsin, kimotripsin ve karboksipeptidaz'dır. Bunların salgılanan öncül durumları sırasıyla, tripsinojen, kimotripsinojen ve pro karboksipeptidaz'dır. Tripsinojen özellikle duodenum mukozası tarafından salgılanan enteropeptidaz (enterokinaz) tarafından aktif formu olan tripsine dönüştürülmekte, aktifleşen tripsin de, diğer proteazları etkinleştirmektedir. Pankreas sıvısında bulunan bir protein olan tripsin inhibitör, bu proteolitik enzimlerin pankreas içinde erken aktivasyonunu önlemektedir.

Pankreas sıvısı, ayrıca karbonhidratların sindirimini sağlayan amilaz, yağları parçalayan lipaz, nükleik asitleri parçalayan ribonükleaz ve deoksiribonükleaz enzimlerini içermektedir (35, 42).

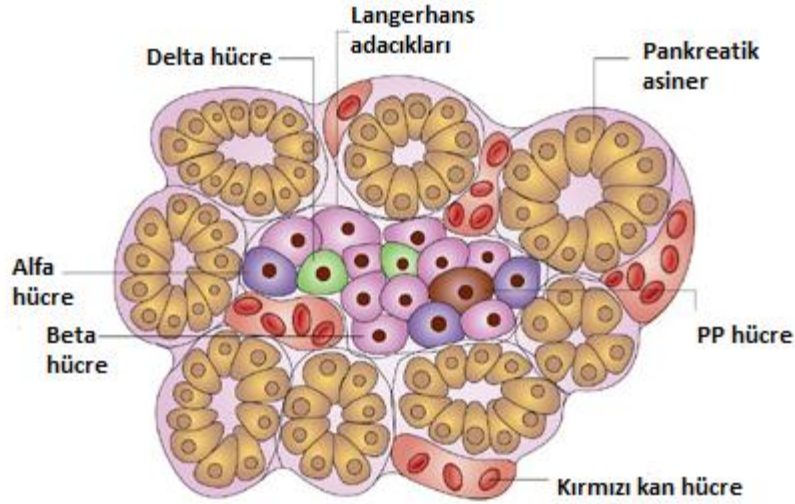
Pankreas enzimleri asinus hücrelerinin apikal sitoplazmasında yerleşik zimojen granüller içinde birikmiştir. Salgılatıcılara yanıt olarak, zimojen granülün içeriği asiner lümeni içine ekzositoz ile gönderilmektedir.

Pankreas sıvısının bikarbonatça zengin sıvısı, başlıca pankreas kanalları boyunca uzanan epitel hücreleri tarafından üretilmektedir. Pankreas sıvısının sodyum ve potasyum yoğunlukları plazmadakine benzemekle beraber, bikarbonat ve klor başlıca anyonlardır. Bikarbonat iyonları mideden duodenuma gelen asit kimusunun nötralizasyonunda önemli görev almaktadır.

Pankreasa giden vagal liflerin uyarılması pankreas sıvısının salgısını arttırırken, sempatik liflerin uyarılması pankreasa giden kan akımını kısmen azaltarak pankreas salgısını baskılamaktadır. Duodenum mukozasından salınan sekretin pankreas sıvısının sulu kısmını, kolesistokinin ise enzimce zengin kısmını uyarmaktadır (43).

2.1.3. Pankreasın Endokrin Salgısı

Pankreasın endokrin bölümü Langerhans adacıklarında yerleşmiş hücrelerden oluşur. Adacıklarda, her biri, tek bir hormon salgılayan dört tip hücre bulunmaktadır. Bunlar; alfa, beta, delta ve F hücreleridir. Alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri insülin, delta hücreleri gastrin ve somatostatin, F hücreleri ise pankreatik polipeptid salgılar (44).



Şekil 2.5. Pankreastaki Langerhans Adacıkları (41)

2.1.4. Pankreas Damarları ve Sinirleri

Pankreas çölyak dalları ve üst mezenterik arterler tarafından beslenirken, portal toplar damar pankreastan kanı götürür. Asinuslar ve adacıklar ayrı bir kılcal damar ağı tarafından beslenir.

Dalları pankreasa uzanan vagus lifleri pankreasın içinde bulunan kolinergic sinirlerle kavşak yapar; bu sinirler asinus, kanal ve adacık hücrelerine uzanır. Sempatik etkinlik, damar daralmasına neden olur. Pankreas sıvısının salgısı parasempatik etkinlik tarafından uyarılır ve sempatik etkinlik tarafından baskılanır (36, 42).

2.2. Pankreatit

Pankreatit, asiner komponentlerinin yıkımı veya hasarlanmasına yol açan bir glandular parenkima inflamasyonudur. Pankreatit, akut pankreatit ve kronik pankreatit olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (45).

2.2.1. Akut Pankreatitin Sınıflandırılması

Akut pankreatit, serumda amilaz ve lipaz yüksekliği ve karın ağrısı ile kendini gösteren, pankreas ödemine, lokal ve sistemik komplikasyonlara yol açan, pankreasın kendi enzimleri ile kendini sindirmesi sonucu oluşan inflamatuvar bir hastalıktır (3).

Akut pankreatit, geniş bir klinik varyasyona sahip olan çok yönlü bir hastalık olduğundan dolayı, tanımı ve komplikasyonları hakkında kesin bir açıklama yapabilmek adına araştırmacılar bir çok sınıflandırma yapmışlardır. 1992 yılında Atlanta'da gerçekleştirilen sempozyumda, klinik temele dayalı olarak yapılan sınıflandırma günümüzde de kullanılmaktadır (46). Bu sınıflandırma, aşağıda tablo 1'de gösterilmektedir:

Tablo 2.1. Akut Pankreatit Sınıflandırılması (46)

Atlanta Sınıflandırması	
1)	Hafif tip
2)	Şiddetli tip
	a) Steril
	b) İnfekte
3)	Pankreas Apsesi
4)	Pseudokist
5)	Peripankreatik sıvı

Bu sınıflandırmaya göre akut pankreatit, diğer bölge dokuları ya da uzak organ sistemlerini de kapsayan pankreasın akut inflamatuvar prosesi şeklinde tanımlanmıştır. Karın ağrısına, kanda veya idrarda pankreatik enzim düzeylerinin yüksekliği, lökositoz, kusma, ateş ve taşikardi eşlik etmektedir. Bulgular, pankreatik parenkimanın mikroskopik interstisyel ödem ve yağ nekrozundan, makroskopik pankreatik ve peripankreatik nekroz ve hemorajiye kadar değişiklik göstermektedir (45, 46).

Hafif Akut Pankreatit: Minimal organ disfonksiyonu görülmektedir, ciddi bir tedavi gerektirmez ve şiddetli akut pankreatitte görülen belirtilere rastlanmaz. Histolojik ve makroskopik özelliği intersitisyel ödemdir. Parenkimal nekroz mikroskopik alanlarda görülebilmektedir. Akut pankreatitli olguların %75'inde hafif tip görülmektedir.

Şiddetli Akut Pankreatit: Organ yetmezliği veya nekroz, abse ve psödokist gibi lokal komplikasyonlarla ortaya çıkmaktadır.

Pankreatik Abse: İntra-abdominal cerahat birikimi pankreas çevresinde olmaktadır. Pankreatik nekroz yoktur veya çok azdır. Şiddetli akut pankreatitten dört hafta veya daha uzun bir zaman sonra ortaya çıkmaktadır.

Psödokist: İçinde fibröz duvar yada granülasyon dokusu bulunan pankreatik sıvının birikmesidir. Akut pankreatit, kronik pankreatit ve pankreas travması sonucu ortaya çıkmaktadır.

Peripankreatik Sıvı: Akut pankreatitin erken döneminde görülmekle beraber fibröz doku ve granülasyon duvarı yoktur. Genellikle şiddetli formunda görülmektedir (46, 47).

2.2.2. Etiyoloji

Akut Pankreatit oluşturan nedenler arasında en sık rastlanılanlar, safra taşları ve alkolizm'dir. Bu iki faktör, akut pankreatit vaka sebeplerinin %80'ini oluşturmaktadır. Akut pankreatitte etiyolojik faktörler aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (9, 47, 48, 49, 50):

Tablo 2.2. Akut Pankreatitin Etiyolojik Faktörleri (9, 47, 48, 49, 50)

• Safra Yolu Hastalıkları • Alkol • Travmalar (Künt, delici, operatif, ERCP sonrası) • Pankreas Divisum • İlaçlar • Enfeksiyonlar (Bakteriyel, viral ve parazitik) • Genetik Faktörler • Hiperlipidemi • Hiperkalsemi

2.2.2.1. Safra Yolu Hastalıkları

İlk olarak Opie, 1901’de, Ampulla Vateri’de küçük bir taşın varlığı ile akut pankreatit oluşumu arasındaki ilişkiyi ortaya atmıştır. “Ortak kanal teorisi” olarak adlandırılan bu teoride, taşların ortak kanalın distaline yerleşerek geçici olarak tıkanma oluşturduğu ve pankreatik kanala safra reflüsünün gerçekleşmesi ile safranin pankreatik enzimleri aktif forma dönüştürdüğü, ya da doğrudan pankreas hücrelerine etki etmesinin pankreatite yol açtığı ileri sürülmektedir (8). Daha sonraki yapılan araştırmalar, küçük safra taşlarının geçici migrasyonunun safra taşı-akut pankreatiti için bir belirteç olduğunu kanıtlamasına rağmen mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Safra taşlarının çapının 5 mm’den daha küçük olması akut pankreatit riskini arttırırken, 5 mm’den daha büyük olan taşların kanalda migrasyonu daha zor olmakta ve safra kesesinde kalmaktadırlar (51).

Akut pankreatit mekanizmasında Oddi sfinkterinde disfonksiyon varlığı da bildirilmektedir. Bu olgularda, safra ve pankreatik kanalında sfinkterektomi uygulaması ile tedavi yapılmaktadır. Akut pankreatite bazen ampulla tümörleri ve koledok kistleri de sebep olmaktadır.

Akut pankreatitin safra veya alkol orijinli olup olmadığı karaciğer fonksiyon testlerine bakılarak ayırt edilebilmektedir. Safra taşlarının varlığında transferaz enzimleri, alkalın fosfataz ve bilirubin düzeyleri artmaktadır (49). Alkol hikayesi olmayan hastalarda serum alanin aminotransferaz (ALT) enzim düzeyinin üç katına çıkması safra taşına bağlı pankreatit için belirleyici olmaktadır (52).

2.2.2.2. Alkol

Kronik alkol tüketimi, akut pankreatitin en önemli sebeplerinden ikincisidir. Alkole bağlı akut pankreatit, uzun süre boyunca her gün en az 100 g alkol tüketen bireylerde görülmektedir. Alkolün kendisinin direkt olarak Oddi sfinkterinin spazmına yol açtığı, akut alkol tüketiminin pankreatik bikarbonat ve protein sekresyonunu arttırdığı bildirilmektedir (49). Ayrıca, alkolün anormal fosfolipid ve yağ asidi metabolizmasına neden olması, hücrel redoks durumunu değiştirmesi, reaktif oksijen üretimini stimüle etmesi, membran akışkanlığını bozması ve hücre sinyalizasyonunu etkilemesi gibi geniş bir etki alanı bulunmaktadır (53). Etanol, zimojen granüllerini direkt olarak etkileyebilmekte, intrasellüler kalsiyum iyon konsantrasyonunu arttırmakta ve erken zimojen aktivasyonuna neden olmaktadır (54, 55).

2.2.2.3. Travma

Cerrahi girişimler, abdominal travmalar (künt, delici), Endoskopik Retrograd Kolanjiyopankreatografi (ERCP) gibi travmatik etkenler pankreatite neden olabilmektedir. Pankreas, safra yolları ve abdominal bölgede yer alan organların cerrahisinden sonra pankreatit ortaya çıkabilmektedir. Abdominal travma, pankreatit vakalarının % 5' inde görülmektedir. Pankreatik hasar daha çok yaralanmalarda

görülmektedir (56). ERCP, safra yolları ve pankreas kanalı patolojilerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Biliyer pankreatit düşünülen ve hastalığın erken döneminde olan her hastaya ERCP ve sfinkterotomi yaygın olarak uygulanmaktadır. Tanı ve tedavi amacıyla kullanılan bu tetkik sonrası akut pankreatit gelişebilmektedir. Özellikle, Oddi sfinkter disfonksiyonu ve tekrarlayan pankreatiti olan kadın hastalarda ERCP, akut pankreatit riskini arttırmaktadır (57).

2.2.2.4. Pankreas Divisum

Pankreas divisum, pankreasın embriyonal dönemde ventral ve dorsal bölümlerinin birbiriyle kaynaşmaması sonucu bu iki bölümün kanallarının ayrı ayrı, farklı papillalardan duodenuma açılması ile ortaya çıkan bir anatomik anomalidir. Bu anomali sonucu gelişen pankreatit atakları hafif seyretmekte ve koruyucu önlemlerle tedavi edilebilmesine rağmen hastalık tekrarlayıcı karakterde olmaktadır (6, 58, 59).

2.2.2.5. İlaçlar

İlaçlar çok sık olmamakla birlikte pankreatite yol açmaktadır. Ancak hastalığın seyri ve semptomları hafif olmaktadır. Aşağıdaki tabloda akut pankreatit ile ilişkili olan ilaçlar verilmektedir (7, 60).

Tablo 2.3. Akut pankreatit ile ilişkili ilaçlar (7, 60)

Asetaminofen	Sisplatin	Steroid
İnterferon-alfa	Sitarabin	6-merkaptopürin
Asparaginaz	Didanozin	Oktreotid
Azatiyoprin	Enalapril	Opioid
Karbamazepin	Eritromisin	Oral kontraseptif
Östrojen	Furosemid	Pentamidin
Hidroklorotiyazid	Lamivudin	Rifampin

2.2.2.6. İnfeksiyonlar

Fungal, bakteriyel veya viral birçok infeksiyon akut pankreatitle ilişkili bulunmuştur. Cocksackie, Varisella-zoster, Epstein-Barr virüsü ve kızamıkçık virüsleri infeksiyöz akut pankreatitlerde daha sık görülen mikroorganizmalardır. Safra yollarını tıkayabilen Ascaris parazitlerinin de pankreatite neden olabildikleri bildirilmektedir (15). Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis gibi bakterilerin de akut pankreatit ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (61).

2.2.2.7. Genetik Faktörler

Katyonic tripsinojen genindeki mutasyon, otozomal dominant geçişli olup tripsinojenin erken aktivasyonuna sebep olarak pankreatik otosindirime yol açmaktadır. Bu genetik sendrom, genç yaşta kronik pankreatit ve pankreas kanseri gelişmesinde büyük risk taşımaktadır. Tripsinin aktif bölgesini bloke eden serin proteaz inhibitör Kazal tip 1 (SPINK) genindeki mutasyon akut ve kronik pankreatit ile ilişkilidir (48, 62).

2.2.2.8. Hiperlipidemi

Akut pankreatit, genellikle serum trigliserit düzeylerinin 1000 mg/dL'yi geçmesi ile oluşmaktadır. Tip I, Tip II ve Tip V hiperlipidemiler ile ilişkili olan akut pankreatit, olguların % 2'sini oluşturmaktadır (15, 63).

2.2.2.9. Hiperkalsemi

Hiperkalsemi ve primer hiperparatiroidizm akut pankreatite sebep olabilmektedir. Hiperkalsemi, genel olarak, fazla dozlarda vitamin D, familyal hipokalsiürik hiperkalsemi ve total parenteral beslenme ile ortaya çıkmaktadır (64, 65).

2.2.3. Patogenez

Ekzokrin pankreasın primer fonksiyonu, sindirim enzimlerinin üretimi ve salgılanmasıdır (66). Bir çok pankreatik sindirim enzimleri, asiner hücrelerde, inaktif zimojen prekürsör olarak sentez ve depo edilmektedir. İnce bağırsağa ulaştıklarında, tripsinojen, fırçamsı kenarlardan salgılanan bir hidrolaz olan enterokinaz ile tripsin'e aktive olmaktadır. Aktive olan tripsin ise diğer zimojenlerin aktivasyonunu sağlamaktadır (67, 68).

Sindirim enzimlerinin önemli hücresel hasara yol açacak potansiyelleri bulunmakla birlikte, asiner hücreleri koruyan dört mekanizma mevcuttur. Bunlar:

1. Enzimlerin inaktif zimojen olarak sentez edilmesi, paketlenmesi ve salgılanması (67).
2. Zimojenlerin, membrana bağlı granül veziküllerinde depo edilmesi (69).
3. Tripsin aktivitesini inhibe eden bir serin proteaz inhibitörü olan Kazal tip 1 (SPINK1) ile birlikte paketlenmesi (70).
4. Aktifleşen tripsin'i deaktive eden otoliz veya mezotripsin ve enzim Y aktivasyonu gibi mekanizmaların olmasıdır (71).

Akut pankreatit patogenezinde merkezi görüş, patolojik olaylar kaskatının başlamasını alkol veya safra taşları gibi herhangi bir etiyolojik faktörün tetiklemesidir. Kaskat bünyesinde gerçekleşen olaylar, erken ve geç faz olarak ikiye ayrılmaktadır. Erken faz, öncelikle asiner hücrelerde sindirim enzimlerinin erken aktivasyonunu içermektedir. Aktive olan enzimler, zimojen granülünden kaçmakta ve hücreyi hasara uğratmaktadır. Diğer bir erken olay ise asiner hücreleri tarafından inflamatuvar mediyatörlerin üretimi ve salımıdır. Asiner hücre, vasküler permeabiliteyi etkileyen ve ödem oluşumunu sağlayan ajanları üretmektedir. İnflamatuvar faktörlerin salımı, diğer kemokin üreten hücrelerin aktivasyonuna ve inflamatuvar reaksiyonun daha da çoğalmasına neden olmaktadır (3).

Hastalığa sebep olan etkene maruziyet anında başlayan bu erken olaylar, birkaç saat sonrasında başlayabilen geç olaylara neden olabilmekte, pankreas ve çevresinde inflamasyon oluşturmaktadır. İnflamatuvar moleküllerin salımı, kapiler sızıntı sendromu, ateş ve hipotansiyon gibi sistemik etkilere yol açmaktadır. Tüm bu etkilerin kombinasyonu pankreas nekrozuna ve apoptozis stimülasyonuna sebep olabilmektedir (3, 16).

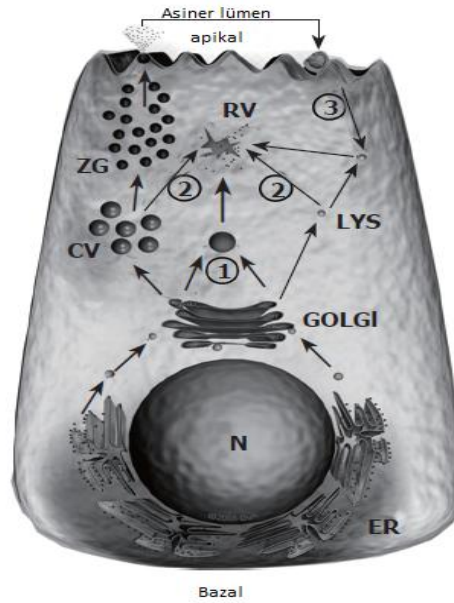
Chiari, yaklaşık yüzyıl önce, zimojenlerin intrapankreatik aktivasyonunun pankreasın otosindirimine sebep olduğunu ve pankreatitin patogenezinde anahtar bir faktör olduğunu ileri sürmüştür (22). Bu model, duodenumda aktifleşen sindirim zimojenlerinin asiner hücrelerde sentezlenmesinden dolayı kolay kabul görmüştür. Literatürde, bu enzimlerin ince bağırsağa ulaşmadan aktive olmasının, hastalıkta önemli bir rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (72). Tripsin aktivitesinin, CCK hiperstimülasyonu ile dakikalar sonrasında arttığı (73), tripsinojen ve karboksipeptidaz (PCA_1) aktivasyon peptidlerinin, akut pankreatitte serumda erken salınan zimojen aktivasyon markerları olduğu bildirilmiştir (74, 75). Öte yandan, bir serin proteaz inhibitörü olan gabaxate mesilat ile, ERCP ile (76) ve cerulein ile indüklenen akut pankreatitin şiddetinin, serin proteaz inhibitörleri ile azaltıldığı (77) ve tripsini degradasyona karşı dirençli hale getiren tripsinojen mutasyonunun, herediter pankreatit ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (78). Bu çalışmalar, zimojen aktivasyonunun pankreatit gelişimindeki kritik rolüne dair doğrudan veya dolaylı kanıtlar olarak literatürde yer almaktadırlar.

Pankreatik zimojenlerin intrasellüler aktivasyonunu açıklayabilmek üzere, tripsinojen otoaktivasyonu, lizozomal hidrolaz katepsin B ile tripsinojenin tripsine dönüşümü, oksidasyon veya kondenzasyondan dolayı zimojenlerin proteolizinin artması, zimojen ve lizozomal enzimlerin sitoplazmaya sızması ve proteolitik aktivasyonu ve intrasellüler pankreatik tripsin inhibitörü aktivitesinin azalması gibi süreçle doğrudan ya da dolaylı ilişkili bir takım yollar öne sürülmüştür (18). En çok üzerinde durulan mekanizmalar, tripsinojenin otoaktivasyon yoluyla ya da katepsin B aracılığıyla aktivasyonudur (79). Tripsinojen otoaktivasyonu, asidik pH'ya ihtiyaç duymakta ve Ca^{+2} varlığında artmaktadır. Pankreatik tripsin

inhibitörünün tripsine afinitesi, nötral pH'da en yüksektir ve asidik pH'da azalmaktadır (23).

Katepsin B, lizozomal sisteme hücre dışından veya hücrenin farklı bölümlerinden endositoz veya fagositoz yoluyla giren proteinlerin degradasyonundan sorumlu olan lizozomal sistein proteazdır (80). Lizozomal hidrolaz ve sindirim enzim zimojenlerinin kolokalizasyonu, asiner hücrenin sitoplazmik vakuollerinde ortaya çıkmaktadır. Normal asiner hücrelerde bu iki tür enzim ayrı tutulmaktadır (81).

“Kolokalizasyon hipotezi” olarak adlandırılan hipotezde, pankreatitin erken döneminde cathepsin B, asiner vakuoller içinde yer alan tripsinojenden, tripsinojen aktivasyon peptidini ayırarak, tripsinin intrapankreatik oluşumunu takiben vakuoller rüptüre olur ve tripsin salınır (Şekil 2.6) (19, 82, 83).



Şekil 2.6. Asiner Hücredeki Kolokalizasyon Mekanizması (82)

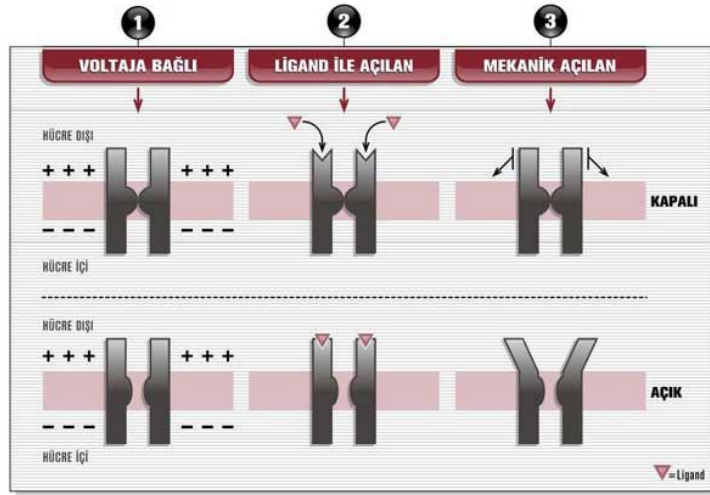
2.3. İyon Kanalları

İyon kanalları, iyonların enerji gradiyentine göre membranın bir tarafından diğer tarafına hareketi için geçiş yolları oluşturan protein kompleksleri veya

membran proteinleridir. Tüm bitki ve hayvan hücrelerinde, hem hücre yüzey membranı hem de intrasellüler kompartmanların membranlarında bulunmaktadır. İyon kanallarının fonksiyonu, kompartmanlar arasındaki elektriksel ve kimyasal gradiyente göre yük transferinin belirlenmesi ile iyonların bir kompartmandan diğerine geçişlerini düzenlemektir (84).

İyon kanallarının üç özelliği işlevlerinin temelini oluşturmaktadır. İlk olarak, kanallardan geçiş son derece hızlıdır. Açık kanallardan saniyede bir milyondan fazla iyon akışı olur. İkinci olarak, kanalların içindeki dar geçit sadece uygun büyüklük ve yükteki iyonların geçişi ile sınırlı olduğundan, kanallar yüksek düzeyde seçicidir. Bu nedenle, Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Cl^- 'un zardan geçmelerini özel kanal proteinleri sağlamaktadır. Üçüncü olarak, iyon kanallarının çoğu sürekli açık değildir. Onun yerine, iyon kanallarının açılması, özel sinyallere yanıt olarak kısa süreli açılan “kapılar” tarafından düzenlenmektedir (85). Spesifik elektriksel, kimyasal veya mekanik sinyallerle açılır veya kapanırlar (Şekil 2.7). Kapılar, ekstrasellüler ligandlar, nörotransmitterler, hormonlar ya da G proteini ve Ca^{+2} gibi sitoplazmik ikincil mesajcıların bağlanmasına cevap olarak açılmaktadır (84).

Membran depolarizasyonu sonucu açılan kanallara voltaja bağlı kanallar denir. Geçirgen oldukları iyonların isimleri ile (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Cl^-) anılırlar (86). Nörotransmitterin bağlanması ile açılan kanallar ise liganda bağlı kanallardır ve asetilkolin, γ -aminobütirik asit (GABA), glutamat, glisin gibi nörotransmitterlerin subünitelerine bağlanmasıyla açılırlar. İyon kanallarının önemli bir bölümünü bu iki tip kanal oluşturmaktadır (87, 88).



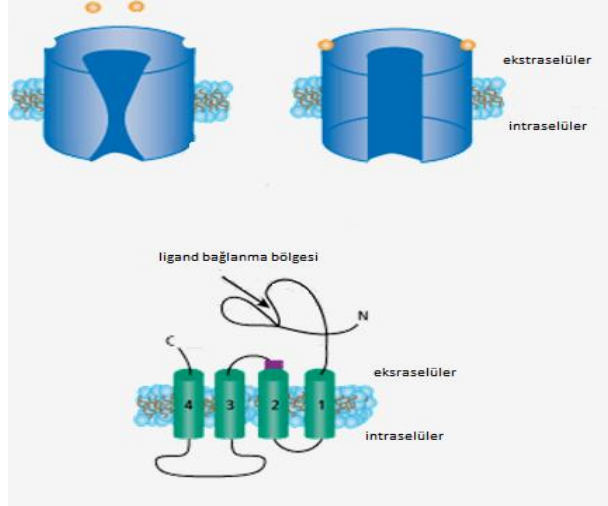
Şekil 2.7. Farklı sinyallerle iyon kanallarının açılması (89)

İyon kanallarının hem ekstrasellüler hem de intrasellüler durumlardaki farklı hassasiyetleri geniş bir dizi biyolojik prosesleri kontrol etmeye olanak sağlamaktadır. En iyi örnek, sinir sistemi ve kasların eksitabilitesindeki rolleridir. Kas kontraksiyonu ya da diğer hareketler için Ca^{+2} salımına aracılık etmekte, endokrin ve ekzokrin salgı hücrelerinin salgılarını düzenlemektedirler. Ayrıca iyon kanalları, embriyogenez ve olgun dokularda hücre haberleşmesinde moderatör olarak rol oynamaktadırlar (84).

2.3.1. İyon Kanallarının Genel Yapısı

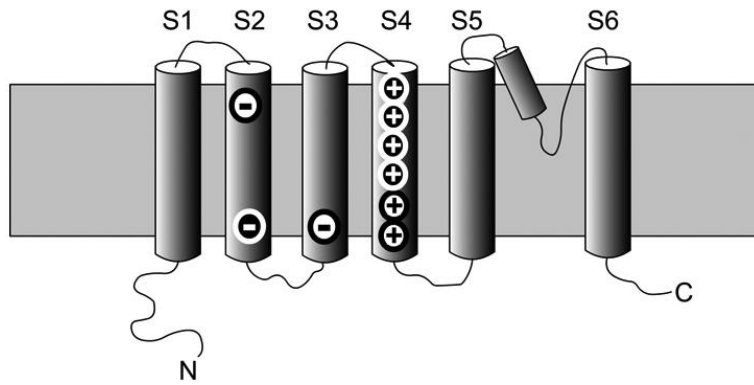
İyon kanal proteinlerinin genel organizasyonu, taşıyıcı ve reseptörler gibi diğer membran proteinleri ile benzerlik göstermektedir. Uzun amino asit zinciri, membranı birkaç defa geçerek molekülün ayrı ekstrasellüler ve intrasellüler bölgelerini oluşturmaktadır. N-terminal bölgesi genellikle sitoplazmadadır, fakat C-terminalinin lokalizasyonu değişkendir.

İyon kanallarını karakterize eden birkaç yapısal motif bulunmaktadır. Ligand kapılı kanallar genellikle beş alt üniteye sahiptir. Her alt ünite, üç veya dört transmembran segmente sahip olmakla birlikte, zayıf seçici merkez porun etrafında düzenlenmiştir (Şekil 2.8) (87).



Şekil 2.8. Ligand Kapılı İyon Kanalı'nın Yapısı (90)

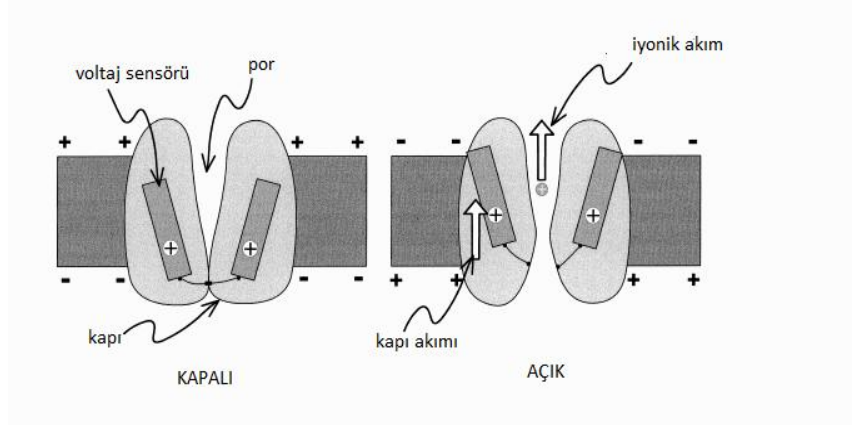
Voltaj kapılı Na^+ , K^+ , Ca^{+2} kanallarının benzer yapılara sahip oldukları düşünülmektedir. Voltaj kapılı kanallar, dört alt üniteye veya kovalen bağlı dört bölgeye sahiptirler. Her alt ünite veya bölge, altı tane transmembran segment içermektedir. Amino ve karboksil terminaller membranın intrasellüler kısmında bulunmaktadır (Şekil 2.9). S1-S4 bir voltaj sensörünü, S5-S6 arasındaki P ilmeği por denilen kapı kısmını oluşturmaktadır. P ilmeği, seçici filtreyi oluşturan bir polipeptit zinciri içermektedir (91, 92).



Şekil 2.9. Voltaj Kapılı İyon Kanalı'nın Tek Bir Alt Ünitesi (91)

Por ile voltaj sensör kısmının fonksiyonel olarak birbirleriyle bağıntılı olduğu sanılmaktadır; membran depolarize olduğunda sensör kısmının hareketlenerek por

kısmına sinyal gönderdiği ve bunun sonucunda kanal kapısının açıldığı bildirilmiştir (Şekil 2.10) (92, 93).



Şekil 2.10. Voltaj Kapılı İyon Kanalı'nın Açılması (92)

2.4. Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum, hücre bölünmesi ve farklılaşmasından hücre ölümüne kadar birçok hücre fonksiyonları düzenlemek için hem ekstrasellüler hem de intrasellüler haberci olarak faaliyet göstermektedir. Bundan dolayı, plazmadaki kalsiyum konsantrasyonu, intersellüler ortamın yanında intrasellüler ortamda sıkı bir şekilde sinirsel ve hormonal kontrol altındadır. Plazmada ve ekstrasellüler ortamda kalsiyum iyonlarının kontrolü için kalsiyum'un mevcudiyeti, hem diet hem de kemik matriksi ile sağlanmaktadır. Ekstrasellüler serbest kalsiyum konsantrasyonundaki ($[Ca^{+2}]_e$) değişiklik Ca^{+2} 'a duyarlı reseptörlerin aktivasyonunu uyarmaktadır. Bu reseptörler birkaç dokuda olmasına rağmen esas olarak paratiroid hücrelerde eksprese edilmektedir (94).

Dinlenme halinde hücre içinde sitozolde serbest kalsiyum iyon konsantrasyonu sadece 10^{-7} M'dır. Bu değer, kalsiyum iyonunun aksiyon potansiyelinin oluşması, sürdürülmesi, kasılma, hareket, hücre iskeletinin düzenlenmesi, hücre bölünmesi, salgılama ve enzim aktivitelerinin değiştirilmesi gibi olaylardaki rolü nedeni ile geçici olarak 10-100 kat artabilir. Hücre dışı serbest

kalsiyum konsantrasyonu yaklaşık 10^{-3} M'dır. Özgül membranlar ve kalsiyum pompaları ile büyük bir gradient sağlanmaktadır (43).

İntrasellüler kalsiyum sinyallerinin oluşumu ve kontrolü ekstrasellüler, sitozolik ve intraorganel Ca^{+2} konsantrasyonları arasındaki dinamik ilişkiye bağlıdır. Birçok intrasellüler organel, yüksek konsantrasyonlarda Ca^{+2} içermektedir. Bu organeller, endoplazmik retikulum/sarkoplazmik retikulum (SR), golgi, mitokondri, endozom, lizozom ve salgı vezikülleridir.

Total Ca^{+2} konsantrasyonu, serbest ve bağlı Ca^{+2} konsantrasyonudur ve intrasellüler organellerde milimolar konsantrasyon düzeylerindedir. Uyarılmayan hücrelerde, intrasellüler serbest Ca^{+2} konsantrasyonu ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) 50-200 nM'dır. Uyarılan hücrelerde ise $[\text{Ca}^{+2}]_i$ mikromolar konsantrasyonlara artabilmektedir.

İntrasellüler Ca^{+2} sinyallerinin oluşumu, plazma membranı (Ca^{+2} girişi) veya ER membranında (Ca^{+2} salımı) Ca^{+2} 'un elektrokimyasal gradientine bağlıdır. Ca^{+2} girişini kontrol eden birkaç yolak vardır. Nikotinik asetilkolin reseptör kanalı (nAChRs), glutamat reseptör kanalı (GluRs), ve ATP reseptör kanalı (P2XRs) gibi ligand kapılı reseptör kanalları, kanalın açılması için ekstrasellüler bir ligandın bağlanmasını gerektirmektedir. Bu kanalların bir çoğu, Ca^{+2} 'a geçirgendir, fakat, membran eksitabilitesinin kontrolü için diğer iyonlara da geçirgenlik göstermektedir. Bunun aksine, voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları (VGCCs) yüksek derecede Ca^{+2} 'a seçicidir ve plazma membranı boyunca oluşan membran depolarizasyonu ile aktive olmaktadır (94).

Kalsiyum salımı, hücrelerde intrasellüler organel membranlarında bulunan Ca^{+2} kanalları ile oluşmaktadır. Bu kanallar, iki major gruba sahiptir: inozitol trifosfat reseptör kanalı ve ryanodin reseptör kanallarıdır. IP_3R , ER membranında bulunan ve IP_3 bağlanması ile aktifleşen ligand kapılı Ca^{+2} kanallarıdır. RyR , ER/SR membranında eksprese edilen, ryanodine duyarlı kanallardır (27).

2.4.1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları, birçok farklı hücre tiplerinde, membran depolarizasyonuna cevap olarak kalsiyum girişini sağlamakta ve kasılma, sekresyon, nörotransmisyon ve gen ekspresyonu gibi hücresel prosesleri düzenlemektedir (95).

Kalsiyum kanalları, iletimlerine, voltaj ve zamana bağlı aktivasyon-inaktivasyon kinetiklerine, farmakolojik özelliklerine ve hücresel dağılımına göre sınıflandırılmaktadır. En genel sınıflandırma, L, T, N, P/Q ve R tipi kalsiyum kanalları şeklinde olmaktadır (Tablo 2.4) (27, 96, 97).

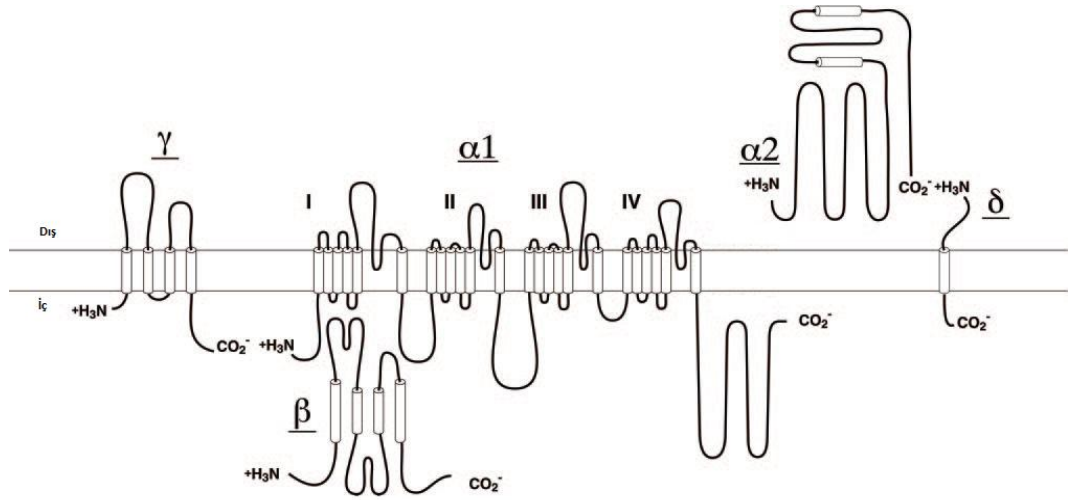
Tablo 2.4. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Sınıflandırılması (27, 96, 97)

Tip	Özellik	Lokasyon / Fonksiyon
L-tip (Ca _v 1)	Yüksek voltaj ile aktive olur. Dihidropiridin ile bloke olur	Endokrin, nöron, düz kas, iskelet kası hücreleri; Uyarılma-kasılma
P/Q-tip (Ca _v 2.1)	Yüksek voltaj ile aktive olur. ω -agatoksin ile bloke olur	Sinir uçları, nöroendokrin hücreler; transmitter salımı, hormon salımı
N-tip (Ca _v 2.2)	Yüksek voltaj ile aktive olur. ω -konotoksin ile bloke olur	Sinir uçları, nöroendokrin hücreler; transmitter salımını, hormon salımı
R-tip (Ca _v 2.3)	Yüksek voltaj ile aktive olur SNX-482 ile bloke olur	Nöronal hücre, dendrit; tekrarlayan ateş, dendritik Ca ⁺² geçişi
T-tip (Ca _v 3)	Düşük voltaj ile aktive olur ve oktanol ile bloke olur	Kalp ve nöronlarda pacemaker aktivite için önemlidir

Kalsiyum kanalları, çoklu genler tarafından kodlanan dört ya da beş alt üniteye sahip protein kompleksleridir (Şekil 2.11) (98). İskelet kasından izole edilen voltaj kapılı kalsiyum kanalı, α 1, α 2, β , δ ve γ alt ünitelerine sahiptir (99).

190-250 kDa olan α 1 alt ünitesi, geçiş poru, voltaj sensörü ve kapı aparatını içeren en büyük alt ünite dir ve ikincil haberciler, ilaçlar ve toksinler tarafından kanalın düzenlendiği yerdir. α 1 alt ünitesi, herbiri altı transmembran segmente sahip

(S1-S6) dört homolog bölgeden oluşmaktadır. S4 segmenti voltaj sensörü olarak görev yapar (100). S5 ve S6 transmembran segmentleri arasındaki por ilmeği, iyon iletkenliğini ve seçiciliğini belirlemektedir. İntrasellüler periferik membran proteini olan β alt ünitesi ve glikoprotein olan $\alpha 2$ alt ünitesinin disülfid bağı ile δ alt ünitesine bağlandığı $\alpha 2\delta$ alt ünite kompleksi kalsiyum kanallarında en çok görülen bileşenlerdir. γ alt ünitesi, iskelet kası kalsiyum kanallarında da bulunmaktadır. Bu yardımcı alt üniteler, kanal kompleksinin özelliklerini değiştirmelerine rağmen, kalsiyum kanallarının farmakolojik ve elektrofizyolojik farklılığı, çoklu $\alpha 1$ alt ünitesinden kaynaklanmaktadır (96, 101).



Şekil 2.11. Ca_v1 Kanalı'nın Alt Üniteleri (98)

2.4.1.1. L-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı

L-tipi kanallar, yüksek voltaj ile aktive olan, dihidropiridin, fenilalkilamin ve benzodiazepin'e duyarlı Ca⁺² kanallarıdır (102). Kalp hücreleri, periferik nöronlar ve iskelet kasında yoğundur. İskelet ve kalpteki kanal proteinlerinin yapısal benzerliği bulunmasına rağmen, aktivasyon kinetiklerinde, iletkenliklerinde, Mg⁺² ve organik katyonlara geçirgenliklerinde önemli farklılıklar bulunmaktadır (27).

L-tipi kanallar, kalp ve birçok çeşit düz kasın kasılmasında, endokrin hücre ve sensör nöronlardan transmitter salımının kontrolünde rol oynamaktadırlar. (103).

L-tipi kanallar, verapamil, diltiazem gibi Ca^{+2} kanal antagonisti ilaçların ana hedefidir. Endojen bileşiklere de cevap vermektedirler (104). Birçok hücrede, katekolaminlerin cAMP bağımlı protein fosforilasyonu yolunu aktive etmesiyle düzenlenmektedirler (105).

2.4.1.2. T-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları

T-tipi kanallar, aktivasyonu ve inaktivasyonu için düşük voltaja ihtiyaç duymaktadır. Birçok hücrede bulunmasına rağmen nöronal hücre, kalp ve düz kaslarda yoğunlaşmıştır. Pacemaker aktivite için önemlidir (106).

2.4.1.3. N-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı

N-tipi kanallar, yüksek voltaj ile aktive olmaktadır, fakat dihidropiridinlere (DHP) dirençli olmasından dolayı L-tipi kanallarından farklıdır. ω -konotoksin ile bloke olmaktadır. N-tipi kanallar, sinir uçları, dendritler ve nöroendokrin hücrelerde bulunmakta olup sinir uçlarının depolarizasyonu sonucunda nörotransmitter salımına neden olmaktadır (27).

2.4.1.4. P/Q-Tipi Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı

P/Q-tipi kanallar, serebellar purkinje hücrelerinde tanımlanmışlardır. Bu kanallar, yüksek voltaj ile aktive olmaktadır ve DHP'e veya ω -konotoksin'e duyarlı değil, dirençlidirler. Düşük molekül ağırlıklı toksinlerle özellikle de murekkep balığının dev aksonundaki funnel web spider venomdan elde edilen toksin ile bloke olmaktadır (107). Funnel web spider venom'un peptid bileşeni olan ω -agatoksin, nöromusküler transmisyonu bloke etmektedir (108).

2.4.2. İntrasellüler Kalsiyum Salım Kanalları

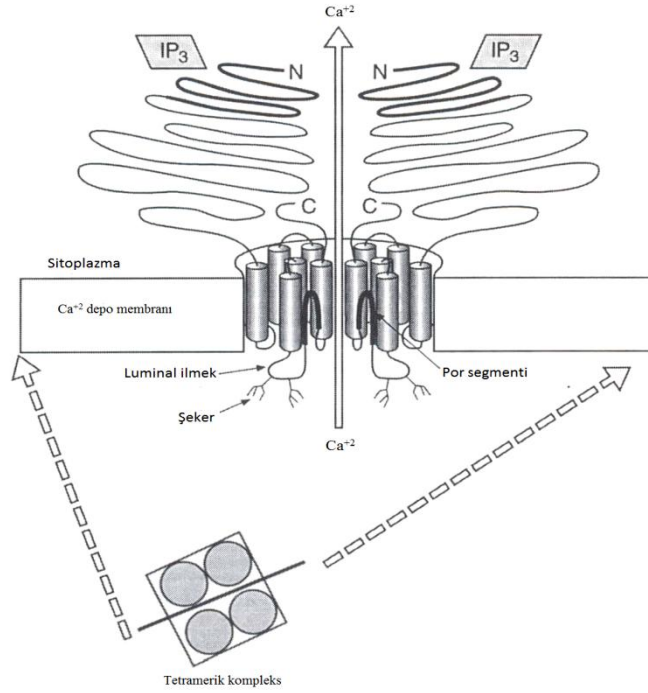
Kalsiyum salım kanalları, kas hücrelerinde sarkoplazmik retikulum veya diğer hücre tiplerinde internal organeller gibi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} akışına aracılık etmektedirler. Ca^{+2} salımını sağlayan iki major kanal vardır: inozitol trifosfat reseptör kanalı ve ryanodin reseptör kanallarıdır (27).

2.4.2.1. İnozitol Trifosfat Reseptör Kanalı

IP_3R , IP_3 bağlanması ile aktifleşerek, Ca^{+2} salımına yol açan, tetramer yapısında ligand kapılı Ca^{+2} kanalıdır (109, 110, 111).

Tüm hücre tiplerinde, Ca^{+2} salımı, iki sınıf reseptörün aktivasyonu ile başlamaktadır: Birinci yolak, G protein bağımlı reseptörlerin Fosfolipaz $\text{C}\beta 1$ 'i (PLC $\beta 1$) aktive etmesidir. İkinci yolak ise, tirozin kinaz bağımlı reseptörlerin Fosfolipaz C $\gamma 1$ 'i (PLC $\gamma 1$) aktive etmesidir. Aktive olan PLC $\beta 1$ ve PLC $\gamma 1$, fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat molekülünün hidrolizine ve IP_3 ile diaçilgliserol oluşumuna yol açmaktadır. Diaçilgliserol membranda kalırken, IP_3 hızla membrandan sitozole difüze olmakta ve intrasellüler kalsiyum depolarında yerleşik olan kendine spesifik reseptörlere bağlanarak Ca^{+2} salımına sebep olmaktadır (112, 113).

IP_3R , birbirine benzeyen dört alt üniteden oluşmaktadır. IP_3 bağlanma bölgeleri, her alt ünitenin N-terminalinde lokalizedir (Şekil 2.12). Tip 1, tip 2 ve tip 3 izoformları bulunmaktadır. Hemen hemen bütün hücrelerin ER membranı ve çekirdek membranında, bazı hücre tiplerinde ise plazma membranında yerleşmiştir (114).



Şekil 2.12. IP₃R Kanalının Topolojik Bir Modeli (94)

Sitozolik Ca^{+2} , IP₃R kapısını düzenleyen major habercidir. Tip 1 ve tip 2 IP₃R'ler, IP₃'ın uyarıcı düzeyde bulunması durumunda, $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artışına neden olmaktadır. IP₃R'lerinin aktivasyon düzeyleri, Ca^{+2} salım düzeyleri ile kontrol edilmektedir. Diğer faktörler, luminal kalsiyum, protein kinaz A, protein kinaz C, kalsiyum/kalmodulin bağlı protein kinaz II, adenin nükleotit ve pH'dır (94).

2.4.2.2. Ryanodin Reseptör Kanalı

Ryanodin reseptör kanalları, uyarılma-kasılma eşleşmesinde merkezi rol oynayan, iskelet kas lifleri ve kardiyak miyositlerin sarkoplazmik retikulumunda bulunan Ca^{+2} salımı yapan kanallar olarak tanımlanmışlardır. Bu kanallar, aynı zamanda, nöronlar, kromaffin hücreler, beyin, düz kas, karaciğer ve fibroblastlarda bulunmaktadır. Memeli dokularında ifadelenen üç formu vardır: RyR₁ büyük oranda iskelet kasında, RyR₂ kalp kasında, RyR₃ ise uyarılmayan dokular dahil geniş doku tiplerinde bulunmaktadır. Bu izoformlar, 5000 kadar aminoasit içermekte olup üç ayrı gen tarafından kodlanmaktadır (28, 115).

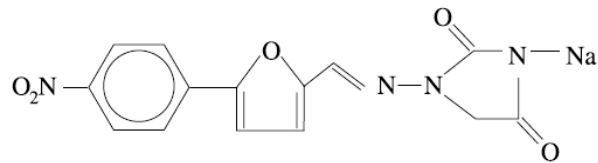
Ryanodin reseptörleri de tetramer yapısında olup, büyük bir N-terminal bölgesi ve Ca^{+2} seçici kanalı oluşturan bir C-terminal kısmı bulunmaktadır. Ryanodin reseptörlerinin endojen modülatörleri, sitozolik Ca^{+2} , membran potansiyeli (V_m), siklik adenosin 5'-difosfat riboz (cADP-R), Mg^{+2} ve Cl^- gibi iyonlar, nükleotidler, sitozolik pH ve kalmodulin gibi kalsiyum bağlayan proteinlerdir. Farmakolojik modülatörler ise ryanodin, dantrolen, heparin ve kafein gibi moleküllerdir (116).

Son yıllardaki çalışmalarda, asiner hücrelerde, CCK hormonunun farklı bir mekanizma ile etkili olduğu gösterilmektedir. Bu mekanizmaya göre, CCK asiner hücre membranındaki CCK1 reseptörüne bağlanmakta ve reseptöre bağlı bir enzim olan ADP-ribozil siklaz aktivitesi ile nikotinamid adenin dinükleotit fosfat'tan (NADP), Nikotinik asit adenin dinükleotit fosfat (NAADP) molekülü, nikotinamid adenin dinükleotit'ten (NAD) ise siklik adenosin 5'-difosfat riboz (cADPR) molekülü oluşmaktadır. NAADP ve cADPR molekülleri, endoplazmik retikulum membranında bulunan ve bir kalsiyum kanalı olan ryanodin reseptörüne bağlanarak, depolanan Ca^{+2} 'un, kanaldan intrasellüler ortama salımına neden olmaktadır (117).

2.5. Kalsiyum Kanal Blokörleri

2.5.1. Dantrolen

Dantrolen, moleküler yapısı 1-((5-(p-nitrofenil)furfurilidin)amino)hidantoin sodyum olan hidantoin türevi bir moleküldür (Şekil 2.13). Postsinaptik kas gevşetici olarak etki etmekte olup, malignan hipertermi tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır. Ryanodin reseptörlerine bağlanıp intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunu azaltarak kas hücrelerinde eksitasyon-kontraksiyonu deprese ederek etki etmektedir (116, 118). Ayrıca, nöroleptik malignan sendrom ve kas spastisite tedavisinde dantrolen kullanılmaktadır (119).

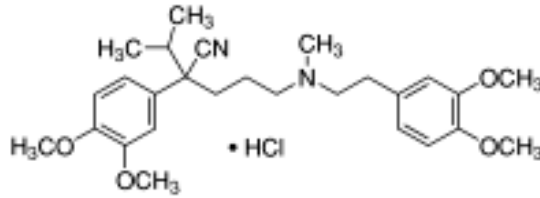


Şekil 2.13. Dantrolen Sodyumun Yapısı (120)

Lipofilik karakterde bir molekül olan Dantrolenin oral kullanımında %70'i absorbe olmaktadır. 6 saatte plazma konsantrasyonu maksimuma ulaşmaktadır. Plazma yarı ömrü 12 saat olup karaciğerde metabolize olmaktadır. Dantrolen ve metabolitleri, idrar ve safra ile atılmaktadır. Bir hidantoin türevi olmasına rağmen ne antikonvülsan ne de anestetik özellikleri mevcuttur. En çok görülen yan etkileri, kas zayıflığı, damar iltihabı, solunum yetmezliği ve gastrointestinal bozukluklardır. Ayrıca uyuşukluk, baş dönmesi ve sersemlik, diğer görülebilen advers semptomlardır. Diltiazem, verapamil gibi kalsiyum kanal blokerleri, Vecunorium bromit gibi nöromusküler bloke eden ajanlar, benzodiazepinler ve oral kontraseptiflerle kontrendikedir (120).

2.5.2. Verapamil

Verapamil, fenilalkilamin sınıfında, moleküler yapısı 5-[N-(3,4-dimetoksi feniletoksi)-metilamino]-2-(3,4-dimetoksifenil)-2-isopropil-valeronitril olan L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanal blokörü ve IV. sınıf antiaritmik bir moleküldür (Şekil 2.14). Hipertansiyon, anjina pectoris, supraventriküler aritmi (121, 122, 123) ve son zamanlarda küme baş ağrısı tedavisinde kullanılmaktadır (124).



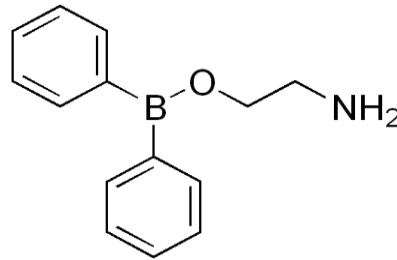
Şekil 2.14. Verapamil Hidroklorürün Yapısı (125)

Verapamil, oral olarak verildiğinde yaklaşık olarak % 90'ı gastrointestinal yoldan emilmektedir. Ancak karaciğerde ilk geçiş metabolizması yüksek olduğundan dolayı biyoyararlanımı % 20 kadardır. Plazma yarı ömrü 2-8 saat arasında değişmektedir. % 90'ı plazma proteinlerine bağlanır ve karaciğerde metabolize olur. En az on iki metaboliti bulunmaktadır, bunlardan biri olan norverapamil vazodilatör aktivitenin % 20'sini sağlamaktadır (122, 123).

En önemli yan etkileri olarak, baş ağrısı, baş dönmesi, yorgunluk, mide bulantısı, yüzde kızarıklık, şişlik, sık idrara çıkma ve kabızlık görülmektedir. Verapamil kullanırken antiaritmik ve beta blokörlerle kombinasyonuna dikkat etmek gerekmektedir. Bradikardi ve kalp durmasına neden olabilmektedir (123).

2.5.3. 2-Aminoetoksidifenil Borat

2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB), IP_3 ile indüklenen Ca^{+2} salınımını değiştiren ve membrandan geçebilen bir kimyasaldır. 2-APB'nin, IP_3 ile Ca^{+2} salımı yapan diğer antagonistlerden farkı, plazma membranı veya intrasellüler veziküllerde bulunan Ca^{+2} kanallarını inhibe etmemesidir. Bu açıdan, 2-APB hücre dışından Ca^{+2} girişini etkilemeyen ilk IP_3 modülatörüdür (126, 127). 2-APB'nin, IP_3 ile indüklenen Ca^{+2} salınım inhibisyonu yaptığı hücre tiplerine platelet, suprakiazmatik nükleus, ventriküler kardiyomiyosit, çeşitli düz kas hücreler, pankreatik β hücresi, hipokampal nöron, iskelet myotüpler, nötrofil ve endotel hücreler örnek olarak verilebilir (128).

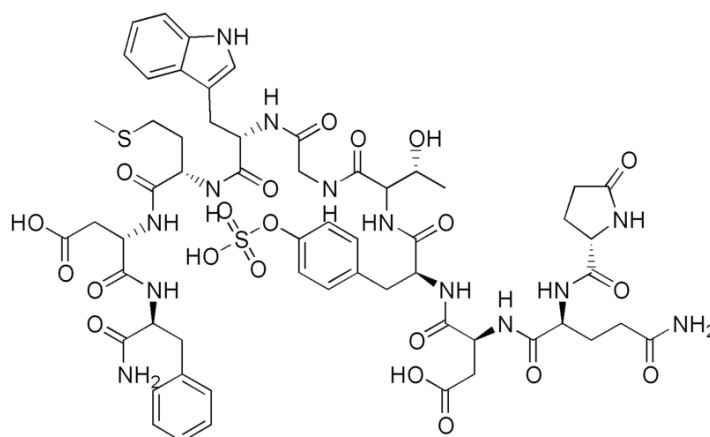


Şekil 2.15. 2-Aminoetoksidifenil borat'ın Yapısı (129)

2.6. Cerulein

Cerulein, on aminoasitlik bir oligopeptit olup, Avustralya kurbağası, *Hyla caerulea* ve diğer amfibilerin derisinden izole edilmektedir (Şekil 2.16). Aminoasit sekansı $Pglu-Gln-Asp-Tyr[SO_3H]-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2$ şeklindedir. Kolesistokininin analoğu olan cerulein, bazı ekstrasvasküler düz kaslar ile gastrik ve pankreatik sekresyon üzerine stimulan etki göstermektedir (130).

Deneysel hayvan modellerinde, Cerulein ile oluşturulan pankreatit en çok tercih edilen yöntem olup, insan ödematöz pankreatite benzerlik göstermektedir. Cerulein, bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) aktivasyonuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda, pankreatik asiner hücrelerde, interselüler adhezyon molekül-1 (ICAM-1) proteinlerinin artışı görülmektedir. Yüzey ICAM-1, pankreatik inflamasyonu arttıran asiner hücrelere nötrofil adezyonunu desteklemektedir (131). Cerulein, sindirim enzimleri üretimindeki bozukluk ve sitoplazmik vakuolizasyon yoluyla da pankreatiti indükleyebilmektedir. Bu durum, asiner hücre ölümüne ve pankreatik ödeme sebep olmaktadır. Aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin bir kaynağı olan NADPH oksidaz'ı da aktive etmektedir (132).



Şekil 2.16. Cerulein'in Yapısı (133)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Hazırlanması

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Deneysel Araştırmalar Birimi'nde, İnönü Üniversitesi hayvan etiği komitesi tarafından öngörülen kurallara uygun olarak yapıldı. Çalışmada ortalama 250-300 g ağırlığında, 3-4 aylık, 60 adet dişi Wistar albino rat kullanıldı. Tüm hayvanlar polipropilen kafeslerde tutuldu, ad libitum standart yem ve su ile beslendi, 22-24 °C sıcaklık ve 12 saat ışık-12 saat karanlık siklusuna uygun standart koşullar sağlandı. Ratlar, her grupta 12 adet olacak şekilde aşağıdaki gibi gruplandırıldı.

Grup 1: Kontrol grubu

Grup 2: Cerulein grubu

Grup 3: Cerulein + 2- APB grubu

Grup 4: Cerulein + Dantrolen grubu

Grup 5: Cerulein + Verapamil grubu

3.1.1. Akut Pankreatit Oluşturulması

Akut pankreatit indüksiyonu iki saat ara ile total doz 100 µg/kg (v.a) olacak şekilde iki kez intraperitoneal olarak uygulanan 50 µg/kg (v.a) cerulein (Sigma, USA) ile sağlandı (134, 135). Çözücü olarak % 0.9'luk serum fizyolojik kullanıldı.

3.1.2. Kalsiyum Kanal Blokörlerinin Verilmesi

2-APB (Sigma, USA): 2 mg/kg (v.a) 2-APB, cerulein enjeksiyonundan 15 dakika önce intraperitoneal olarak uygulandı. Çözücü olarak % 0.9'luk serum fizyolojik kullanıldı.

Dantrolen (Sigma, USA): 10 mg/kg (v.a) dantrolen, cerulein enjeksiyonundan 30 dakika önce intraperitoneal olarak uygulandı. Çözücü olarak % 0.9'luk serum fizyolojik kullanıldı.

Verapamil (Sigma, USA): % 0.9'luk serum fizyolojik solüsyonunda hazırlanan 2.5 mg/kg (v.a) Verapamil, cerulein enjeksiyonundan 30 dakika önce intraperitoneal olarak uygulandı.

3.1.3. Ratların Ötenazisi: İkinci cerulein enjeksiyonundan 12 saat sonra hayvanlar, yüksek doz eter inhalasyon anestezisi altında sakrifiye edildi.

Pankreatitin şiddetini belirlemek üzere histopatolojik değerlendirmelerin yanısıra serum amilaz ve lipaz düzeyleri ölçüldü.

Göğüs kafesi açılan ratların, enjektör ile kalp içine girmek sureti ile kanları alınarak, serum eldesi için 3500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Serumlar, amilaz ve lipaz ölçümleri için kullanılmak üzere -20 C° de saklandı.

Sakrifikasyon sonrası pankreas dokusu total olarak çıkarıldı. Histopatolojik incelemeler için alınan doku parçası % 10'luk formaldehit içerisinde bir gece tespit edildi. Geriye kalan pankreas dokusu, protein miktar tayininde, Tripsinojen aktivatör peptit (TAP), Katepsin B, Tripsinojen, tripsin ve Pankreatik Sekretuar Tripsin İnhibitör (PSTI) düzeylerinin ölçümünde kullanılmak üzere kuru buz içerisinde -40 C° derin dondurucuya transfer edildi ve ölçüm zamanına kadar burada muhafaza edildi.

3.2. Pankreas Dokularının Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

-40 C° derin dondurucu içerisinde muhafaza edilmiş olan pankreas dokuları, cam tüplere aktararak, üzerine soğuk 1mL fosfat tamponu (50mM, pH 7.4) eklendi. Daha sonra buz içerisinde Ultra-Turrax T25 (IKA Werke GmbH, Staufen, Almanya) homojenizatörü ile 6000 dev/dak hızla 5 dakika süreyle homojenize edildi. Elde

edilen homojenatlara, VWR Bronson scientific sonikatör (VWR Int. Ltd. Merck House Pool, İngiltere) kullanılarak 20 saniye aralıklarla 10 saniye 4 defa sonifikasyon yapıldı. Homojenatlar, vortekslendikten sonra eppendorf tüplere aktarıldı ve 15 dakika 4 C° de 13250 g'de (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatant ile protein miktar tayini, TAP, Katepsin B, Tripsinojen, Tripsin ve PSTI düzeylerinin ölçümü gerçekleştirildi.

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Serumda Pankreatik Amilaz Düzeyinin Ölçülmesi

Amilaz ölçümü, temin edilen pankreatik Amilaz ELISA kitinde belirtilen prosedüre göre (İmmundiagnostik, Almanya), (Basic Radim Immunoassay Operator (BRIO), Radim spa, İtalya) ELISA cihazında gerçekleştirildi (136). Prosedürün ilk inkübasyon basamağında, numunelerdeki pankreatik amilaz, 96 kuyucuklu mikrotiter plaklara kaplanmış olan pankreatik amilaza spesifik monoklonal fare antikoruna bağlandı. Bağlanmayan kalıntıları temizlemek için yıkama basamağı uygulandı. İkinci inkübasyon basamağında, antipankreatik amilaz (POD-monoklonal antikor) antikoruna eklenerek, tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, Tetrametilbenzidin (TMB) substratı ilave edildi. Reaksiyonu durdurmak için asidik bir stop solüsyonu eklendi. Pozitif numunelerde, renk maviden sarıya dönüştü. Konsantrasyon, 450 nm dalga boyunda kalibratörlerden elde edilen absorbanslar kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisinden hesaplandı (Şekil 3.1).

Reaktiflerin Hazırlanması:

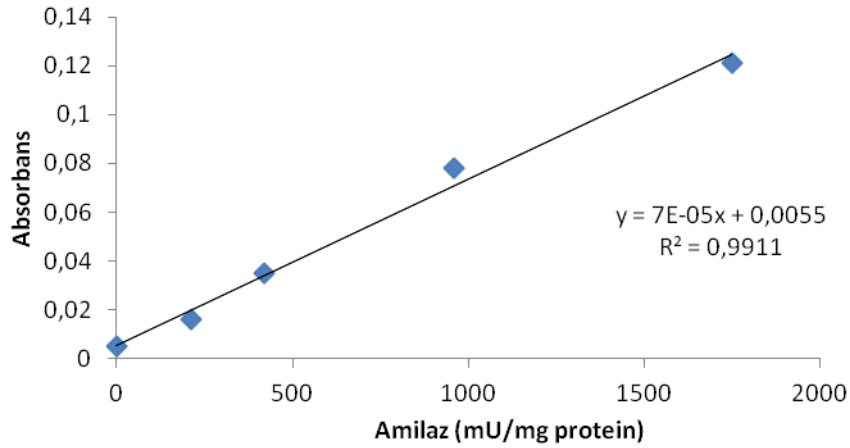
Kullanmadan önce tüm reaktif ve numunelerin oda sıcaklığına (18-26 C°) gelmeleri beklenildi.

- ELISA yıkama tamponu, ultra saf su ile 1:10 (100 mL + 900 mL ultra saf su) oranında seyreltilti.
- Liyofilize STD (Standart) ve CTRL (Kontrol) üzerine 250 µL ultra saf su eklenerek vial içeriğinin tamamen çözünebilmesi için 10 dakika beklenildi ve birkaç kez ters yüz edilerek karıştırıldı.

- CONJ (Peroksidaz ile konjuge antikor), 1:1000 (10 μ L+10 mL) oranında yıkama tamponu ile seyreltildi.
- Diğer tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildiğinde kullanıma hazır haldedir.

Pankreatik Amilaz ELISA Deneyinin Aşamaları:

1. STD, CTRL ve örnekler uygun şekilde dilüe edildikten sonra 96 kuyucuklu pankreatik amilaz antikoruyla kaplı kuyucuklara konuldu. Bu amaçla her bir kuyuya standart, kontrol ve örneklerden 100 μ L pipetlendi. Plak oda sıcaklığında, horizontal karıştırıcıda karıştırılarak 1 saat inkübe edildi.
2. 1 saatlik inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçildi. Yıkama işlemi, plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 250 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kez tekrarlandı. En son yıkama aşamasından sonra, ELISA plaklarının kuyucukları içindeki son kalıntıları da temizlemek için plak, adsorban kağıtlara hafifçe vurularak kurulandı.
3. Dilüe edilen konjugattan (POD-antikor) 100 μ L eklenerek, 1 saat oda sıcaklığında horizontal karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edildi.
4. 1 saatlik inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçildi. Bu işlem, plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 250 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kez tekrarlandı. En son yıkama aşamasından sonra, ELISA plaklarının kuyucukları içindeki son kalıntıları da temizlemek için plak, adsorban kağıtlara hafifçe vurularak kurulandı.
5. Yıkama aşamasını takiben her bir kuyucuğa 100 μ L TMB substratı eklenip, 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. Plaklara 50 μ L stop solüsyonu ilave edilip, kısa bir süre karıştırılarak reaksiyon durduruldu.
7. Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda değerlendirildi.



Şekil 3.1. Amilaz Standart Grafiği

3.3.2. Serumda Pankreatik Lipaz Düzeyinin Ölçülmesi

Pankreatik lipaz ölçümü, temin edilen pankreatik Lipaz ELISA kitinde (ALPHA DIAGNOSTIC, ABD) belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi (137). Prosedür, pankreatik lipazın sıralı olarak iki antikora bağlanması temeline dayanmaktadır. Bu antikorlardan biri plağa bağlanmış olup diğeri ise yaban turpu peroksidaz (HRP-Horseradish peroxidase) enzimi ile konjugedir. Yıkama işleminden sonra kromojenik substrat eklendi ve renk değişikliği görüldü. Numunedeki lipazın miktarı ile rengin şiddeti orantılıdır. Reaksiyonu sonlandırmak için durdurma solüsyonu eklendi. 450 nm’de absorbansları ölçülen numunelerin konsantrasyonları, standart eğrisinden hesaplandı (Şekil 3.2).

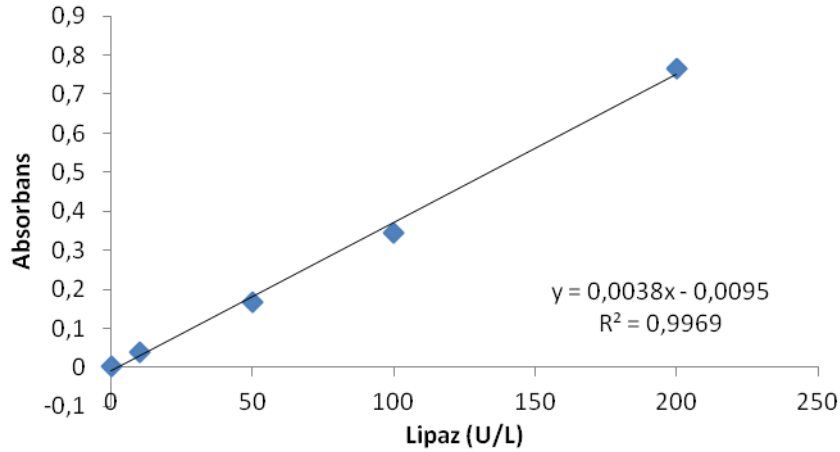
Reaktiflerin Hazırlanması:

Kullanmadan önce tüm reaktif ve numunelerin oda sıcaklığına (18-26 C°) gelmeleri beklendi.

- Yıkama tamponu 1:100 oranında distile su ile seyreltildi (1 L’de 10 mL stok).

Pankreatik Lipaz ELISA Deneyinin Aşamaları:

1. Standartlar (0, 10, 50, 100, 200 U/L), kontrol ve serum örneklerinden 25 µL uygun kuyucuklara konuldu. Her kuyucuğa HRP ile konjuge anti-lipaz enzim konjugatından 100 µL eklenerek 5-10 saniye hafifçe karıştırıldı.
2. Plağın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyonun ardından plaktaki sıvılar aspire edilerek otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 300 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
4. 100 µL TMB substratı her kuyucuğa eklenerek, plağın üzeri kapatılıp oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Standart ve pozitif örneklerde mavi renk oluşumu görüldü.
5. Reaksiyonu durdurmak için kuyucukların hepsine 50 µL stop solüsyonu eklendi. 5- 10 saniye hafifçe karıştırıldı (mavi renk sarıya döner).
6. Absorbanslar, 450 nm'de ELISA reader'da ölçüldü. Renk, reaksiyonun durdurulmasından 1 saat sonrasına kadar stabildir.



Şekil 3.2. Lipaz Standart Grafiği

3.3.3. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayininde Lowry metodu, protein standartı olarak da sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve

triptofan aminoasitlerinin fosfotungustat kompleksini molibden mavisine indirgemesi esasına dayanmaktadır (138).

Kullanılan reaktifler:

1. A Çözeltisi karışımı:

%2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N Sodyum Hidroksit'teki (NaOH) çözeltisi (98 hacim)

%1'lik Bakır Sülfat (CuSO_4) çözeltisi (1 hacim)

%2'lik Sodyum Potasyum tartarat çözeltisi (1 hacim)

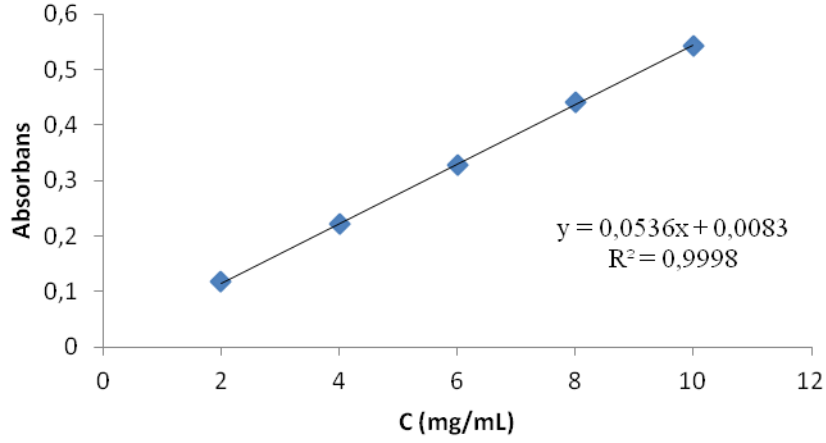
Bu üç çözelti yukarda belirtilen hacimlerde karıştırıldı.

2. B Çözeltisi: 1 hacim Folin Fenol belirteci + 1 hacim distile su.

3. Bovin Serum Albumin (BSA) Standardı: 10 mg/mL konsantrasyondaki stok BSA çözeltisinden 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL'lik çözeltiler hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı:

Test ve standart tüplerine 240 μL , kör tüpüne 250 μL distile su konuldu. 2,5 mL A çözeltisi tüm tüplere ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 μL süpernatant; standart tüplerine de 10 μL her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Oda ısısında karanlıkta 10 dk bekletildikten sonra, tüm tüplere 250 μL B çözeltisi eklendi. 25 °C'de 30 dk bekledikten sonra, spektrofotometrede (Shimadzu,UV-1200, Kyoto, Japan) 650 nm'de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı. Hesaplamalar standart grafiğinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Protein Standart Grafiği

3.3.4. Tripsin Tayini

Tripsin tayini, aşağıda açıklanmakta olan ve Worthington Laboratuvarlarında kullanılan metoda göre yapıldı (139). Bu metoda göre; bir Ünite tripsin, 25 C° ve pH 8.2’de 0.01 M kalsiyum iyonu varlığında, dakikada 1 µmol p-toluen-sülfonil-L-arjinin metilester’i (TAME) hidroliz etmektedir.

Reaktifler:

- 0.046 M Tris HCl Tamponu, pH 8.1 (0.0115 M CaCl₂ ile)
- 0.01 M TAME
- 0.001 N Hidroklorik asit (HCl)
- Enzim: 0.001 N HCl içinde 5, 10, 15, 20 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.

Çalışma Prosedürü:

Spektrofotometre 247 nm’ye ve 25 C° ye ayarlandı, reaktifler, aşağıdaki ölçülerde pipetlendi.

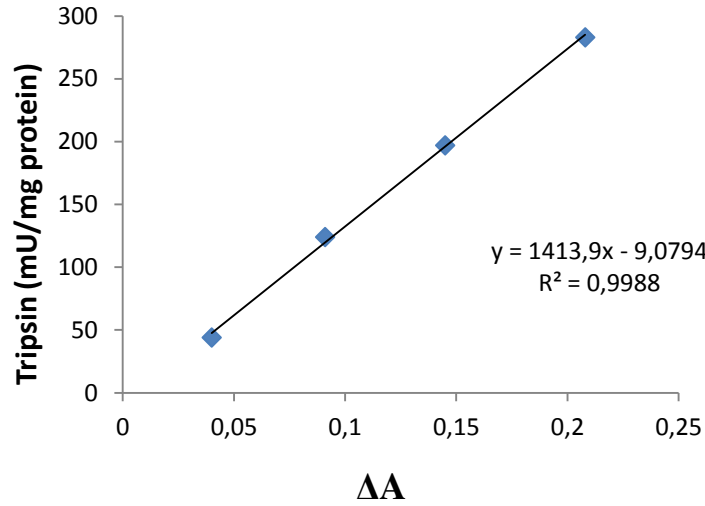
0.046 M Tris HCl tamponu, pH 8.1	2.6 mL
0.01 M TAME	0.3 mL

Spektrofotometrede, 3-4 dakika sıcaklık dengelenmesi ve kör ölçümü için inkübasyona bırakıldı. 0.1 mL dilüe enzim eklenerek, 247 nm’de 3 dakika ölçüm yapıldı. Standartlardan elde edilen absorbans değerleri ile standart grafiği hazırlandı (Şekil 3.4).

Hesaplama:

$$\text{Ünite/mg protein} = \frac{\Delta A_{247} \times 1000 \times 3}{540^* \times \text{mg reaksiyon karışımındaki tripsin}}$$

* 247 nm’de TAME’in ekstinsiyon katsayısı



Şekil 3.4. Tripsin Standart Grafiği

3.3.5. Pankreatik Sekretuar Tripsin İnhibitör Tayini

Çeşitli tripsin inhibitörlerinin, benzoil L-arjinin Etil Ester'in (BAEE) tripsin tarafından hidrolizini önleyebilirliği spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. İnhibitörün aktivitesi, 1 mg inhibitörün inhibe ettiği tripsin miktarı olarak açıklanmaktadır (140).

Reaktifler:

- Tripsin ayırıcı: 0.25 mM BAEE, pH 7.0'de 0.067 M fosfat tamponunda hazırlandı.
- 0.001 N HCl
- 0.5 M Sodyum potasyum fosfat tamponu, pH 6.5
- Tripsin solüsyonu: 0.001 N HCl içinde 0.5 mg/mL tripsin ile hazırlandı.
- Pankreatik inhibitör: 0.001 N HCl içinde 1 mg/mL hazırlandı.

Çalışma Prosedürü:

Bir seri test tüplerine reaktifler aşağıdaki ölçülerde pipetlenerek inkübasyon karışımı hazırlandı. Tüpler, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kontrol için, iki test tüpüne inhibitör eklemekten ölçüm yapıldı.

Tripsin solüsyonu	1.0 mL
0.5 M fosfat tamponu	2.0 mL
İnhibitör	10, 20, 30, 40, 50 µg
Distile su ile	10 mL'ye tamamlandı

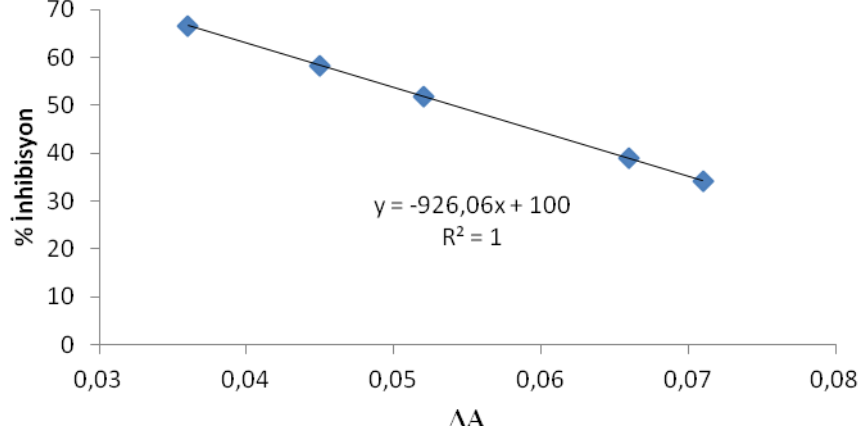
Spektrofotometre 25 C° ve 253 nm'ye ayarlandı. Küvete tripsin reaktifinden 2.9 mL eklenerek, 3-4 dakika sıcaklık dengelenmesi ve kör ölçümü için beklendi. 0.1 mL inkübasyon karışımından eklenip, 3 dakika boyunca absorbanstaki artış kaydedildi.

Hesaplama:

$$\text{mg inhibe tripsin/mg inhibitör} = \frac{[(\Delta A_{253} / \text{dk})_{\text{kontrol}} \times (\Delta A_{253} / \text{dk})_{\text{numune}} \times 5.0^*]}{[(\Delta A_{253} / \text{dk})_{\text{kontrol}} \times \mu\text{g reaksiyon karışımındaki inhibitör}]}$$

*5.0 = Reaksiyon karışımındaki μg tripsin

Absorbanstaki değişim ile % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek standart grafiği hazırlandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. PSTI Standart Grafiği

3.3.6. Tripsinojen Tayini

Tripsinojen tayini, Rat tripsinojen ELISA kitinde (CUSABIO BIOTECH, Çin) belirtilen prosedüre göre yapıldı (141). Rat tripsinojen ELISA kitinde, mikrotiter plaklar, tripsinojen'e (Try) spesifik bir antikorla kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler, uygun mikrotiter plak kuyucuklarına eklendi, daha sonra Try'e spesifik biotin ile konjuge antikorla ve sonrasında avidin ile konjuge HRP her bir kuyucuğa eklenerek inkübe edildi. TMB substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. Biotin ile konjuge antikor ve avidin ile konjuge HRP, sadece Try içeren kuyucuklarda renk değişikliğine sebep oldu. Enzim-substrat reaksiyonu, ortama sülfürik asit ilavesi ile sonlandırıldı. Renkteki değişiklik, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Numunelerdeki Try konsantrasyonu standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.6).

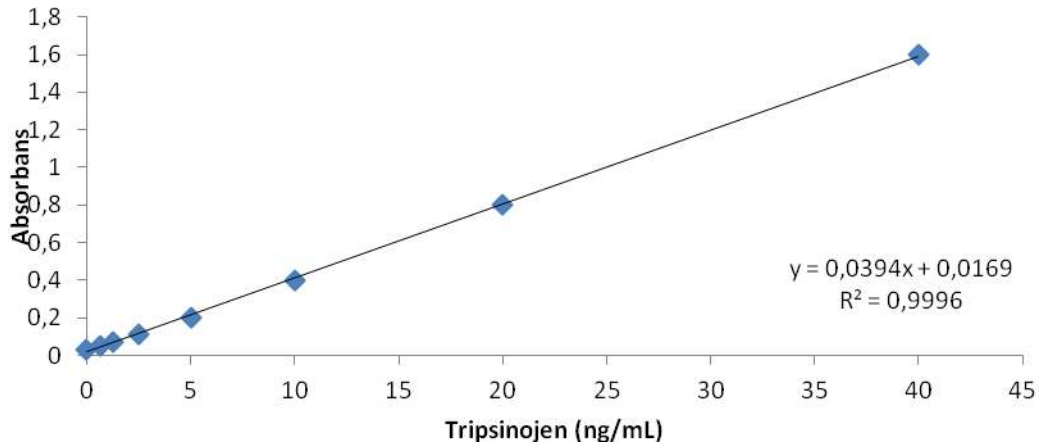
Reaktiflerin Hazırlanması:

- Yıkama Tamponu: Konsantre 20 mL yıkama tamponu deiyonize veya distile su ile 500 mL'ye seyreltildi.

- Biotin-antikor: Açılmadan önce vial santrifüj edilerek Biotin- antikor dilüenti ile 1:100 oranında seyreltildi.
- HRP-avidin: Açılmadan önce vial santrifüj edilerek HRP-avidin dilüenti ile 1:100 oranında seyreltildi.
- Standartlar: Vialler 6000-10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek 1 mL sample dilüenti ile standart hazırlandı. 40 ng/mL olan bu stok solüsyonundan 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.63 ng/mL seri dilüsyonlar yapıldı. Sample dilüenti ise sıfır standart (0 ng/mL) olarak kullanıldı.

Tripsinojen ELISA Deneyinin Aşamaları:

1. Standart, kör ve numunelerden 100 µL her kuyucuğa eklenip plağın üzeri kapatılarak 2 saat 37 C° de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında sıvı kısım aspire edildi, ama yıkanmadı.
2. 100 µL Biotin-antikor çalışma solüsyonu her kuyucuğa eklendi ve 1 saat 37 C° de inkübe edildi.
3. Her kuyucuk aspire edildikten sonra yıkandı. Yıkama işleminde, kuyucuklarda 200 µL yıkama tamponu 2 dakika bekletildi, sonra aspire edildi. Yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.
4. 100 µL HRP-avidin çalışma solüsyonu her kuyucuğa eklenerek, plağın üzeri kapatılıp 1 saat 37 C° de inkübe edildi.
5. Aspirasyon işlemi ve 5 defa yıkama işlemleri tekrar edildi.
6. 90 µL TMB substrat eklendi ve 10-30 dakika 37 C° de inkübe edildi.
7. 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
8. 30 dakika içinde her kuyucuğun 450 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü.



Şekil 3.6 Tripsinojen Standart Grafiği

3.3.7. Tripsinojen Aktivatör Peptit (TAP) Tayini

TAP tayini için rat TAP ELISA kitinde (USCNK, Çin) belirtilen metod kullanıldı (142). Rat TAP ELISA kitinde, mikrotiter plaklar, TAP'a spesifik bir antikorla kaplıdır. Standartlar ve örnekler, uygun mikrotiter plak kuyucuklarına eklendi, daha sonra TAP'a spesifik biotin ile konjuge poliklonal antikorla ve sonrasında avidin ile konjuge HRP her bir kuyucuğa eklenerek inkübe edildi. TMB substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. Biotin ile konjuge antikor ve avidin ile konjuge HRP, sadece TAP içeren kuyucuklarda renk değişikliğine sebep oldu. Enzim-substrat reaksiyonu, ortama sülfürik asit ilavesi ile sonlandırıldı. Renkteki değişiklik, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Numunelerdeki TAP konsantrasyonu standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.7 ve şekil 3.8).

Reaktiflerin Hazırlanması:

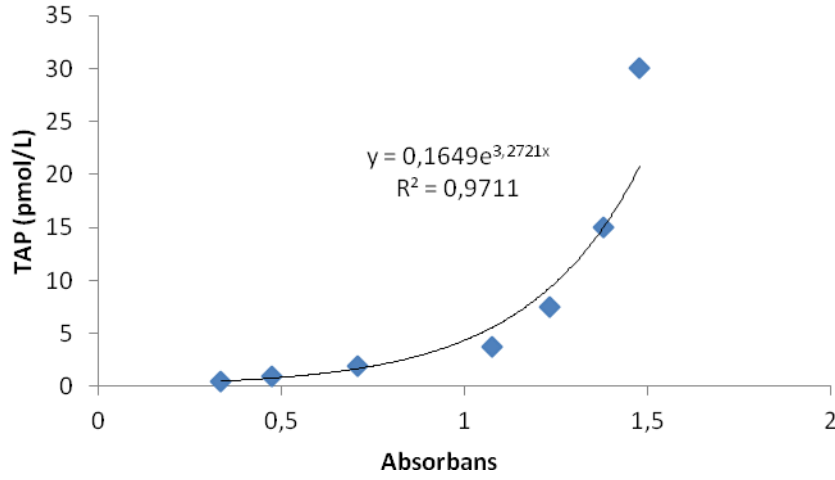
- Kit'in tüm bileşenleri kullanmadan önce oda sıcaklığına (18-25 C°) getirildi.
- Standartlar: 1 mL standart dilüenti ile hazırlanan standart solüsyonu oda sıcaklığında 10 dakika hafifçe karıştırılarak bekletildi. Stok solüsyonundaki standart konsantrasyonu 30 pmol/ L'dir. Son hacim 0.5 mL olacak şekilde 7 adet, 15 pmol/L, 7.5 pmol/L, 3.75 pmol/L, 1.88 pmol/L, 0.94 pmol/L, 0.47

pmol/L ve 0 pmol/L (Standart Dilüenti) konsantrasyonlarında seri dilüsyonlar hazırlandı.

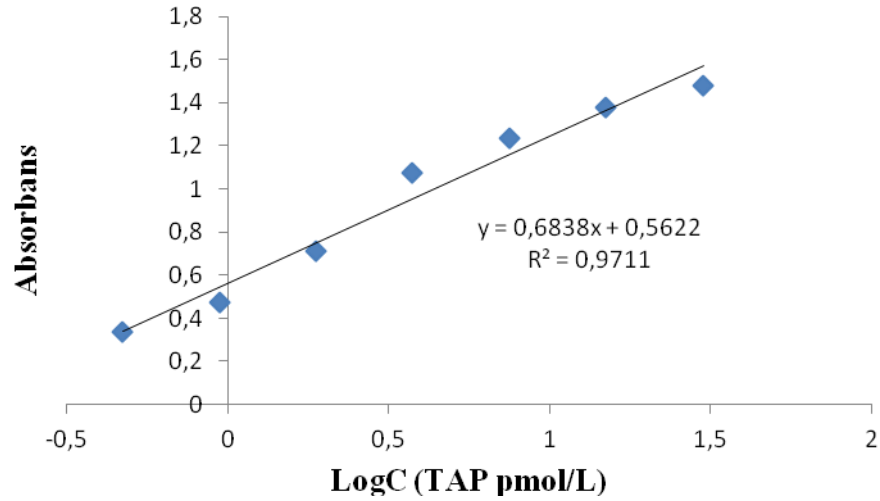
- Numuneler, 1:100 oranında 0.02 M PBS (pH= 7-7.2) ile seyreltildi.
- Çalışma dilüenti A ve B: 6 mL konsantre (x2) çalışma dilüenti A ve B, 6 mL deiyonize veya distile su ile 12 mL çalışma dilüenti A ve B hazırlandı.
- Deteksiyon Reaktif A ve Reaktif B: Kullanmadan önce santrifüj edildi. Çalışma dilüenti A veya B ile 1:100 oranında seyreltildi.
- Yıkama solüsyonu: 20 mL konsantre yıkama solüsyonu (30x), 580 mL deiyonize veya distile su ile 600 mL olacak şekilde seyreltildi (1x).

Tripsinojen Aktivasyon Peptit ELISA Deneyinin Aşamaları:

1. Standart, kör ve numunelerden 100 µL her kuyucuğa eklenerek plağın üzeri kapatılarak 2 saat 37 C° de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında sıvı kısım aspire edildi, ama yıkanmadı.
2. 100 µL deteksiyon reaktif A (Biotin-poliklonal antikor) çalışma solüsyonu her kuyucuğa eklendi ve 1 saat 37 C° de inkübe edildi.
3. Her kuyucuk aspire edildikten sonra yıkandı. Yıkama işleminde, kuyucuklarda 350 µL yıkama tamponu 1-2 dakika bekletildi, sonra aspire edildi. Yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.
4. 100 µL deteksiyon reaktif B (Avidin-HRP) çalışma solüsyonu her kuyucuğa eklenerek, plağın üzeri kapatılıp 1 saat 37 C° de inkübe edildi.
5. Aspirasyon işlemi ve 5 defa yıkama işlemleri tekrar edildi.
6. 90 µL TMB substrat eklendi ve 15-25 dakika 37 C° de inkübe edildi.
7. 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
8. Her kuyucuğun 450 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü.



Şekil 3.7. TAP Standart Grafik-1



Şekil 3.8. TAP Standart Grafik-2

3.3.8. Katepsin B Aktivite Ölçümü

Katepsin B (KB) ölçümü, Cathepsin B Aktivite test kitinde (BioVision, ABD) belirtilen florometrik metoda dayanmaktadır (143). Bu kitte, Amino-4-triflorometil kumarin (AFC) ile etiketlenmiş Katepsin B substratının RR dizisi tercih edilmektedir. Katepsin B içeren hücre lizatları veya diğer örnekler, sentetik substrat

RR-AFC kompleksinden AFC'yi serbestleştirmektedir. Salınan AFC, florometrede ölçülebilmektedir.

Katepsin B Test Aşamaları:

1. 50 µL örnek her kuyucuğa eklendi.
2. 50 µL KB reaksiyon tamponu her kuyucuğa eklendi.
3. 2 µL 10 mM KB substrat Ac-RR-AFC ilave edildi (200 µM son konsantrasyon). Negatif kontrol için 2 µL KB İnhibitör eklendi.
4. 37 C° de 1-2 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında numuneler, florometrede 400 nm eksitasyon ve 505 nm emisyon filtresi (MOLECULAR DEVICES, SPECTRAMAX GEMINI XS, ABD) ile ölçüldü. Sonuçlar RFU/mg protein olarak verildi.

3.4. Pankreas Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi

Pankreas doku numuneleri % 10'luk formalin solüsyonunda bekletildi ve standart metod kullanılarak parafine gömüldü. Daha sonra 5 µm büyüklüğünde kesitler alınarak hematoksilin-eosin (H-E) ile boyandı ve ışık mikroskobu (OLYMPUS BX 50, Japonya) altında incelendi. Dembin'ski ve arkadaşlarının yöntemi uyarınca 0 ile 3 arasında skor kullanılarak pankreatik ödem, lökosit infiltrasyon, asiner vakuolizasyon ve nekroz düzeyleri değerlendirildi (144).

3.5. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Amilaz, lipaz, tripsin, PSTI, TAP, Katepsin B düzeyleri için parametrik test olan tek yönlü varyans analizi ile gruplar arasında fark bulunup bulunmadığı incelendi. Fark olanlarda LSD testi ile farkın hangi ikili karşılaştırmalardan kaynaklandığı belirlendi. Tripsinojen için ise gruplar arasında fark bulunup bulunmadığı nonparametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile ikili karşılaştırmalar da Mann-Whitney U testi uygulanarak belirlendi. Ödem, lökosit infiltrasyon, asiner vakuolizasyon ve nekroz

için grup ortalamaları ve Standart hata hesaplandı. Total pankreatik hasar için ise ANOVA testi yapıldı. Gruplar arasında fark çıkması üzerine LSD testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Tüm bu testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, akut pankreatit hastalığının patogeneziindeki anahtar mekanizma olan intrasellüler tripsinojen aktivasyonu üzerine, hücrelerde Ca^{+2} homeostazisinde görevli olan L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı, IP_3 ve ryanodin reseptörlerinin olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, bir kolesistokinin analogu olan Cerulein ile indüklenen akut pankreatitte, L-tipi kalsiyum kanalı blokörü Verapamil, IP_3 R blokörü 2-Aminoetoksi difenil borat (2-APB) ve ryanodin reseptör blokörü Dantrolen gibi Ca^{+2} kanal blokörleri kullanılmıştır. Bu çalışmada elde edilen tüm veriler, tablolar (Tablo 4.1-4.22) ve grafikler (Şekil 4.1-4.8) halinde aşağıda sunulmuştur.

4.1. Pankreas Doku Hasarının Histolojik Değerlendirilmesi

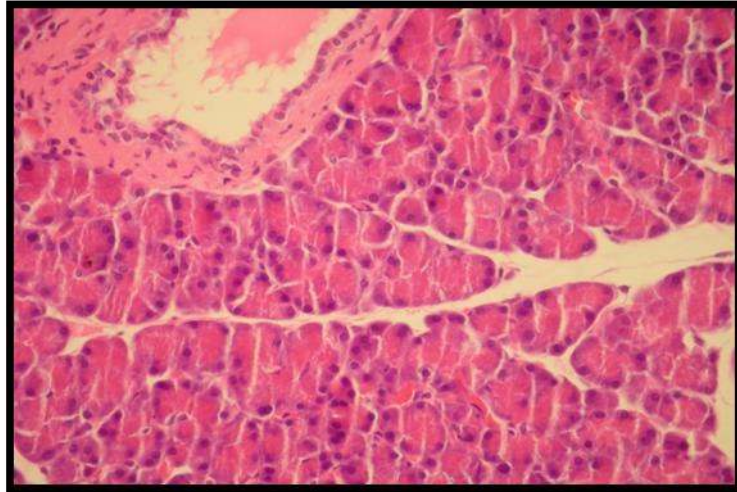
Tablo 4.1. Deney Gruplarına ait Pankreatik Hasar Skorları

Gruplar	Ödem (0-3)	Lökosit İnfiltrasyon (0-3)	Asiner Vakuolizasyon (0-3)	Nekroz (0-3)	Total Pankreatik Hasar
Kontrol	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Cerulein	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	0.80±0.20	6.80±0.20
Cerulein+2-APB	1.20±0.20	1.20±0.20	1.20±0.20	0.60±0.24	4.20±0.20
Cerulein+Dantrolen	1.60±0.24	1.20±0.20	1.40±0.24	0.60±0.24	4.80±0.58
Cerulein+Verapamil	1.20±0.20	1.40±0.20	1.20±0.20	0.60±0.24	4.40±0.40

Tablo 4.2. Total Pankreatik Hasar'a ait İkili Karşılaştırmalar

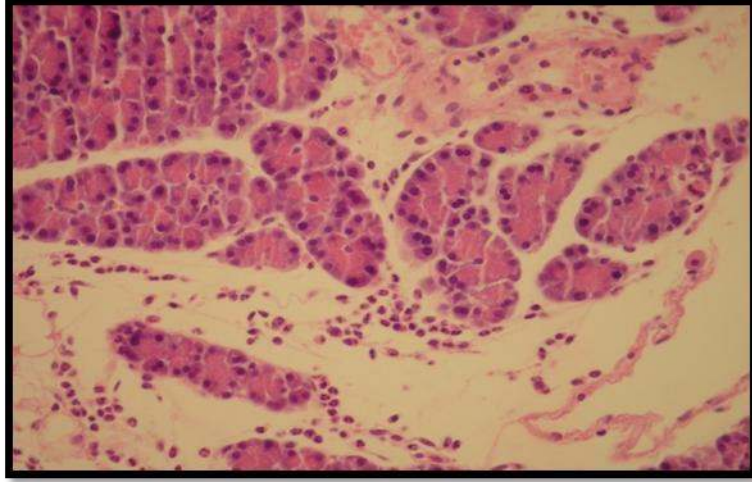
	Kontrol	Cerulein	Cerulein+ 2-APB	Cerulein+ Dantrolen	Cerulein+ Verapamil
Kontrol	*****	0.000	0.000	0.000	0.000
Cerulein		*****	0.000	0.000	0.000
Cerulein+2-APB			*****	p>0.05	p>0.05
Cerulein+Dantrolen				*****	p>0.05
Cerulein+Verapamil					*****

Tablo 4.1’de gösterildiği üzere, pankreatik hasarın belirlenmesi için ödem, lökosit infiltrasyon, asiner vakuolizasyon ve nekroz düzeyleri değerlendirilmiştir. 0-3 arasında skorlanan hasarın, grup ortalamaları ve Standart hata verileri tablo 4.1’de verilmiştir. Her bir grup için verilen skorların toplamından total pankreatik hasar düzeyi belirlenmiştir. Buna göre, kontrol grubunda pankreatik hasar gözlenmezken, cerulein verilen akut pankreatit grubunda, total pankreatik hasar 6.8 olup akut ödematöz pankreatit formundadır. Ayrıca, blokör verilen tüm gruplarda total pankreatik hasarın azaldığı gösterilmektedir. Tablo 4.2’de ise total pankreatik hasara ait ikili karşılaştırmalar verilmiş olup, total pankreatik hasarın blokörler tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltıldığını göstermektedir.



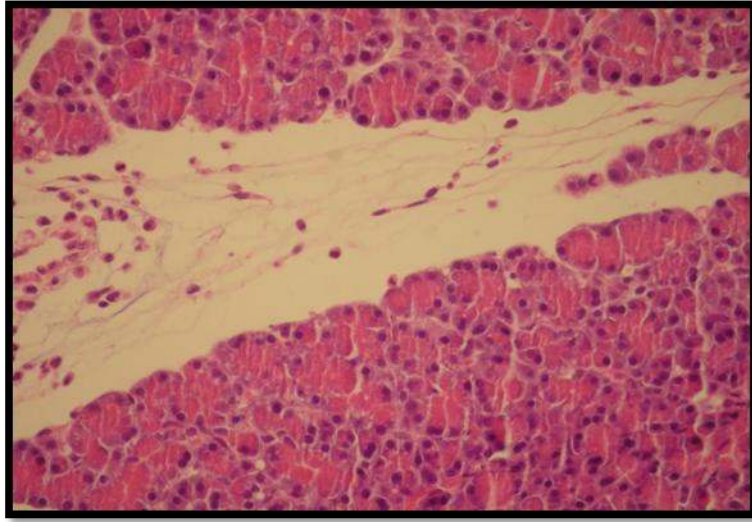
Şekil 4.1.a. Kontrol grubuna ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü

Şekil 4.1.a’da gösterdiği üzere kontrol grubunda normal sınırlarda pankreas dokusuna rastlanmaktadır. Herhangi bir patolojik bulgu gözlenmemektedir.



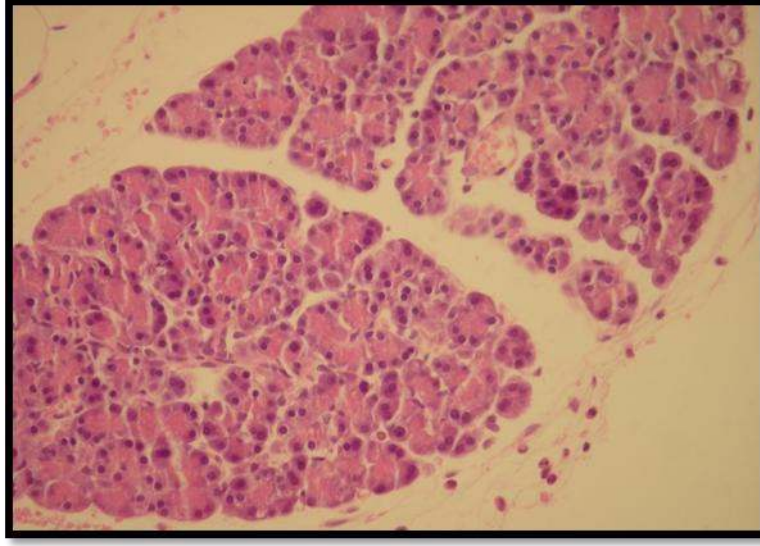
Şekil 4.1.b. Cerulein Grubuna ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü

Şekil 4.1.b’de gösterildiği gibi cerulein verilen akut pankreatit grubunda, ekzokrin komponent içerisinde nötrofiler lökosit infiltrasyonu, intersisyumda belirgin ödem ve parenkimde yer yer vakuoller mevcut olmakla birlikte epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler gözlenmektedir.



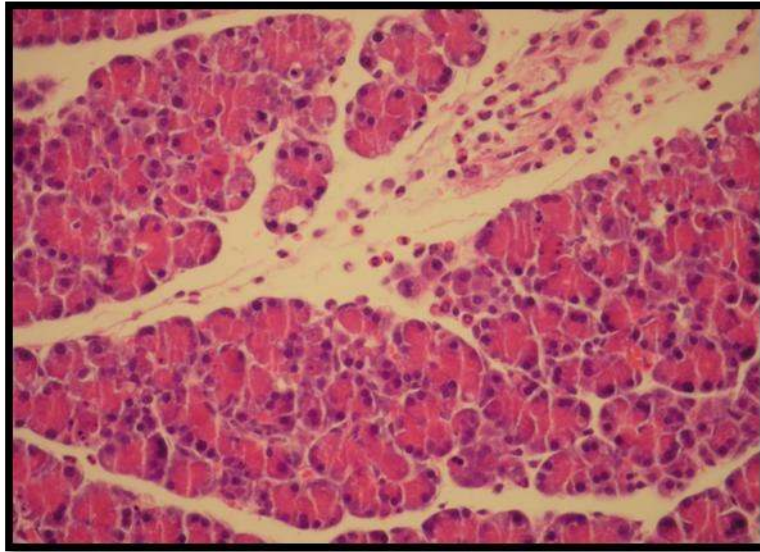
Şekil 4.1.c. Cerulein+2-APB Grubuna ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü

Şekil 4.1.c. de gösterildiği üzere 2- APB verilen grubun pankreas dokusunda, cerulein grubuna göre daha hafif olmak üzere parenkimde dejeneratif değişiklikler ve intersisyumda orta derecede ödem ve lökosit infiltrasyonu gözlenmektedir.



Şekil 4.1.d. Cerulein+Dantrolen Grubuna ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü

Şekil 4.1.d’de Dantrolen verilen grupta, parenkim hasarı orta derecede olup, intersisyumda belirgin ödeme rastlanmaktadır.



Şekil 4.1.e. Cerulein+Verapamil Grubuna ait Pankreas Dokusunun Histolojik Görüntüsü

Şekil 4.1.e’de gösterildiği üzere Verapamil verilen grupta belirgin bir parenkim hasarı, intersisyumda hafif ödem ve lökosit infiltrasyonu göze çarpmaktadır.

4.2. Serum Amilaz Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4.3. Amilaz’a ait ANOVA Verileri

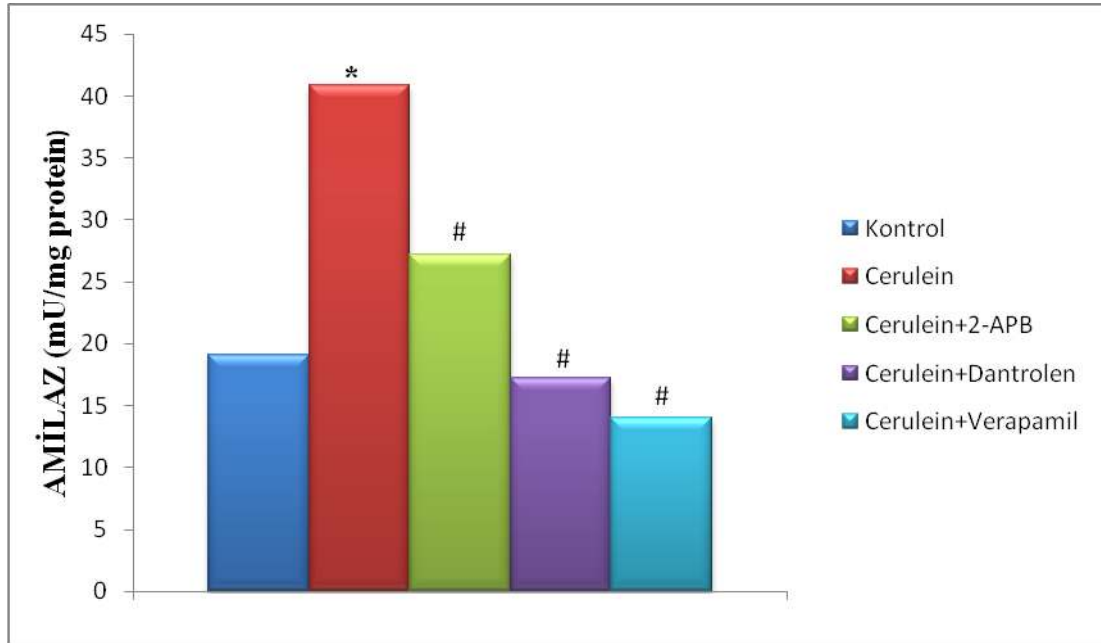
	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F	P
Gruplar Arası	5549.02	4	1387.25	8.10	0.000
Gruplar İçi	9422.53	55	171.32		
Toplam	14971.55	59			

Tablo 4.4. Amilaz’a ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri

Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama mU/mg protein	Standart Hata
Kontrol	12	19.06	2.68
Cerulein	12	40.82	4.05
Cerulein+2-APB	12	27.16	5.05
Cerulein+Dantrolen	12	17.20	4.16
Cerulein+Verapamil	12	14.02	2.25
Total	60	23.65	2.05

Tablo 4.5. Amilaz'a ait İkili Karşılaştırmalar

	Kontrol	Cerulein	Cerulein+2-APB	Cerulein+Dantrolen	Cerulein+Verapamil
Kontrol	*****	0.000	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Cerulein		*****	0.013	0.000	0.000
Cerulein+2-APB			*****	p>0.05	0.017
Cerulein+Dantrolen				*****	p>0.05
Cerulein+Verapamil					*****

**Şekil 4.2.** Gruplar Arası Amilaz Seviyelerinin Karşılaştırılması

* Kontrolü ile Karşılaştırıldığında p<0.05

#Cerulein ile Karşılaştırıldığında p<0.05

Amilaz'a ait tablo 4.3, 4.4, 4.5 ve şekil 4.2'de gösterildiği üzere kontrol ile karşılaştırıldığında Cerulein grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Blokör verilen diğer gruplarda kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Cerulein grubu ile karşılaştırıldığında 2-APB, Dantrolen ve Verapamil verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

4.3. Serum Lipaz Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4.6. Lipaz'a ait ANOVA Verileri

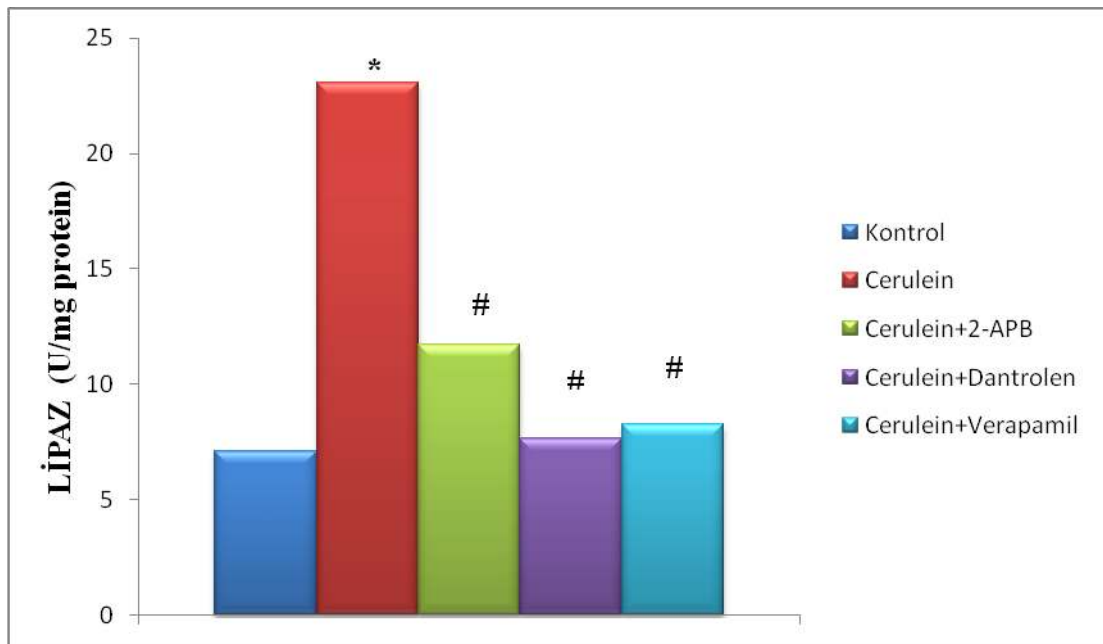
	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F	p
Gruplar Arası	2143.54	4	535.89	8.12	0.000
Gruplar İçi	3596.13	55	65.38		
Toplam	5739.67	59			

Tablo 4.7. Lipaz'a Ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri

Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama U/mg protein	Standart Hata
Kontrol	12	7.08	1.69
Cerulein	12	23.07	2.88
Cerulein+2-APB	12	11.69	2.60
Cerulein+Dantrolen	12	7.68	2.18
Cerulein+Verapamil	12	8.25	2.14
Total	60	11.55	1.27

Tablo 4.8. Lipaz'a ait İkili Karşılaştırmalar

	Kontrol	Cerulein	Cerulein+2-APB	Cerulein+Dantrolen	Cerulein+Verapamil
Kontrol	*****	0.000	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Cerulein		*****	0.001	0.000	0.000
Cerulein+2-APB			*****	p>0.05	p>0.05
Cerulein+Dantrolen				*****	p>0.05
Cerulein+Verapamil					*****

**Şekil 4.3.** Gruplar Arası Lipaz Seviyelerinin Karşılaştırılması

* Kontrolü ile Karşılaştırıldığında p<0.05

#Cerulein ile Karşılaştırıldığında p<0.05

Lipaz'a ait tablo 4.6, 4.7, 4.8 ve şekil 4.3'de gösterildiği üzere kontrol ile karşılaştırıldığında Cerulein grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Blokör verilen diğer gruplarda kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Cerulein grubu ile karşılaştırıldığında 2-APB, Dantrolen ve Verapamil verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

4.4. Pankreas Dokusu Tripsin Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tripsin'e ait tablo 4.9, 4.10, 4.11 ve şekil 4.4'te gösterildiği üzere kontrol ile karşılaştırıldığında Cerulein grubundaki tripsin düzeylerinde küçük bir artışın olduğu, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Dantrolen grubunda tripsin düzeylerindeki artış ise istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). hasta grubu ile karşılaştırıldığında, 2-APB ve Verapamil verilen gruplarda tripsin düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4.9. Tripsin'e ait ANOVA Verileri

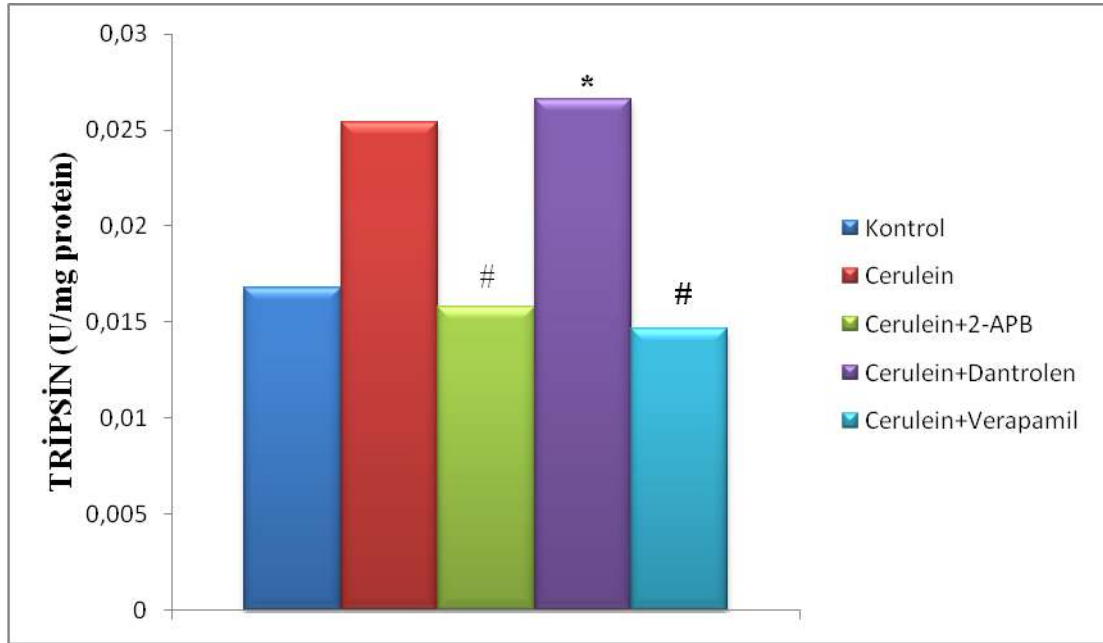
	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F	p
Gruplar Arası	0.002	4	0.000	3.05	0.024
Gruplar İçi	0.007	55	0.000		
Toplam	0.009	59			

Tablo 4.10. Tripsin'e ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri

Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama U/mg protein	Standart Hata
Kontrol	12	0.0168	0.0025
Cerulein	12	0.0254	0.0028
Cerulein+2-APB	12	0.0158	0.0027
Cerulein+Dantrolen	12	0.0266	0.0050
Cerulein+Verapamil	12	0.0147	0.0025
Total	60	0.0198	0.0016

Tablo 4.11. Tripsin'e Ait İkili Karşılaştırmalar

	Kontrol	Cerulein	Cerulein+ 2-APB	Cerulein+ Dantrolen	Cerulein+ Verapamil
Kontrol	*****	p>0.05	p>0.05	0.038	p>0.05
Cerulein		*****	0.041	p>0.05	0.023
Cerulein+2-APB			*****	0.022	p>0.05
Cerulein+Dantrolen				*****	0.012
Cerulein+Verapamil					*****



Şekil 4.4. Gruplar Arası Tripsin Seviyelerinin Karşılaştırılması

* Kontrolü ile Karşılaştırıldığında $p < 0.05$

#Cerulein ile Karşılaştırıldığında $p < 0.05$

4.5. Pankreas Dokusu PSTI Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4.12. PSTI'e ait ANOVA Verileri

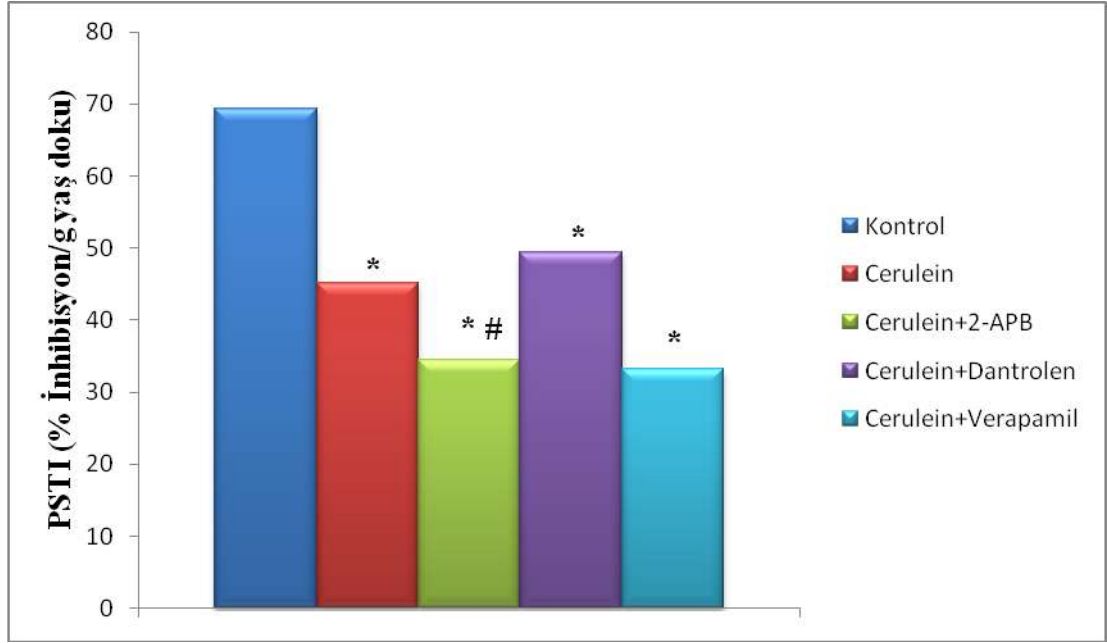
	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F	p
Gruplar Arası	10221.07	4	2555.27	12.54	0.000
Gruplar İçi	11208.76	55	203.80		
Toplam	21429.83	59			

Tablo 4.13. PSTI'e ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri

Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama %inh./g yaş doku	Standart Hata
Kontrol	12	69.27	4.93
Cerulein	12	45.12	3.47
Cerulein+2-APB	12	34.43	3.35
Cerulein+Dantrolen	12	49.40	5.46
Cerulein+Verapamil	12	33.17	2.75
Total	60	46.28	2.46

Tablo 4.14. PSTI'e ait İkili Karşılaştırmalar

	Kontrol	Cerulein	Cerulein+ 2-APB	Cerulein+ Dantrolen	Cerulein+ Verapamil
Kontrol	*****	0.000	0.000	0.001	0.000
Cerulein		*****	0.041	p>0.05	0.045
Cerulein+2-APB			*****	0.013	p>0.05
Cerulein+Dantrolen				*****	0.007
Cerulein+Verapamil					*****



Şekil 4.5. Gruplar Arası PSTI Seviyelerinin Karşılaştırılması

* Kontrolü ile Karşılaştırıldığında $p<0.05$

#Cerulein ile Karşılaştırıldığında $p<0.05$

Tablo 4.12, 4.13, 4.14 ve şekil 4.5'te gösterildiği üzere kontrol ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda PSTI düzeylerinin azaldığını ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Cerulein grubu ile karşılaştırıldığında 2-APB ve Verapamil gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu ($p<0.05$), dantrolen grubundaki inhibitör düzeyinde hafif bir yükselme olduğu, fakat anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). 2-APB ve Verapamil gruplarındaki azalma dantrolen grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

4.6. Pankreas Dokusu TAP Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4.15. TAP için ANOVA Verileri

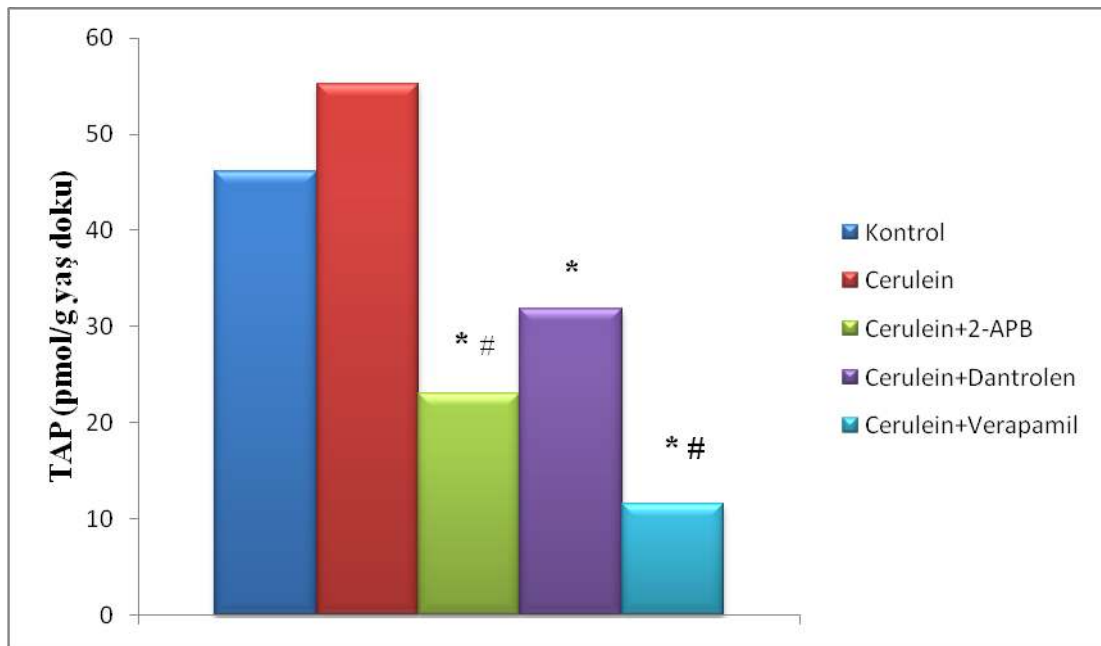
	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F	p
Gruplar Arası	14673.2	4	3668.3	8.2	0.000
Gruplar İçi	24570.9	55	446.7		
Toplam	39244.1	59			

Tablo 4.16. TAP'e ait Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri

Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama pmol/mg protein	Standart Hata
Kontrol	12	46.17	8.11
Cerulein	12	55.21	5.76
Cerulein+2-APB	12	23.09	4.81
Cerulein+Dantrolen	12	31.92	7.88
Cerulein+Verapamil	12	11.58	1.42
Total	60	33.60	3.33

Tablo 4.17. TAP'e ait İkili Karşılaştırmalar

	Kontrol	Cerulein	Cerulein+2-APB	Cerulein+Dantrolen	Cerulein+Verapamil
Kontrol	*****	p>0.05	0.010	p>0.05	0.000
Cerulein		*****	0.000	0.009	0.000
Cerulein+2-APB			*****	p>0.05	p>0.05
Cerulein+Dantrolen				*****	0.022
Cerulein+Verapamil					*****

**Şekil 4.6.** Gruplar Arası TAP Seviyelerinin Karşılaştırılması

* Kontrolü ile Karşılaştırıldığında p<0.05

#Cerulein ile Karşılaştırıldığında p<0.05

Tablo 4.15, 4.16, 4.17 ve şekil 4.6’te gösterildiği üzere TAP düzeylerinde kontrol ile karşılaştırıldığında Cerulein grubunda bir artışın olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Blokör verilen diğer gruplara bakıldığında, 2-APB ve Verapamil gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmanın olduğu ($p<0.05$), dantrolen grubundaki azalmanın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Cerulein ile karşılaştırıldığında, TAP düzeylerinin, 2-APB, Verapamil ve Dantrolen gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0.005$).

4.7. Pankreas Dokusu Katepsin B Düzeylerinin Değerlendirilmesi

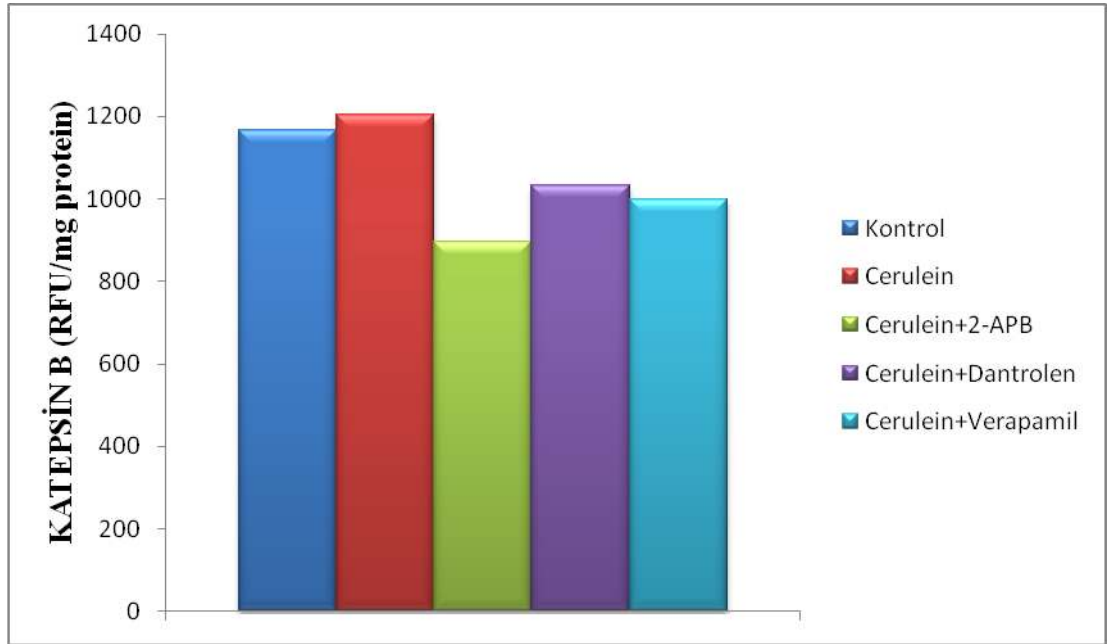
Katepsin B’e ait tablo 4.18, 4.19 ve şekil 4.7’de gösterildiği üzere kontrol ile karşılaştırıldığında Cerulein grubundaki Katepsin B düzeyinde hafif bir artışın olduğu, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). 2-APB, Verapamil ve Dantrolen gruplarında, Cerulein grubu ile karşılaştırıldığında, Katepsin B düzeylerinde bir azalmanın olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

Tablo 4.18. Katepsin B için ANOVA Verileri

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F	p
Gruplar Arası	760559.30	4	190139.8	0.37	0.83
Gruplar İçi	27974466	55	508626.7		
Toplam	28735025	59			

Tablo 4.19. Katepsin B için Grup Ortalamaları ve Standart Hata Verileri

Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama RFU/mg protein	Standart Hata
Kontrol	12	1165.84	268.29
Cerulein	12	1203.27	157.56
Cerulein+2-APB	12	895.19	138.19
Cerulein+Dantrolen	12	1032.71	277.24
Cerulein+Verapamil	12	998.78	138.43
Total	60	1059.16	90.09

**Şekil 4.7.** Gruplar Arası Katepsin B Seviyelerinin Karşılaştırılması

* Kontrolü ile Karşılaştırıldığında $p < 0.05$

#Cerulein ile Karşılaştırıldığında $p < 0.05$

4.8. Pankreas Dokusu Tripsinojen Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4.20. Tripsinojen'e ait Grup Ortalama Değerleri

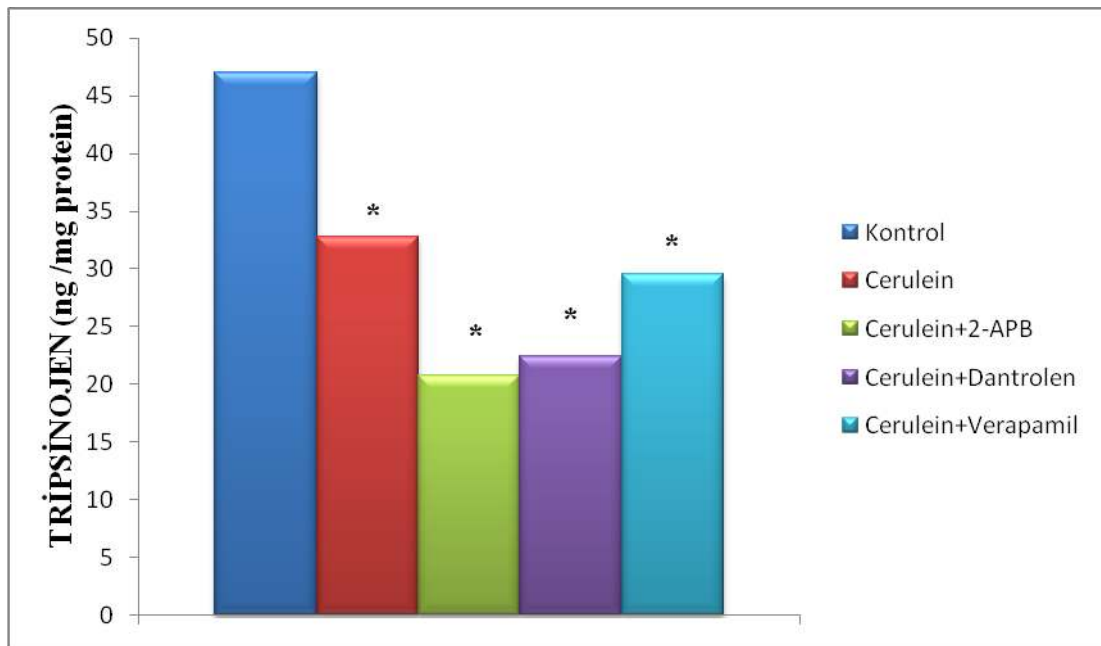
Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama Değer ng tripsinojen/mg protein
Kontrol	12	47.0
Cerulein	12	32.8
Cerulein+2-APB	12	20.8
Cerulein+Dantrolen	12	22.4
Cerulein+Verapamil	12	29.6
Total	60	

Tablo 4.21. Tripsinojen'e Ait Kruskal-Wallis Değerleri

	Tripsinojen
Ki-Kare (t)	17.3
Serbestlik derecesi	4
p	0.002

Tablo 4.22. Tripsinojen'e ait İkili Karşılaştırmalar

	Kontrol	Cerulein	Cerulein+2-APB	Cerulein+Dantrolen	Cerulein+Verapamil
Kontrol	*****	0.017	0.001	0.001	0.007
Cerulein		*****	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Cerulein+2-APB			*****	p>0.05	p>0.05
Cerulein+Dantrolen				*****	p>0.05
Cerulein+Verapamil					*****

**Şekil 4.8** Gruplar Arası Tripsinojen Seviyelerinin Karşılaştırılması

* Kontrolü ile Karşılaştırıldığında p<0.05

#Cerulein ile Karşılaştırıldığında p<0.05

Tablo 4.20, 4.21, 4.22 ve şekil 4.8’te gösterildiği üzere kontrol ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda tripsinojen düzeylerinin azaldığını ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Cerulein grubu ile karşılaştırıldığında ise Tripsinojen düzeylerinin, 2-APB, Verapamil ve Dantrolen gruplarında azaldığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Akut Pankreatit, çevre dokuları ve uzak organları değişik düzeylerde etkileyebilen pankreasın akut inflamatuvar bir hastalığıdır (46). Hastalığın, hafif bir şekli olan ödematöz pankreatitten şiddetli bir formu olan nekrotizan pankreatite kadar değişen farklı patolojik şekilleri bulunmakla birlikte patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamadığından morbidite ve mortalitesi yüksektir (145). Hastalığa neden olduğu düşünülen birçok etyolojik faktör bulunmaktadır, ancak öne çıkan faktörlerden ikisi, safra taşları ve alkolizmdir. Özellikle son yirmi yılda akut pankreatitle ilişkili çok yoğun çalışmalar yapılmış olmasına rağmen hastalığa neden olduğu ileri sürülen faktörlerin hangi mekanizmalar aracılığı ile hastalığın etyopatogenezinde rol aldıkları henüz tamamıyla anlaşılamamıştır.

Şu ana kadar elde edilen tüm bulgular dikkate alındığında, hastalığın gelişiminde rol oynayan ana etkenin pankreatik proteazların erken aktivasyonu olduğu söylenebilir. Nitekim, Chiari ve arkadaşları, akut pankreatit patogenezinde, pankreatik proteazların erken aktivasyonu sonucu oluşan pankreasın kendini sindirmesinin yer aldığını rapor etmişlerdir (15). Bu yaklaşıma göre, pankreas asiner hücrelerinde, tripsinojenin tripsine erken aktivasyonunun, asiner hücre hasarının gelişiminde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (146). Normal şartlarda, bağırsaklarda, enteropeptidaz tarafından TAP'ın tripsinojen yapısından ayrılması ile tripsinojen aktifleşmekte olup tripsine dönüşmektedir. Oluşan aktif tripsin hem diğer proteazların aktivasyonuna neden olmakta hem de TAP'ın tripsinojenden ayrılmasını hızlandırarak ortamdaki aktif tripsin konsantrasyonunu artırmaktadır. Sonuç olarak pankreasta tripsinojen'in erken aktivasyonu gerçekleşmekte ve asiner hücre hasarının meydana geldiği düşünülmektedir. Burada aydınlatılması gereken nokta tripsinojenin erken aktivasyonundan sorumlu olan tetikleyici faktörün ne olduğudur. Literatürde bu konuda öne sürülmüş olan olası mekanizmalar arasında iki tanesi büyük ölçüde kabul görmüştür. Bu mekanizmalardan ilkinde tripsinojenin otoaktivasyon yoluyla, diğerinde ise tripsinojenin katepsin B aracılığı ile aktive olduğu ileri sürülmektedir (147).

Bilindiği üzere kalsiyum pek çok hücrel fonksiyonun regülasyonunda hem intrasellüler hem de ekstrasellüler mesajcı olarak görev almaktadır. Ayrıca kalsiyum, proteazların da aralarında olduğu çok sayıda enzimin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Asiner hücrelerde zimojenlerin intrasellüler aktivasyonu ve proteaz enzimlerin erken sekresyonundan sorumlu olduğu düşünülen etkenler arasında yüksek intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun da bulunduğu düşünülmektedir. Asiner hücrelerde yüksek kalsiyum konsantrasyonu nedeniyle bozulan kalsiyumla ilişkili sinyalizasyon mekanizmaları sitoplazmik vakuolizasyonla ve erken tripsinojen aktivasyonu ile bağlantılı olduğundan pankreatit gelişiminde rol oynayan tetikleyici etkenler arasında sayılmaktadır. Ancak, normalde sitozole kalsiyum sağlayacak olan, kalsiyumun intrasellüler kaynakları açık değildir (26, 148). Burada aydınlatılması gereken nokta, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun artmasına neden olan, kalsiyum kanallarının hangi mekanizma ile aktif hale geldiğidir. Çünkü, intrasellüler Ca^{+2} sinyallerinin oluşumu, plazma membranı (Ca^{+2} girişi) veya ER membranında (Ca^{+2} salımı) Ca^{+2} 'un elektrokimyasal gradiyentine bağlıdır. Membranda bulunan voltaj kapılı kalsiyum kanalları, yüksek derecede Ca^{+2} 'a seçici olmakla birlikte ancak membran depolarizasyonu ile aktive olmakta ve sitozole Ca^{+2} girişini sağlamaktadır (94). Pankreatik asiner hücrelerde, endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} 'un salımına aracılık eden iki farklı Ca^{+2} kanalı vardır. Bunlar; İnözitol trifosfat reseptör kanalı (IP_3R) (149) ve Ryanodin reseptör kanalıdır (RyR) (150).

Daha önce de değinildiği üzere, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun, asiner hücrelerde salgının uyarılmasında anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bağlamda, normal $[Ca^{+2}]_i$ sinyalinin bozulmasının, normal sinyal iletim yolağını ve zimojenlerin salımını etkilemesi kaçınılmazdır. Zhou ve arkadaşları, akut pankreatitin erken döneminde, Ca^{+2} sinyalinin bozulduğunu bildirmişlerdir (151). Literatürde anormal $[Ca^{+2}]_i$ sinyallerinin akut pankreatitte gözlenen morfolojik değişikliklere ve intrasellüler enzim aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (152). Sindirim enzimlerinin erken aktivasyonu, akut pankreatit oluşumundaki çok erken olaylardan biridir. Tripsin'in erken aktivasyonu asidik bir pH'ya ihtiyaç duymakta ve zimojen granüllerde anormal $[Ca^{+2}]_i$ artışı pH'nın azalmasına neden olarak tripsin'in erken aktivasyonunu hızlandırmaktadır (56).

Kalsiyum iyon konsantrasyonunda uzayan artış, sadece pankreatik asiner hücreler için değil birçok hücre tipi için toksik etkilidir. Bu artış, oksidatif strese, mitokondriyal disfonksiyona, katabolik enzimlerin yıkımına ve sonuçta hücre iskeletinin bozulmasına sebep olmaktadır. Akut pankreatitte gözlenen asiner hücre iskeleti hasarının sorumlularından bir tanesi yüksek kalsiyum konsantrasyonudur (24, 26, 30).

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış üç temel yol üzerinden gerçekleşebilir; hücre membranından Ca^{+2} girişi, hücreden Ca^{+2} çıkışının azalması ve organellerden Ca^{+2} salımıdır (117). Ancak, akut pankreatitte, anormal $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artışına sebep olan mekanizmalar hala çok açık değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kalsiyum sinyalizasyon yolları üzerine yoğunlaşmaktadır. Bazı çalışmalarda, deney hayvanlarında Verapamil ve Diltiazem gibi kalsiyum kanal blokörlerinin kullanımı cerulein hiperstimülasyonu (153), kolin eksik-etiyoninden zengin diet (154) ve pankreatik kanala taurokolat infüzyonu (155) ile oluşturulan deneysel pankreatiti iyileştirdiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, intrasellüler kalsiyum şelasyonunun, proteazların erken aktivasyonunu, iskelet yıkımını ve tüm bu toksinler tarafından indüklenen asiner hücre nekrozunu önlediği gösterilmiştir (117).

Şu ana kadar pankreatit için uygulanan ve başarılı olmuş özel farmakolojik bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Enzim inhibitörlerinin pankreatit üzerine koruyuculuğu az olmakla birlikte henüz tedavi değeri bulunmamaktadır (156). Yeni yaklaşımlar, pankreatik asiner hücrelerindeki kalsiyum transportu üzerine yoğunlaşmaktadır. Çünkü, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu hücre için önemli olup, hücre membranından Ca^{+2} girişinin inhibisyonu, hücreden Ca^{+2} çıkışının artırılması ya da ER'dan Ca^{+2} salımının inhibisyonu, etkili birer hedef olarak düşünülmektedir. Bundan dolayı, plazma membran Ca^{+2} - giriş kanalı, Ca^{+2} -salım reseptörleri, vakuoler ATPaz, granüler iyon değişim kanalları, esterazlar, fosfoinositid-3 kinaz, protein kinaz C, endotelin ve nitrik oksit üretimi potansiyel terapötik hedefler haline gelmiştir (117).

Bu çalışmada ana hedef, akut pankreatitte artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu kalsiyum kanal blokörleri kullanarak sınırlandırmak ve bu

uygulamanın olası terapötik etkinliğini değerlendirmektir. Bu amaçla, ratlarda bir kolesistokininin analogu olan Cerulein ile indüklenen akut pankreatitte, membranda bulunan L-tipi kalsiyum kanalı için Verapamil, IP₃R kanalı için 2-Aminoetoksi difenil borat ve ryanodin reseptör kanalı için Dantrolen kullanılmıştır.

Çalışmada, ortalama 250-300 g ağırlığında, 3-4 aylık, dişi Wistar albino rat, her grupta 12 adet olmak üzere kontrol grubu, Cerulein grubu, Cerulein ve 2- APB grubu, Cerulein ve Dantrolen grubu, Cerulein ve Verapamil grubu şeklinde gruplandırılmıştır. Deney hayvanlarının pankreas dokusunda pankreatit oluşumu ve şiddetinin belirlenmesi açısından histopatolojik çalışmalar, serum amilaz ve lipaz, zimojen aktivasyon belirteci olan TAP, tripsinojen, tripsin, tripsin inhibisyonundan sorumlu olan PSTI ve tripsinojen aktivasyonuna neden olduğu düşünülen bir lizozomal hidrolaz olan katepsin B tayini yapılmıştır.

Deneysel akut pankreatit oluşumunda cerulein kullanımı standart bir yöntemdir. Cerulein, hızlı bir şekilde, belirgin interstisyel ödem, lökosit infiltrasyonu, hiperamilazemi, asiner hücre morfolojisi ve salgı sürecinin bozulması ile karakterize olan akut ödematöz pankreatite yol açmaktadır (157). Elde ettiğimiz histolojik bulgular, ratlarda, cerulein tarafından ödematöz pankreatitin indüklendiğini göstermektedir (Şekil 4.1.b). Cerulein verilen akut pankreatit grubunda, ekzokrin komponent içerisinde nötrofiler lökosit infiltrasyonu, intersisyumda belirgin ödem ve parenkimde yer yer vakuoller mevcut olmakla birlikte epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler gözlenmektedir. Kullanmış olduğumuz kalsiyum kanal blokörleri, ödem, lökosit infiltrasyon, asiner vakuolizasyon ve nekroz derecesini değişen oranlarda azaltmakla birlikte total pankreatik hasarı da iyileştirmiştir.

Akut Pankreatit tanısında asiner hücrelerden salınan amilaz ve lipaz enzimlerinin serumdaki konsantrasyonları en çok kullanılan biyokimyasal belirteçlerdir (158). Amilaz konsantrasyonları, genel olarak hastalığın başlangıcından birkaç saat sonra yükselmekte ve uygulanan tedaviye yanıt veren hastalarda üç veya beş gün içerisinde normal değerlerine geri dönmektedir (159). Serum lipazı ise, serum amilazı ile karşılaştırıldığında enzim aktivitesi daha uzun süre yükselmiş

olarak kalmakta, (160) hastalığın başlangıcından 4-8 saat sonra yükselmeye başlayıp, 8-14 gün içinde normale dönmektedir. Çalışmamızda, Cerulein ile deneysel akut pankreatit oluşturulan gruplarda, amilaz ve lipaz düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiş ($p<0.05$) ve kullanılan kalsiyum kanal blokörlerinin her üçü de bu yükselmeyi anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir ($p<0.05$).

Akut pankreatitte, nedeni tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, kaskatı harekete geçiren ilk domino taşının asiner hücrelerde gerçekleşen erken tripsinojen aktivasyonu olduğu günümüzde büyük ölçüde kabul görmektedir. Tripsinojen aktive olmadan önce, TAP ile bağlı haldedir ve herhangi bir tetikleyici etken nedeniyle aktif hale geçen tripsinojenden TAP ayrılmakta ve tripsinojen-tripsin dönüşümü gerçekleşmiş olmaktadır. Bu bağlamda, tripsinojen aktivasyonu ile ortamda bulunan TAP ile bağlı tripsinojen düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olması beklenmektedir. Şöyle ki; aktif hale geçen her tripsinojen, bünyesindeki TAP'dan ayrılarak tripsine dönüşmekte, bu arada ortamda tripsin aktivitesi ve TAP düzeyi artarken aktive olmamış tripsinojen konsantrasyonu bu dönüşüme bağlı olarak azalmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz tripsinojen düzeylerine bakıldığında, cerulein indüksiyonu sonucu anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Bu azalma, tripsinojen aktivasyonunun artarak tripsinojen-tripsin dönüşümünün gerçekleştiğine işaret etmektedir. Nitekim tripsin ve TAP aktivitelerindeki artış bu sonuçla paralellik göstermektedir. Halang W ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, birer saat aralıklarla yedi defa 50 µg/kg v.a dozda cerulein indüksiyonu ile oluşturdukları akut pankreatitte pankreatik tripsinojen aktivasyonunun arttığı bildirilmiştir (161). Bilier pankreatit oluşturulan bir başka çalışmada ise deney grupları arasında benzer pankreatik tripsinojen düzeyleri bulunduğu gösterilmiştir (162). Mithöfer K ve arkadaşları tarafından supramaksimal cerulein indüksiyonu ile oluşturdukları akut pankreatitte, zimojen, lizozom ve mikrozom fraksiyonlarında tripsinojen düzeylerinin azaldığı, postmikrozomal fraksiyonda ise arttığı bildirilmiştir (22).

Sonuçlarımıza bakıldığında, kalsiyum kanal blokörleri uyguladığımız deney gruplarında cerulein grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan değişimler

gözlenmiştir. Bu bulgular, çalışmamızda kullanmış olduğumuz kanal blokerleri uygulanmasının tripsinojen aktivasyonundaki artış üzerine bir etkisi olmadığını göstermektedir. Raraty M. ve ark. asiner hücrelerde proteaz ihtiva eden zimojen granülleri içerisindeki total kalsiyum konsantrasyonunun 15 mM iken, serbest kalsiyum düzeylerinin 50 μ M civarında olduğunu rapor etmişlerdir (24). Sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun 10^{-7} M olduğu dikkate alındığında, granül içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun sitozolik kalsiyum konsantrasyonundaki küçük değişikliklerden önemli oranda etkilenmeyeceği söylenebilir. Burada belirleyici olan sitozolik kalsiyum konsantrasyonundaki değişimlerin granül içi kalsiyum konsantrasyonu üzerine olası etkisinden çok, granül içerisinde total ve serbest kalsiyum konsantrasyonları arasındaki dinamik dengedir. Granül içerisinde total ve serbest kalsiyum konsantrasyonları arasındaki dengenin hangi dinamikler üzerinden sürdürüldüğü konusunda açıklayıcı net bir bilgiye sahip değiliz. Ancak, granül içi serbest kalsiyum konsantrasyonlarındaki azalmanın granüllerin lizisini stimüle ettiği bilinmektedir (69). Granül içi serbest kalsiyum konsantrasyonundaki azalmanın granül içi bağlı kalsiyum ile serbest kalsiyum arasındaki etkileşim üzerinden gerçekleşmesi olasılığı oldukça yüksektir. Bu durum, kullanmış olduğumuz kanal blokörlerinin zimojen granüllerinin lizisi ve kaskatın ilk basamağı olan tripsinojen aktivasyonu üzerinde etkili olmamasını açıklamaktadır. Ancak, granül içi kalsiyum homeostazını etkileyen faktörler ile ilgili detaylı moleküler çalışmalara gereksinim vardır. Biz, çalışmada kullanmış olduğumuz kalsiyum kanal blokörlerinin akut pankreatit gelişiminden sorumlu olan kaskatın, granüllerin lizisinden sonraki basamaklarında etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Lu Z ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, cerulein hiperstimülasyonu sonucu, TAP oluşumu ve tripsin aktivitesinin arttığı gösterilmektedir. Cerulein, tripsin aktivitesini zamana bağlı bir şekilde indüklemektedir. Tripsin aktivitesi, 15 dakikada bazal seviyenin üstüne çıkmakta, 30 dakikada pik yapmakta ve sonraki 60 dakikada %25'i azalmaktadır (163). Çalışmamızda, kontrole göre cerulein ile indüklenen grupta, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da tripsin düzeylerinin belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. 2-APB ve Verapamil verilen gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan tripsin düzeyleri dikkati çekmektedir

($p<0.05$). İki defa cerulein enjeksiyonu yaptığımız çalışmada, son enjeksiyondan 12 saat sonra dokuların çıkarılarak tripsin düzeyinin ölçülmesi, zamanla azalan tripsin aktivitesini desteklemektedir. Ancak pankreatite ait bulguların belirgin bir şekilde gözlenebilmesi ve hücresel düzeyde gerçekleşmesi beklenen değişikliklerin belirlenebilir bir düzeye ulaşması açısından bu sürenin geçmesi gerekliydi. Tripsin aktivitesi, hiperstimülasyondan sonra, bir pik yapmakta ve sonra azalmaktadır. Tripsin aktivitesindeki bu azalma ise, muhtemelen PSTI tarafından inhibisyonundan ve tripsin yıkımından dolayı olmaktadır. PSTI, pankreatik tripsin inhibitörü olup, erken tripsinojen aktivasyonunda ilk savunma olarak aktivite göstermektedir (164, 165). PSTI/tripsin oranı sabit bir şekilde kalmaktadır, çünkü stimülasyondan sonra tripsinojen ve PSTI konsantrasyonları birbirine paralel olmaktadır (164). Aşırı tripsinojen aktivasyonunda, PSTI'nün inhibitör kapasitesi aşılmakta ve tripsin aktivitesi artmaktadır (21, 166). Literatürde, PSTI'nün, tripsinojen aktivasyonunu engellemekten çok tripsin aktivasyonunu inhibe ederek pankreatiti önlediği belirtilmektedir. Nathan JD ve arkadaşları, PSTI eksprese edilen transgenik farelerde, pankreatit şiddetinin ve tripsin aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir (167). Çalışma bulgularımızda, cerulein stimülasyonu ile PSTI düzeylerinde anlamlı bir azalma ($p<0.05$) gözlenmekle birlikte kalsiyum kanal blokörlerinden, 2-APB ve Verapamil, PSTI düzeylerini cerulein grubuna göre azaltmış, ancak Dantrolen verilen grupta PSTI düzeyinin cerulein grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Tripsinojenin N-terminal ucunda bulunan bir oktapeptit olan TAP, normalde dudenumda enterokinaz tarafından, tripsinojen yapısından ayrılarak inaktif tripsinojenden tripsini oluşturmakta, aktif tripsin ise diğer protezların aktivasyonuna neden olmaktadır. Deneysel çalışmalarda, akut pankreatit oluşumunda ilk basamağın, pankreasta tripsinojenin erken aktivasyonu olduğunu, bunun sonucunda periton, serum ve idrara TAP'ın salındığı gösterilmiştir (19, 21). Literatürde, cerulein ile indüklenen akut pankreatitte, erken tripsinojen aktivasyonunun belirteci olarak artan TAP düzeylerinin ölçüldüğü bildirilmektedir (168). Çalışma bulgularımız da Cerulein indüksiyonu sonucu oluşan TAP'ın artışı açısından paralellik göstermektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında cerulein grubunda TAP düzeyi artmıştır, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Cerulein grubunda artan

TAP düzeyleri, verilen tüm kalsiyum kanal blokörleri tarafından önemli ölçüde azaltılmıştır ($p<0.05$). 2-APB ve Verapamil gruplarındaki TAP düzeylerinin Dantrolen grubundakinden daha az olduğu görülmüştür. Kalsiyum kanal blokörü verilen gruplar arasında en fazla azalma Verapamil verilen grupta olmuştur. Akut pankreatit sürecinde, TAP'in kendisi patogeneizde bir rol oynamamakta, ancak tripsinojen aktivasyon derecesini kesin bir şekilde yansıtmaktadır (169). TAP, dolaşımda kısa bir yarı ömre sahip olması ve idrar ile atılmasından dolayı, erken dönemde hastalık şiddetinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir (75).

“Kolokalizasyon hipotezi” olarak adlandırılan hipotezde, pankreatitin erken döneminde, bir lizozomal sistein proteaz olan Katepsin B'nin, asiner vakuoller içinde tripsinojenin aktivasyonuna neden olarak, intrapankreatik tripsin aktivasyonuna yol açtığı ileri sürülmektedir (82). Katepsin B geni eksik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, bu genin olmadığı farelerde tripsin aktivitesinde, serum amilaz ve lipaz düzeylerinde bir azalma olduğu gösterilmiştir (161). Literatürde, in vitro çalışmalarda kullanılan katepsin B inhibitörlerinin tripsinojen aktivasyonunu azalttığını ve asiner hücrelerde tripsinojen aktivasyonunun katepsin B aracılığıyla olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (170, 171). Çalışmamızda, Cerulein ile indüklenen akut pankreatit grubunda anlamlı olmasa da katepsin B düzeylerinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Kalsiyum kanal blokörleri, katepsin B aktivitesini azaltmıştır, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Histopatolojik bulgularımız, cerulein verilen gruplarda akut ödematöz pankreatit bulgularına benzer şekilde pankreatik hasar oluştuğunu, kalsiyum kanal blokörleri olan Verapamil, Dantrolen ve 2-APB'nin oluşan pankreas hasarını azaltıcı yönde etki ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda, kalsiyum kanal blokörleri, pankreatit belirtilerinden olan yüksek amilaz, lipaz ve erken zimojen aktivasyon belirteci olan TAP düzeylerini önemli miktarda, tripsin, tripsinojen ve katepsin B düzeylerini ise hafif olarak azaltmıştır. Literatürde benzer çalışmalardaki bulgular bizim elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir (152, 153, 172). Pankreasın normal fizyolojik fonksiyonları için önemli bir role sahip olan $[Ca^{+2}]_i$ 'nin, akut pankreatit oluşumunda da önemli olabileceğini ve kalsiyum homeostazisinde yer alan

yolakların inhibisyonlarının moleküler düzeyde araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. TAP ve PSTI peptidleri aminoasit sayıları dikkate alındığında tripsin ya da kaskatta yer alan diğer proteazlara kıyasla oldukça küçük yapıli oligopeptidlerdir. Bu tür yapıların pankreatit gelişim sürecinde oluşan inflamasyon nedeniyle artan oksidatif stres sonucu oksidatif hasara uğraması kaçınılmazdır (134, 173). Oluşan oksidatif stresin bu yapılar üzerinde oluşturabileceği yapısal hasarlar sonucu meydana gelebilecek konformasyonel değişimler bu moleküllerin miktar bakımından değil ancak fonksiyonel kapasite açısından kayba uğraması ile sonuçlanabilir. Deneysel olarak pankreatit oluşturulan pankreas dokularından TAP ve PSTI oligopeptidlerinin saflaştırılarak yapısal ve fonksiyonel açıdan incelenmesi ve bu yapıların sentezlerinin gen düzeyinde bir değişime uğrayıp uğramadığının mRNA ölçümü ile belirlenmesi bu çalışmanın bundan sonraki adımlarını oluşturacaktır.

Sonuç olarak, çalışmada elde ettiğimiz bulgular, cerulein ile indüklenen akut pankreatit üzerine, kalsiyum kanal blokörlerinin iyileştirici bir etkisinin olabileceği yönündedir. Ancak, akut pankreatitte anormal $[Ca^{+2}]_i$ artışının patofizyolojik mekanizmasının anlaşılabilmesi ve $[Ca^{+2}]_i$ artışı ile tetikleyici faktörler arasındaki doğrudan bağlantının ortaya konabilmesi açısından daha ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pankreasın akut inflamasyonu sonucu gelişen akut pankreatite neden olan birçok etiyolojik faktör mevcut olmasına rağmen bu faktörlerin fizyopatolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Pankreatik zimojenlerin asiner hücrelerde erken aktive olması sonucu asiner hücre hasarı ve akut pankreatit olduğu düşünülmektedir. Pankreatik zimojenlerin intrasellüler aktivasyonunda öne sürülen en önemli mekanizmalar tripsinojenin otoaktivasyonu ve lizozomal hidrolaz olan Cathepsin B ile tripsinojen aktivasyonudur. Tripsinojenin otoaktivasyonu, asidik bir pH'ya ihtiyaç duymakta ve Ca^{+2} varlığında artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tripsinojen aktivasyonunda Ca^{+2} 'un önemli bir rolünün olduğu bildirilmektedir. Pankreasın normal enzim sekresyonu ve intrasellüler zimojen aktivasyonunun her ikisi de asiner hücrede artan sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonuna gereksinim duymaktadır, fakat artan Ca^{+2} 'un intrasellüler kaynağı açık değildir. Pankreatik asiner hücreleri için toksik düzeye ulaşan kalsiyum iyon konsantrasyonu, intrasellüler zimojen aktivasyonunu, vakuolizasyonu ve hücre iskeleti hasarını başlatmaktadır.

Akut pankreatiti oluşturan mekanizmaların tam anlaşılamamış olmasından ve spesifik bir tedavisinin olmamasından dolayı araştırmacılara bir çok ajanı deneme fırsatı vermiştir. Bu çalışmada, bir kolesistokinin analogu olan Cerulein ile indüklenen akut pankreatitte proteaz inaktivasyonu ve hastalığın şiddetini azaltıcı etkilere sahip olabileceği düşünülen, membranda bulunan L-tipi kalsiyum kanalı için Verapamil, ER'de bulunan IP_3R kanalı için 2-Aminoetoksi difenil borat ve ryanodin reseptör kanalı için Dantrolen gibi Ca^{+2} kanal blokörlerinin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Deney hayvanlarının pankreas dokusunda pankreatit oluşumu ve şiddetinin belirlenmesi açısından histopatolojik çalışmalar, serum amilaz ve lipaz ölçümleri, zimojen aktivasyon belirteci olan TAP ölçümü, tripsinojen ve tripsin tayini, tripsin inhibisyonundan sorumlu olan PSTI ve tripsinojen aktivasyonuna neden olduğu düşünülen bir lizozomal hidrolaz olan katepsin B tayini yapılmıştır.

Histopatolojik alışmalar, cerulein verilen gruplarda akut ödematöz pankreatit bulgularına benzer şekilde pankreatik hasar oluştuğunu göstermiş olmakla birlikte kalsiyum kanal blokörleri oluşan bu pankreas hasarını azaltıcı yönde etkilemiştir. Serum amilaz ve lipaz düzeylerinin yanısıra tripsin ve tripsinojen aktivasyonunun bir belirteci olan TAP düzeyleri de cerulein grubunda bir artışa sahip olup, artan bu enzim düzeylerinin, kalsiyum kanal blokörleri tarafından azaltılmış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, bulgularımızda, gruplar arasında Katepsin B düzeyleri açısından önemli bir değişiklik bulunamazken, PSTI ve tripsinojen düzeylerinde bir azalma gözlenmiştir.

Sonuçlarımız, cerulein ile indüklenen akut pankreatit üzerine, kalsiyum kanal blokörlerinin iyileştirici bir etkisinin olabileceği yönündedir. Ancak, artan $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinin kaynağının anlaşılabilmesi ve başlatıcı faktörler ile $[Ca^{+2}]_i$ artışı arasındaki doğrudan bağlantının bulunabilmesi için moleküler düzeyde ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Frossard, J.L., Steer, M.L., Pastor, C.M. (2008). Acute Pancreatitis. *The Lancet*, 371, 143-52.
2. Schäfer, C., Tietz, A.B., Göke, B. (2005). Pathophysiology of Acute Experimental Pancreatitis: Lessons from Genetically Engineered Animal Models and New Molecular Approaches. *Digestion*, 71, 162-172.
3. Karne, S., Gorelick, F.S. (1999). Etiopathogenesis of Acute Pancreatitis. *Surgical Clinics of North America*, 79, 699-710.
4. Piolot, A., Nadler, F., Cavallero, E., Coquard, J.L., Jacotot, B. (1996). Prevention of Recurrent Acute Pancreatitis in Patients with Severe Hypertriglyceridemia: Value of Regular Plasmapheresis. *Pancreas*, 13 (1), 96-99.
5. Khoo, T.K., Vege, S.S., Abu-Lebdeh, H.S., Ryu, E., Nadeem, S., Wermers, R.A. (2009). Acute Pancreatitis in Primary Hyperparathyroidism: A Population-Based Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (6), 2115-2118.
6. Warshaw, A.L., Richter, J.M., schapiro, R.H. (1983). The Cause and Treatment of Pancreatitis Associated with Pancreas Divisum. *Ann Surg*, 198 (4), 443-450.
7. Nitsche, C.J., Jamieson, N., Lerch, M.M., Mayerle, J.V. (2010). Drug Induced Pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenteology*, 24, 143-155.
8. Joske, R.A. (1955). Aetiological Factors in The Pancreatitis Syndrome. *British Medical Journal*, Dec 17, 1477-1481.
9. Wysocki, A.P., Carter, C.R. (2007). Acute Pancreatitis. *Surgery*, 25 (2), 49-56.
10. Bhatia, M., Wong, F.L., Cao, Y., Lao, H.Y., Huang, J., Puneet, P., Chevali, L. (2005). Pathophysiology of Acute Pancreatitis. *Pancreatology*, 5, 132-144.
11. Schmid, R.M. (2005). Pathophysiology of Acute Pancreatitis. *Digestion*, 71, 159-161.
12. Franco-Pons, N., Gea-Sorlí, S., Closa, D. (2010). Release Of İnflammatory Mediators By Adipose Tissue During Acute Pancreatitis. *J Pathol*, 221, 175-182.

13. Wang, G.J., Gao, C.F., Wei, D., Wang, C., Ding, S.Q. (2009). Acute Pancreatitis: Etiology and Common Pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 15 (12), 1427-1430.
14. Leach, S.D., Gorelick, F.S., Modlin, I.M. (1990). Acute Pancreatitis at Its Centenary. The Contribution of Reginald Fitz. *Ann Surg*, 212 (1), 109-113.
15. Tonsi, A.F., Bacchion, M., Crippa, S., Malleo, G., Bassi, C. (2009). Acute Pancreatitis at the Beginning of the 21st century: The State of the Art. *World J Gastroenterol*, 15 (24), 2945-2959.
16. Norman, J. (1998). The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis. *Am J Surg*, 175, 76-83.
17. Leung, P.S., Ip, S.P. (2006). Pancreatic Acinar Cell: Its Role in Acute Pancreatitis. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*, 38, 1024-1030.
18. Gorelick, F.S., Otani, T. (1999). Mechanisms of Intracellular Zymogen Activation. *Baillière's Clinical Gastroenterology*, 13(2), 227-240.
19. Hofbauer, B., Saluja, A.K., Lerch, M.M., Bhagat, L., Bhatia, M., Lee, H.S., Frossard, J.L., Adler, G., Steer, M.L. (1998). Intra-Acinar Cell Activation of Trypsinogen During Caerulein-Induced Pancreatitis in Rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 275, 352-362.
20. Mitchell, R.M.S., Byrne, M.F., Baillie, J. (2003). Pancreatitis. *The Lancet*, 361, 1447-1455.
21. Frossard, J.L. (2001). Trypsin Activation Peptide (TAP) in Acute Pancreatitis: From Pathophysiology to Clinical Usefulness. *J Pancreas (Online)*, 2(2), 69-77.
22. Mithöfer, K., Castillo, C.F., Rattner, D., Warshaw, A.L. (1998). Subcellular Kinetics of Early Trypsinogen Activation in Acute Rodent Pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 274, G71-G79.
23. Figarella, C., Miszczuk-Jamska, B., Barrett, A.J. (1988). Possible Lysosomal Activation of Pancreatic Zymogens. Activation of Both Human Trypsinogens by Cathepsin B and Spontaneous Acid Activation of Human Trypsinogen 1. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 369, 293-298.

24. Raraty, M., Ward, J., Erdemli, G., Vaillant, C., Neoptolemos, J.P., Sutton, R., Petersen, O.H. (2000). Calcium-Dependent Enzyme Activation and Vacuole Formation in the Apical Granular Region of Pancreatic Acinar Cells. *PNAS*, 97(24), 13126–13131.
25. Husain, S.Z., Prasad, P., Grant, W.M., Kolodecik, T.R., Nathanson, M.H., Gorelick, F.S. (2005). The Ryanodine Receptor Mediates Early Zymogen Activation in Pancreatitis. *PNAS*, 102(40), 14386-14391.
26. Krüger, B., Albrecht, E., Lerch, M.M. (2000). The Role of Intracellular Calcium Signaling in Premature Protease Activation and the Onset of Pancreatitis. *American Journal of Pathology*, 157(1), 43-50.
27. Tsien, R.W., Tsien, R.Y. (1990). Calcium Channels, Stores, and Oscillations. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 715-60.
28. Fill, M., Copello, J.A. (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol Rev*, 82, 893-922.
29. Rosenzweig, S.A., Miller, L.J., Jamieson, J.D. (1983). Identification and localization of cholecystokinin-binding sites on rat pancreatic plasma membranes and acinar cells: a biochemical and autoradiographic study. *The Journal of Cell Biology*, 96, 1288-1297.
30. Raraty, M.G.T, Murphy, J.A., McLoughlin, E., Smith, D., Criddle, D., Sutton, R. (2005). Mechanisms of Acinar Cell Injury in Acute Pancreatitis. *Scandinavian Journal of Surgery*, 94, 89-96.
31. Berridge, M.J. (1984). Inositol Trisphosphate and Diacylglycerol as Second Messengers. *Biochem J*, 220, 345-360.
32. Pannala, R., Kidd, M., Modlin, I.M. (2009). Acute Pancreatitis: A Historical Perspective. *Pancreas*, 38(4), 355-366.
33. Tando, Y., Yanagimachi, M., Matsushashi, Y., Nakamura, T., Kamisawa, T. (2010). A Brief Outline of the History of the Pancreatic Anatomy. *Dig Surg*, 27, 84–86.
34. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* (R. Demir, Çev). Ankara: Palme yayınevi. (2006).
35. Vander, A., Sherman, J., Luciano, D. (2001). *Human Physiology*. Singapore: McGraw-Hill International Edition.

36. Borley, N.R. (2005). Chapter 87: Pancreas, Spleen and Suprenal Gland. J.C. Healy (Ed.), S. Strandring (Ed. in chief). *Gray's Anatomy* (s.1231-1245). London: Elsevier Churchill Livingstone.
37. Zeren, Z. (1970). *Sistematik İnsan Anatomisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
38. www.bartleby.com Great Books Online: Gray's Anatomy of the Human Body
Erişim Tarihi: 20/11/2010
39. Panksy, B. (1996). *Review of Gross Anatomy*. USA: McGraw-Hill.
40. McHenry, C.R., Strain, J.W. (1997). Anatomy and Embryology of the Pancreas. O.H. Clark, Q.Y. Duh (Eds.). *Textbook of Endocrine Surgery* (s.549-556). Philadelphia: Saunders Press.
41. Bardeesy, N., De Pinho, R.A. Pancreatic Cancer Biology and Genetics. *Nature Reviews Cancer*, 2, 897-909.
42. Guyton, A.C., Hall, J.E. (2000). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Saunders Company.
43. Berne, R.M., Levy, M.N., Koepfen, B.M., Stanton, B.A. (2008). Fizyoloji (türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Çev.Ed.). İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi.
44. Ahren, B., Karlsson, S. (1997). Pancreatic Endocrine Physiology. O.H. Clark, Q.Y. Duh (Ed.). *Textbook of Endocrine Surgery* (s.562-577). Philadelphia: Saunders Press.
45. Bassi, C., Butturini, G. (2007). Definition and classification of pancreatitis. L.H. Blumgart (Ed.). *Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas* (685-691). Philadelphia: Saunders Press.
46. Bradley, E.L. (1993). A Clinically Based Classification System for Acute Pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 Through 13, 1992. *Arch Surg*, 128, 586-590.
47. Steer, M.L. (1989). Classification and Pathogenesis of Pancreatitis. *Surgical Clinics of North America*, 69(3), 467-480.
48. Whitcomb, D.C. (2010). Genetic Aspects of Pancreatitis. *Annu Rev Med*, 61, 413-424.
49. Imrie, C.W., McKay, C.J. (2007). Etiology, Pathogenesis, and Diagnostic Assesment of Acute Pancreatitis. L.H. Blumgart (Ed.). *Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas* (s.691-700). Philadelphia: Saunders Press.

50. Spanier, B.W.M., Dijkgraaf, M.G.W., Bruno, M.J. (2008). Epidemiology, Aetiology and Outcome of Acute and Chronic Pancreatitis: an Update. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 22(1), 45–63
51. Sargen, K., Kingsnorth, A.N. (2001). Management of Gallstone Pancreatitis: Effects of Deviation from Clinical Guidelines. *Journal of Pancreas*, 2(5), 317-322.
52. Van Erpecum, K.J. (2006). Complications Of Bile-Duct Stones: Acute Cholangitis and Pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 20(6), 1139-1152.
53. Gorelick, F.S. (2003). Alcohol and Zymogen Activation in the Pancreatic Acinar Cell. *Pancreas*, 27(4), 305-310.
54. Ding, Y.X., Yang, K., Chin, W.C. (2006). Ethanol Augments Elevated- $[Ca^{2+}]_c$ Induced Trypsin Activation in Pancreatic Acinar Zymogen Granules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350, 593-597.
55. Criddle, D.N., Raraty, M.G.T., Neoptolemos, J.P., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Sutton, R. (2004). Ethanol Toxicity in Pancreatic Acinar Cells: Mediation by Nonoxidative Fatty Acid Metabolites. *PNAS*, 101(29), 10738-10743.
56. Cappell, M.S. (2008). Acute Pancreatitis: Etiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Therapy. *Med Clin N Am*, 92, 889–923.
57. Cheng, C.L., Sherman, S., Watkins, J.L., Barnett, J., Freeman, M., Geenen, J., Ryan, M., Parker, H., Frakes, J.T., Fogel, E.L., Silverman, W.B., Dua, K.S., Aliperti, G., Yakshe, P., Uzer, M., Jones, W., Goff, J., Lazzell-Pannell, L., Rashdan, A., Temkit, M., Lehman, G.A. (2006). Risk Factors for Post-ERCP Pancreatitis: A Prospective Multicenter Study. *Am J Gastroenterol*, 101, 139–147.
58. Blair, A.J., Russell, C.G., Cotton, P.B. (1984). Resection for Pancreatitis Patients with Pancreas Divisum. *Ann Surg*, 200(5), 590-594.
59. Chacko, L.N., Chen, Y.K., Shah, R.J. (2008). Clinical Outcomes and Nonendoscopic Interventions after Minor Papilla Endotherapy in Patients with Symptomatic Pancreas Divisum. *Gastrointest Endosc*, 68, 667-73

60. Eltookhy, A., Pearson, N.L. (2006). Drug-Induced Pancreatitis. *CPJ/RPC*, 139(6), 58-60.
61. Schmid, S.W., Uhl, W., Friess, H., Malfertheiner, P., Büchler, M.W. (1999). The Role of Infection in Acute Pancreatitis. *Gut*, 45, 311-316.
62. Teich, N., Mössner, J. (2008). Hereditary Chronic Pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 22(1), 115-130.
63. Wilson, D.E., Hata, A., Kwong, L.K., Lingam, A., Shuhua, J., Ridinger, D.N., Yeager, C., Kaltenborn, K.C., Iverius, P.H., Lalouel, J.M. (1993). Mutations in Exon 3 of the Lipoprotein Lipase Gene segregating in a Family with Hypertriglyceridemia, Pancreatitis, and Non-Insulin-Dependent Diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 92, 203-211.
64. Toouli, J., Brooke-Smith, M., Bassi, C., Carr-Locke, D., Telford, J., Freeny, P., Imrie, C., Tandon, R. (2002). Guidelines for the Management of Acute Pancreatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17, 15-19.
65. Jakob, J.J., John, M., Thomas, N., Chacko, A., Cherian, R., Selvan, B., Nair, A., Seshadri, M.S. (2006). Does Hyperparathyroidism Cause Pancreatitis? A South Indian Experience and a Review of Published Work. *ANZ J Surg*, 76, 740-744.
66. Palade, G. (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science*, 189 (4200), 347-358.
67. Neurath, H., Walsh, K.A. (1976). Role of proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc Natl Acad Sci*, 73 (11), 3825-3832.
68. Leach, S.D., Modlin, I.M., Scheele, G.A., Gorelick, F.S. (1991). Intracellular Activation of Digestion Zymogens in Rat Pancreatic Acini. Stimulation by High Doses of Cholecystokinin. *The Journal of Clinical Investigation, Inc.*, 87, 362-366.
69. Lebel, D., Grondin, G., Paquette, J. (1988). In vitro Stability of Pancreatic Zymogen Granules: Roles of pH and Calcium. *Biology of the Cell*, 63, 343-353.
70. Witt, H., Luck, W., Hennies, H.C., Claßen, M., Kage, A., Laß, U., Landt, O., Becker, M. (2000). Mutations in the Gene Encoding the Serine Protease

- Inhibitor, Kazal Type 1 are Associated with Chronic Pancreatitis. *Nature Genetics*, 25, 213-216.
71. Sahin-Tóth, M. (2001). The Pathobiochemistry of Hereditary Pancreatitis: Studies on Recombinant Human Cationic Trypsinogen. *Pancreatology*, 1, 461-465.
 72. Halangk, W., Lerch, M.M. (2004). Early Events in Acute Pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am*, 33, 717-731.
 73. Bialek, R., Willemer, S., Arnold, R., Adler, G. (1991). Evidence of Intracellular Activation of Serine Proteases in Acute Cerulein-Induced Pancreatitis in Rats. *Scand J Gastroenterol*, 26, 190-196.
 74. Appelros, S., Thim, L., Borgström, A. (1998). Activation peptide of Carboxypeptidase B in Serum and Urine in Acute Pancreatitis. *Gut*, 42, 97-102.
 75. Gudgeon, A.M., Heath, D.I., Hurley, P., Jehanli, A., Patel, G., Wilson, C., Shenkin, A., Austen, B.M., Imrie, C.W., Hermon-Taylor, J. (1990). Trypsinogen Activation Peptides Assay in the Early Prediction of Severity of Acute Pancreatitis. *Lancet*, 335, 4-8.
 76. Cavallini, G., Tittobello, A., Frulloni, L., Masci, E., Mariani, A., Francesco, V. (1996). Gabexate for the Prevention of Pancreatic Damage Related to Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography. *N Engl J Med*, 335, 919-923.
 77. Lasson, A., Ohlsson, K. (1984). Protease Inhibitors in Acute Human Pancreatitis. Correlation Between Biochemical Changes and Clinical Course. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 19(6), 779-786
 78. Whitcomb, D.C., Gorry, M.C., Preston, R.A., Furey, W., Sossenheimer, M.J., Ulrich, C.D., Martin, S.P., Gates, L.K., Amann, S.T., Toskes, P.P., Liddle, R., McGrath, K., Uomo, G., Post, J.C., Ehrlich, G.D. (1996). Hereditary Pancreatitis is Caused by a Mutation in the Cationic Trypsinogen Gene. *Nature Genetics*, 14, 141-145.
 79. Naruse, S. (2003). Molecular Pathophysiology of Pancreatitis. *Internal Medicine*, 42(3), 288-289.

80. Mort, J.S., Buttle, D.J. (1997). Molecules in Focus. Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (5), 715-720.
81. Steer, M.L., Meldolesi, J., Figarella, C. (1984). Pancreatitis. The Role of Lysosomes. *Digestive Diseases and Science*, 29(10), 934-938.
82. Van Acker, G.J.D., Perides, G., Steer, M.L. (2006). Co-localization Hypothesis: A Mechanism for the Intrapancreatic Activation of Digestive Enzymes During the Early Phases of Acute Pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 12(13), 1985-1990.
83. Van Acker, G.J.D., Saluja, A.K., Bhagat, L., Singh, V.P., Song, A.M., Steer, M.L. (2002). Cathepsin B Inhibition Prevents Trypsinogen Activation and Reduces Pancreatitis Severity. *Am J Physiol Gastrointest Physiol*, 283, 794-800.
84. Nelson, D.J., Fozzard, H.A. (2000). Ion channels. P.M. Conn, A.R. Means (Eds.). *Principles of Molecular Regulation* (s.135-148). New Jersey: Humana Press.
85. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2006). *Hücre, Moleküler Yaklaşım* (M. Sakızlı, N. Atabey, Çev.Ed.). İzmir: İzmir Tıp Kitabevi.
86. Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 79(4), 1317-1372.
87. Lerche, H., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. (2001). Ion Channels and Epilepsy. *American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)* 106,146-159.
88. Graves T.D., Hanna, M.G. (2005). Neurological Channelopathies. *Postgrad Med J*, 81, 20–32.
89. www.nobelmedicus.com. Doç.Dr. Mehmet Ali Akalın. Bir İyon Kanalı Hastalığı: Periyodik Paralizi (Online Dergi). Erişim Tarihi: 13/11/2010
90. www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/ligand-gated-ion-channel.html Erişim Tarihi: 10/01/2010.
91. Bezanilla, F. (2005). Voltage-Gated Ion Channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 4(1), 34-48.
92. Bezanilla, F. (2000). The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiological Reviews*, 80(2), 555-589.

93. Yellen, G. (1998). The Moving Parts of Voltage-Gated Ion Channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 31(3), 239-295.
94. Stojilkovic, S.S., Tomic, M., Koshimizu, T., Van Goor, F. (2000). Calcium Ions As Intracellular Messengers. P.M. Conn, A.R. Means (Eds.). *Principles of Molecular Regulation* (s.149-185). New Jersey: Humana Press.
95. Yu, F.H., Catterall, W.A. (2004). The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. *Sci STKE*, 15, 1-17.
96. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57, 411-425.
97. Dolphin, A.C. (2003). G Protein Modulation of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacological Reviews*, 55, 607-627.
98. Catterall, W.A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. *Annu Rev Cell Biol*, 16, 521-555.
99. Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., Dascal, N. (1991). The Roles of the Subunits in the Function of the Calcium Channel. *Science*, 253, 1553-1557.
100. Dolphin, A. (1998). Mechanism of Modulation of Voltage-Dependent Calcium Channels by G Proteins. *Journal of Physiology*, 506(1), 3-11.
101. Catterall, W.A. (1996). Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels. Stanley G. Schultz (Ed.). *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders* (s.129-142). New-York: Plenum Press.
102. Chang, F.C., Hosey, M.M. (1988). Dihydropyridine and Phenylalkylamine Receptors Associated with Cardiac and Skeletal Muscle Calcium Channels are Structurally Different. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(35), 18929-18937.
103. Rane, S.G., Holz IV, G.G., Dunlap, K. (1987). Dihydropyridine Inhibition of Neuronal Calcium Current and Substance P Release. *Pflugers Arch*, 409(4-5), 361-366.

104. Janis R.A., Shrikhande, A.V., McCarthy, R.T., Howard, A.D., Greguski, R., Scriabine, A. (1988). Isolation and Characterization of a Fraction from Brain that Inhibits 1,4-[³H]dihydropyridine Binding and L-Type Calcium Channel Current. *FEBS Letters*, 239(2), 233-236.
105. Yue, D.T., Marban, E. (1990). Permeation in the Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channel. Multi-Ion Occupancy but No Anomalous Mole-Fraction Effect between Ba²⁺ and Ca²⁺. *J Gen Physiol*, 95, 911-939.
106. Perez-Reyes, E. (2003). Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-Type Calcium Channels. *Physiol Rev*, 83, 117-161.
107. Llinás, R., Sugimori, J.W., Cherksey, B. (1989). Blocking and Isolation of a Calcium Channel from Neurons in Mammals and Cephalopods Utilizing a Toxin Fraction (FTX) from Funnel-Web Spider Poison. *Proc Natl Acad Sci*, 86, 1689-1693.
108. Adams, M.E., Bindokas, V.P., Hasegawa, L., Venema, V.J. (1990). Ω -Agatoxins: Novel Calcium Channel Antagonists of Two Subtypes from Funnel Web Spider (*Agelenopsis aperta*) Venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(2), 861-867.
109. Taylor, C.W. (1998). Inositol Triphosphate Receptors: Ca²⁺-Modulated Intracellular Ca²⁺ Channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1436, 19-33.
110. Taylor, C.W. (2004). IP₃ Receptors: The Search for Structure. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 29(4), 210-219.
111. Supattapone, S., Worley, P.F., Baraban, J.M., Synder, S.H. (1988). Solubilization, Purification, and Characterization of an Inositol Triphosphate Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(3), 1530-1534.
112. Berridge, M.J. (1993). Inositol Triphosphate and Calcium Signalling. *Nature*, 361, 315-325.
113. Bosanac, I., Michikawa, T., Mikoshiba, K., Ikura, M. (2004). Structural Insights into the Regulatory Mechanism of IP₃ Receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1742, 89-102.
114. Taylor, C.W., Tovey, S.C. (2010). IP₃ Receptors: Toward Understanding Their Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, 1-22.

115. Nakai, J., Imagawa, T., Hakamata, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., Numa, S. (1990). Primary Structure and Functional Expression from cDNA of the Cardiac Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel. *FEBS*, 271(1,2), 169-177.
116. Zucci, R., Ronca-Testoni, S. (1997). The Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Channel/Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States. *Physiological Reviews*, 49(1), 1-51.
117. Petersen, O., Sutton, R. (2006). Ca^{2+} Signalling and Pancreatitis: Effects of Alcohol, Bile and Coffee. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 27(2), 113-120.
118. Kobayashi, S., Bannister, M.L., Gangopadhyay, J.P., Hamada, T., Parness, J., Ikemoto, N. (2005). Dantrolene Stabilizes Domain Interactions within the Ryanodine Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6580-6587.
119. Büyükkokuroğlu, M.E., Taysi, S., Polat, F., Göçer, F. (2002). Mechanism of the Beneficial Effects of Dantrolene Sodium on Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal Injury in Rats. *Pharmacological Research*, 45(5), 421-425.
120. Krause, T., Gerbershagen, M.U., Fiege, M., WeiBhorn, R., Wappler, F. (2004). Dantrolene-A Review of its Pharmacology, Therapeutic Use and New Developements. *Anaesthesia*, 59, 364-373.
121. Hamann, S.R., Blouin, R. A., McAllister, R.G. (1984). Clinical Pharmacokinetics of Verapamil. *Clinical Pharmacokinetics*, 9, 26-41.
122. McTavish, D., Sorkin, E.M. (1989). Verapamil. An Updated Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Hypertension. *Drugs*, 38(1), 19-76.
123. Sweetman, S.C. (2002). *Martindale. The Complete Drug Reference* (33 edition). London: Pharmaceutical Press.
124. Beck, E., Sieber, W.J., Trejo, R. (2005). Management of Cluster Headache. *American Family Physician*, 71(4), 717-724.
125. www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=V4629|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&lang=en_US
Erişim Tarihi: 13/01/2010.

126. Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., Mikoshiba, K. (1997). 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl Borate, a Membrane-Penetrable Modulator of Ins (1,4,5)P₃-Induced Ca²⁺ Release. *J Biochem*, 122, 498-505.
127. Soulsby, M.D., Wojcikiewicz, R.J.H. (2002). 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Inhibits Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor Function, Ubiquitination and Downregulation, but acts with Variable Characteristics in Different Cell Types. *Cell Calcium*, 32(4), 175-181.
128. Bootman, M.D., Collins, T.J., Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J., Peppiatt, C.M. (2002). 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) is a Reliable Blocker of Store-Operated Ca²⁺ Entry but an Inconsistent Inhibitor of InsP₃-Induced Ca²⁺Release. *FASEB J*, 16, 1145-1150.
129. www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=ProductNo.|BRAND_KEY&N4=D97545G|ALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPE C Erişim Tarihi: 13/01/2010.
130. De Caro, G., Endean, R., Erspamer, V., Roseghini, M. (1968). Occurrence of Caerulein in Extracts of the Skin of Hyla Caerulea and other Australian Hylids. *Br J Pharmac Chemother*, 33, 48-58.
131. Zaninoviç, V., Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Mouria, M., Pandol, S.J. (2000). Cerulein Upregulates ICAM-1 in Pancreatic Acinar Cells, which Mediates Neutrophil Adhesion to these Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279, 666-676.
132. Kim, H. (2008). Cerulein Pancreatitis: Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Gut and Liver*, 2(2), 74-80.
133. www.wikipedia.org/wiki/File:Ceruletide.png Erişim: 10/10/2010
134. Batcioglu, K., Gul, M., Uyumlu, A.B., Esrefoglu, M. (2009). Liver Lipid Peroxidation and Antioxidant Capacity in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. *Braz J Med Biol Res*, 42(9), 776-782.
135. Esrefoglu, M., Gul, M., Ates, B., Batcioglu, K., Selimoglu, M.A. (2006). Antioxidative Effect of Melatonin, Ascorbic Acid and N-Acetylcysteine on Caerulein-Induced Pancreatitis and Associated Liver Injury in Rats. *World J Gastroenterol*, 12(2), 259-264.

136. Amann, S.T., Bishop, M., Curington, C., Toskes, P.P. (1996). Fecal Pancreatic Elastase 1 Is Inaccurate in the Diagnosis of Chronic Pancreatitis. *Pancreas*, 13(3), 226-230.
137. Lott, J.A., Patel, S.T., Sawhney, A.K., Kazımlerczak, S.C., Love, J.E. (1986). Assays of Serum Lipase: Analytical and Clinical Considerations. *CLIN CHEM*, 32(7), 1290-1302.
138. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Ronndall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-271, 1951.
139. www.worthington-biochem.com/TRY/assay.html Erişim: 25/08/2009
140. www.worthington-biochem.com/TL/assay.html Erişim: 25/08/2009
141. www.cusabio.com Erişim: 08/01/2010.
142. www.uscnk.com Erişim: 12/01/2010.
143. www.biovision.com Erişim: 13/01/2010.
144. Dembin'ski, A., Warzecha, Z., Ceranowicz, P., Warzecha, A. M., Pawlik, W. W., Dembin'ski, M., Rembiasz, K., Sendur, P., Kus'nierz-Cabala, B., Tomaszewska, R., Chowaniec, E., Konturek, P. C. (2008). Dual, Time-Dependent Deleterious And Protective Effect of Anandamide on The Course of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. Role of Sensory Nerves. *Eur. J. Pharmacol.*, 591, 284-292.
145. Beger, H.G., Bittner, R., Block, S., B  chler, M. (1986). Bacterial Contamination of Pancreatic Necrosis. A Prospective Clinical Study. *Gastroenterology*, 91 (4), 433-438.
146. Steer, M.L. (1998). Frank Brooks Memorial Lecture: The Early Intraacinar Cell Events Which Occur During Acute Pancreatitis. *Pancreas*, 17 (1), 31-37.
147. Logsdon, C. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase and trypsin activation in pancreatitis. *J Clin Invest*, 108, 1267-1268.
148. Saluja, A.K., Bhagat, L., Lee, H.S., Bhatia, M., Frossard, J.L., Steer, M.L. (1999). Secretagogue-Induced Digestive Enzyme Activation and Cell Injury in Rat Pancreatic Acini. *Am J Physiol*, 276, 835-842.

149. Yule, D.I., Ernst, S.A., Ohnishi, H., Wojcikiewicz, J.H. (1997). Evidence That Zymogen Granules Are Not a Physiologically Relevant Calcium Pool. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (14), 9093-9098.
150. Fitzsimmons, T.J., Gukovsky, I., McRoberts, J.A., Rodriguez, E., Lai, F.A., Pandol, S.J. (2000). Multiple Isoforms of the Ryanodine Receptor Are Expressed In Rat Pancreatic Acinar Cells. *Biochem J*, 351, 265-271.
151. Zhou, W., Shen, F., Miller, J.E., Han, Q., Olson, M.S. (1996). Evidence for Altered Cellular Calcium in the Pathogenetic Mechanism of Acute Pancreatitis in Rats. *Journal of Surgical Research*, 60(1), 147-155.
152. Frick, T.W., Mithöfer, K., Fernández-del Castillo, C., Rattner, D.W., Warschaw, A.L. (1995). Hypercalcemia causes acute pancreatitis by pancreatic secretory block, intracellular zymogen accumulation, and acinar cell injury. *The American Journal of Surgery*, 169(1), 167-172.
153. Wang, X.D., Deng, X.M., Haraldsen, P., Andersson, R., Ihse, I. (1995). Antioxidant and Calcium Channel Blockers Counteract Endothelial Barrier Injury Induced by Acute Pancreatitis in Rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30(11), 1129-1136.
154. Lake-Bakaar, G., Lyubsky, S. (1995). Dose-dependent effect of continuous subcutaneous verapamil infusion on experimental acute pancreatitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 40(11), 2349-2355
155. Leahy, A.L., Darzi, A., Grace, P., Quereshi, A., Redmond, P., Leader, M., Bouchier-Hayes, D.J., Broe, P. (1993). Verapamil is beneficial in a model of post-ERCP pancreatitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 5(6), 467-470.
156. Andriulli, A., Leandro, G., Niro, G., Mangia, A., Festa, V., Gambassi, G., Villani, M.R., Facciorusso, D., Conoscitore, P., Spirito, F., De Maio, G. (2000). Pharmacologic Treatment Can Prevent Pancreatic Injury After ERCP: A Meta-Analysis. *Gastrointest Endosc*, 51, 1-7.
157. Lampel, M., Kern, H.F. (1977). Acute Interstitial Pancreatitis In the Rat Induced by Excessive Doses of a Pancreatic Secretagogue. *Virchows Arch, A Path Anat and Histol*, 373, 97-117.

158. Matull, W.R., Pereira, S.P., O'Donohue, J.W. (2006). Biochemical Markers of Acute Pancreatitis. *J Clin Pathol*, 59, 340-344.
159. Clavien, P.A., Robert, J., Meyer, P., Borst, F., Hauser, H., Hermann F., Dunand, V., Rohner, A. (1989). Acute Pancreatitis and Normoamylasemia. Not an Uncommon Combination. *Ann Surg*, 210, 614-620.
160. Sternby, B., O'Brien, J.F., Zinsmeister, A.R., Dimagno, E.P. (1996). What is the Best Biochemical Test to Diagnose Acute Pancreatitis? A Prospective Clinical Study. *Mayo Clin Proc*, 71, 1138-1144.
161. Lu, Z., Karne, S., Kolodecik, T., Gorelick, F.S. (2001). Alcohols Enhance Caerulein-Induced Zymogen Activation in Pancreatic Acinar Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282, 501-507.
162. Marchbank, T., Freeman, T.C., Playford, R.J. (1998). Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor. *Digestion*, 59, 167-174.
163. Rinderknecht, H. (1986). Activation of Pancreatic Zymogens. Normal Activation, Premature Intrapancreatic Activation, Protective Mechanisms Against Inappropriate Activation. *Dig Dis Sci*, 31(3), 314-21.
164. Lason, A., Borgström, A., Ohlsson, K. (1986b). Serum Levels Of Immunoreactive PSTI in Acute Abdominal Disorders, with Special Reference to A Possible Extrapancreatic PSTI Production. *Clin Chim Acta*, 161(1), 37-46.
165. Nathan, J.D., Romac, J., Peng, R.Y., Peyton, M., MacDonald, R.Y., Liddle, R.A. (2005). Transgenic Expression of Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor-I Ameliorates Secretagogue-Induced Pancreatitis In Mice. *Gastroenterology*, 128 (3), 717-727.
166. Halangk, W., Lerch, M. M., Brandt- Nedeleev, B., Roth, W., Ruthenbuerger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C., Deussing, J. (2000). Role of Cathepsin B in Intracellular Trypsinogen Activation and The Onset of Acute Pancreatitis. *J Clin Invest*, 106(6), 773-81.
167. Lüthen, R., Grendell, J.H., Niederau, C., Häussinger, D. (1998). Trypsinogen Activation and Glutathione Content Are Linked to Pancreatic Injury in Models of Biliary Acute Pancreatitis. *International Journal of Pancreatology*, 24(3), 193-202.

168. Neoptolemos, J.P., Kemppainen, E.A., Mayer, J.M. (2000). Early prediction of severity in acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide: a multicentre study. *Lancet*, 355, 1955-1960.
169. Hurley, P. R., Cook, A., Jehanli, A., Austen, B. M., and Hermon-Taylor, J. (1988). Development of Radioimmunoassays for Free Tetra-L-aspartyl-L-lysine Trypsinogen Activation Peptides (TAP). *J Immunol Methods*, 111(2), 195–203.
170. Otani, T., Chepilko, S. M., Grendell, J. H., Gorelick, F. S. (1998). Codistribution of TAP and The Granule Membrane Protein GRAMP-92 in Rat Caerulein-Induced Pancreatitis. *Am J Physiol*, 275, G999–G1009.
171. Saluja, A. K., Donovan, E. A., Yamanaka, K., Yamaguchi, Y., Hofbauer, B., Steer, M. L. (1997). Cerulein-Induced in Vitro Activation of Trypsinogen in Rat Pancreatic Acini is Mediated by Cathepsin B. *Gastroenterology*, 113(1), 304–310.
172. Orabi, A.I., Shah, A.U., Ahmad, M.U., Choo-Wing, R., Parness, J., Jain, D., Bhandari, V., Husain, S.Z. (2010). Dantrolene Mitigates Caerulein-Induced Pancreatitis in vivo in Mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, 196-204.
173. Esrefoglu, M., Gul, M., Ates, B., Batcioglu, K., Selimoglu, M.A. (2006). Antioxidative Effect of Melatonin, Ascorbic Acid And N-Acetylcysteine on Caerulein-Induced Pancreatitis and Associated Liver Injury in Rats. *World J Gastroenterol*, 12(2), 259-264.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI



Toplantı Tarihi : 11.01.2010
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2010/04
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsi : Sıçan (rat)
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar albino
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 60
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı : 3-4 aylık
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Ağırlığı : 280-350 g

Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Kadir BATÇIOĞLU'nun yürütücüsü olduğu "**Ratlarda Cerulein ile indüklenen akut pankreatit üzerine Verapamil, Dantrolen ve 2-Aminoetoksidifenilborat (2-APB)'ın etkilerinin incelenmesi**" isimli 2010/04 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ
Başkan

Doç.Dr.Nigar VARDI
Başkan Yard.

Prof.Dr. Yunus KARAKOÇ
Raportör

Prof.Dr. Ahmet KIZILAY
Üye

Doç.Dr.Abdurrahman KARAMAN
Üye

Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ
Üye

Vetr.Hek.M.Zafer BOZDAĞ
Üye

Katılmadı

Bekir ÜNAL
Sivil Üye

Katılmadı

Zafer KIRÇUVAL
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Katılmadı

ÖZGEÇMİŞ

2002 yılında, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde, 2004 yılında başlamış olduğum Biyokimya yüksek lisansını 2007 yılında tamamladım. 2004 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesine araştırma görevlisi olarak atandım, halen burada çalışmaktayım. 2007 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladım. Evli ve bir kız çocuk annesiyim.