



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANDA HİDROKLORİK ASİT/ETANOL İLE İNDÜKLENEN
MİDE ÜLSERİNDE 1,25 DİHİDROKSİ VİTAMİN D3'ÜN ETKİSİ**

HASAN HÜSEYİN ŞAHİN
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. İNCİ ALİCAN

İSTANBUL – 2017

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Fizyoloji
Tez Sahibi : Hasan Hüseyin ŞAHİN
Tez Başlığı : Sıçanda Hidroklorik Asit/Etanol İle İndüklenen Mide Ülserinde 1,25 Dihidroksi Vitamin D3'ün Etkisi
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 04.10.2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

İmza

Prof.Dr.İnci ALİCAN

Marmara Üni. Tıp fakültesi Fiz. ABD

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr.Berrak YEĞEN

Marmara Üni.Tıp Fak Fiz. ABD

Prof.Dr.Feriha ERCAN

Marmara Üni.Tıp Fak.Histoloji ve Embriyoloji ABD.

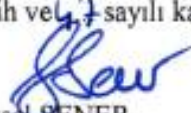
Prof.Dr.Gönül ŞİMŞEK

İst. Üni.Cerrahpaşa Tıp Fak.Fiz.ABD

Prof.Dr.Güler ÖZTÜRK

İst.Medeniyet Üni.Tıp Fak.Fiz.ABD

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26/10/2017 tarih ve 47 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

16.09.2017

Hasan Hüseyin Şahin

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her konuda destek olan, bilgi ve deneyimini bana aktaran ve tez çalışmamın gerçekleşmesinde çok emeği ve zamanı geçen değerli danışman hocam **Prof. Dr. İnci Alican'a**;

Tıp fakültesinin ilk yıllarından itibaren bana ışık tutan, bilimsel çalışmalarda yer edinmemi sağlayan ve bilim sevgisini bana aşılammış değerli hocam **Prof. Dr. Berrak Yeğen'e**, bilgi ve tecrübelerini her zaman paylaşarak destek olan hocalarım **Prof. Dr. Hızır Kurtel'e**, **Doç. Dr. Özgür Kasımay Çakır'a** ve **Yard. Doç. Dr. Alper Yıldırım'a**;

Histolojik değerlendirmeleri tamamlamamda desteklerini esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın öğretim üyelerinden **Doç. Dr. Ünal Uslu** ve **Yard. Doç. Dr. Alev Cumbul'a**; Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın öğretim üyelerinden **Prof. Dr. Feriha Ercan'a**; Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın öğretim üyelerinden **Prof. Dr. Ayşen Yarat** ve **Arş. Grv. Burçin Alev'e**;

Doktora eğitimim sırasında desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen değerli doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma;

Eğitim ve tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan, sevgi ve desteğini eksik etmeyen annem **Emine Şahin** ve babam **Osman Şahin'e**; kardeşim **Senem Şahin'e**;

Varlığıyla beni mutlu eden ve tez çalışmam boyunca destek, sabır ve anlayış gösteren sevgili eşim **Cansu Şahin'e** en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAPKO-proje no: SAG-C-DRP-100615-0253) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| KAPAK | 1 |
| TEZ ONAYI | 2 |
| BEYAN | 3 |
| TEŞEKKÜR | 4 |
| İÇİNDEKİLER | 5 |
| TABLO LİSTESİ | 8 |
| ŞEKİL LİSTESİ | 9 |
| RESİM LİSTESİ | 10 |
| 1. ÖZET | 11 |
| 2. ABSTRACT | 12 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 13 |
| 4. GENEL BİLGİLER | 17 |
| 4.1 Peptik Ülser | 17 |
| 4.1.1 Gastrik Ülserin Tanımı | 17 |
| 4.1.2 Gastrik Ülserin Epidemiyolojisi | 18 |
| 4.1.3 Gastrik Ülserin Nedenleri | 19 |
| 4.1.4 Gastrik Ülser Gelişmesinde Risk Faktörleri | 20 |
| 4.1.5 Gastrik Ülser'in Patogenezi | 21 |
| 4.1.5.1 Gastrik Ülser Patogenezinde Nitrik Oksitin Rolü | 24 |
| 4.1.5.2 Gastrik Ülser Patogenezinde Potasyum Kanallarının Rolü | 27 |

| | |
|--|----|
| 4.1.5.3 Gastrik Ülser Patogenezinde Sülfidril Gruplarının Rolü | 28 |
| 4.1.5.4 Gastrik Ülser Patogenezinde Prostaglandinlerin Rolü | 28 |
| 4.2 Vitamin D (1,25 Dihidroksi Vitamin D3) | 31 |
| 4.2.1 Vitamin D'nin Sentezi ve Yapısı | 31 |
| 4.2.2 Vitamin D'nin Etki Mekanizması | 34 |
| 4.2.3 Vitamin D'nin Fonksiyonları ve İnflamasyon ile İlişkisi | 35 |
| 5. GEREÇ VE YÖNTEM | 39 |
| 5.1 Deney Hayvanları | 39 |
| 5.2 Deney Grupları | 40 |
| 5.3 Deney Protokolü | 40 |
| 5.4 Gastrik Ülser Modelinin Uygulanması | 41 |
| 5.5 Mide Hasarının Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi | 42 |
| 5.6 Doku Hasarının Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi | 42 |
| 5.7 Midede Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeyi Ölçümleri | 42 |
| 5.8 Midede Miyeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü | 43 |
| 5.9 Midede Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü | 43 |
| 5.10 Midede Katalaz Aktivitesi Ölçümü | 44 |
| 5.11 Serumda İnterlökin (IL)-1 β ve IL-10 Düzeyi Ölçümleri | 46 |
| 5.12 Midede Nükleer Faktör Kappa (NF)- κ B Ekspresyonu Ölçümü | 46 |
| 5.13 Midede Apoptozis Ölçümleri | 47 |
| 5.14 İstatistiksel Analiz | 47 |

| | |
|---|----|
| 6. BULGULAR | 48 |
| 6.1 Mide Lezyonlarının Makroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi | 48 |
| 6.2 Mide Lezyonlarının Mikroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi | 50 |
| 6.3 Midede Lipid Peroksidasyonunun Değerlendirilmesi | 52 |
| 6.4 Midede Glutasyon (GSH) Düzeyinin Değerlendirilmesi | 53 |
| 6.5 Midede Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Değerlendirilmesi | 54 |
| 6.6 Midede Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi | 55 |
| 6.7 Serumda IL-1 β ve IL-10 Düzeyi Ölçümleri | 56 |
| 6.8 Midede Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) Ekspresyonu | 57 |
| 6.9 Midede Apoptozisin Değerlendirilmesi | 59 |
| 7. TARTIŞMA VE SONUÇ | 61 |
| 8. KAYNAKLAR | 70 |
| 9. EKLER | 89 |
| 9.1 Ek-1 Etik Kurul Onayı | 89 |
| 10.ÖZGEÇMİŞ | 90 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Deney Grupları | 40 |
| Tablo 2. Mide Lezyonlarını Mikroskopik Olarak Skorlama Kriterleri | 42 |
| Tablo 3. Katalaz Aktivitesi Ölçümü İçin Çözelti Miktarları | 45 |
| Tablo 4. Deney gruplarında mide doku örneklerinde SOD ve Katalaz aktivitelerinin düzeyleri | 55 |
| Tablo 5. Deney gruplarında serumda IL 1 β ve IL 10 seviyeleri | 56 |
| Tablo 6. Deney gruplarında mide doku örneklerinde NF- κ B immünohistokimya boyaması ile elde edilen H skoru değerleri | 57 |
| Tablo 7. Deney gruplarına ait mide doku örneklerinde apoptoz indeksinin değerlendirilmesi | 59 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

| | |
|--|----|
| Şekil 1. NOS'un aktive edilmesi ve NO sentezi | 26 |
| Şekil 2. Araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz enzim yolu | 29 |
| Şekil 3. Vitamin D'nin moleküler yapısı | 32 |
| Şekil 4. Deney gruplarında mide lezyonlarının makroskopik olarak incelenmesi sonucu elde edilen ülser indeksi (mm) değerleri | 49 |
| Şekil 5. Deney gruplarında mide doku örneklerinde malondialdehit düzeyleri | 52 |
| Şekil 6. Deney gruplarında mide doku örneklerinde glutatyon düzeyleri | 53 |
| Şekil 7. Deney gruplarında mide doku örneklerinde miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin değerlendirilmesi | 54 |

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

- | | |
|--|----|
| Resim 1. Farklı Ülkelerde Mide Ülseri Oranları | 19 |
| Resim 2. Ülser grubuna ait örnek midenin makroskopik görünümü | 48 |
| Resim 3. Vitamin D3 ön tedavisi uygulanmış ülser grubuna ait örnek midenin makroskopik görünümü | 49 |
| Resim 4. Deney gruplarına ait örnek mide dokularının histolojik mikrografları | 51 |
| Resim 5. Deney gruplarına ait örnek mide dokularında NF-κB ekspresyonunu gösteren fotoğraflar | 58 |
| Resim 6. Deney gruplarına ait örnek mide dokularında TUNEL pozitif apoptotik hücreleri gösteren fotoğraflar | 60 |

Sıçanda Hidroklorik Asit/Etanol ile İndüklenen Mide Ülserinde 1,25 Dihidroksi Vitamin D3'ün Etkisi

Öğrencinin Adı: Hasan Hüseyin Şahin

Danışmanı: Prof. Dr. İnci Alican

Anabilim Dalı: Fizyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı sıçanlarda hidroklorik asit (HCl)/etanol ile oluşturulan gastrik ülser modelinde vitamin D3'ün koruyucu etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda her iki cinsiyetten Sprague-Dawley sıçanlara (250-300g) 24 saat açlık sonrası gavajla 0,2 ml asidifiye edilmiş etanol solüsyonu (0,3 M HCl/%60 etanol) uygulanarak gastrik hasar oluşturuldu. Kontrol grubuna ise, gavajla 0.2 ml fizyolojik tuzlu su verildi. Ülser gruplarına 14 gün boyunca tek başına 1,25 dihidroksi vitamin D3 (0,25 µg/kg, intraperitoneal) ya da vitamin D3 ile birlikte L-NAME (20 mg/kg; intraperitoneal), N-etilmaleimid (NEM; 10 mg/kg; intraperitoneal), glibenklamid (10 mg/kg; oral) veya indometazin (10 mg/kg, subkutan) uygulandı. Makroskopik ve mikroskopik analizler sonrasında oksidan ve anti-oksidan parametreler, serumda IL-1β ve IL-10 düzeyleri, doku örneklerinden NF-κB immünohistokimya boyamada H skoru değerlendirilmesi ve Tunnel yöntemi ile apoptotic indeks değerlendirilmesi bakılan parametreler arasındaydı.

Bulgular: Tedavisiz ülser grubunda makroskopik ülser indeksi vitamin D tedavisi ile azaltıldı (p<0,05) ve bu etki L-NAME varlığında daha belirginleşirken (p<0,01); İndo varlığında ortadan kalktı (p<0,01). Ülser grubu, kontrole göre artmış gastrik malondialdehit (MDA) (p<0,001), azalmış glutatyon (p<0,05) ve artmış miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi (p<0,001) gösterdi. Bu değişiklikler vitamin D ile baskılandı (sırası ile, p<0,001, p<0,01 ve p<0,001). Vitamin D ön tedavisi ülser grubunda artmış olan NF-κB immünohistokimya boyamada H skoru değerini ve apoptotic indeks (%) değerlerini anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi.

Sonuç: Vitamin D3'ün mide ülserinde koruyucu etkisi etanol indüklü inflamatuvar reaksiyon, oksidatif stres ve hücrel apoptoz düzeylerini azaltıcı etkisiyle ilişkilendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Vitamin D3, gastrik ülser, inflamasyon, sıçan, etanol

Effect of 1,25 Dihydroxyvitamin D3 on HCl/Ethanol Induced Gastric Injury In Rats

Student's Name: Hasan Hüseyin Şahin

Supervisor: Prof. Dr. İnci Alican

Department: Department of Physiology

2. ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to determine if vitamin D3 has a protective effect against tissue injury in a rat model of HCl/ethanol-induced gastric ulcer.

Materials and Methods: Sprague-Dawley rats of both sexes (250-300 g) were fasted for 24 hours. A gastric injury was induced by acidified ethanol solution (0,3 M HCl/60% ethanol) per os (0,2 ml). Control group received saline (0,2 ml, per os). Ulcer groups were treated with 1,25 dihydroxyvitamin D3 (VitD; 0,25 µg/kg; intraperitoneally) for 14 days alone or along with L-NAME (20 mg/kg; intraperitoneally), N-ethylmaleimide (NEM; 10 mg/kg; intraperitoneally), glibenclamide (10 mg/kg; orally) or indomethacin (10 mg/kg; subcutaneously). After macroscopically and microscopically examination of stomachs, oxidant and anti-oxidant parameters, serum IL-1β and IL-10 levels, H scores from NF-κB immunostaining and apoptotic index by Tunnel method were measured.

Results: Gastric macroscopic lesion score of the untreated ulcer group was decreased by pretreatment with VitD ($p<0,05$) and this effect was augmented by L-NAME ($p<0,01$) and attenuated by Indo ($p<0,01$) given along with VitD. Ulcer group revealed increased gastric malondialdehyde (MDA) ($p<0,001$), reduced endogenous antioxidant glutathione (GSH) levels ($p<0,05$) and increased myeloperoxidase (MPO) activity ($p<0,001$) in comparison to control. The changes in these parameters were effectively suppressed by VitD ($p<0,001$, $p<0,01$ and $p<0,001$; respectively). H score evaluations in NF-κB immunostaining and apoptotic index values (%) which were increased in ulcer group, effectively decreased by pretreatment with VitD.

Conclusion: The mechanism of this protective role of VitD on gastric ulcer can be associated with reducing effect of VitD on ethanol induced inflammation, oxidative stress and cellular apoptosis levels.

Key words: Vitamin D3, gastric ulcer, inflammation, rat, ethanol.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Gastrik ülser toplumda çok yaygın olarak görülen, kronik bir hastalıktır. Tedavisinin ve önlenmesinin sağlanması adına birçok deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Medikal tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda cerrahi seçeneklere ulaşabilen sonuçlar doğurmaktadır. Ülkelerin ekonomisine önemli ölçüde yük getiren bir hastalık türüdür. Tedavi masraflarının yanı sıra ciddi iş gücü kaybına neden olabilmekte ve çok sayıda hastane başvurusuna neden olmaktadır.

Mide mukozası normal koşullarda asit-peptik aktiviteden etkilenmez. Ancak kronik hastalık, şok, travma ve çeşitli organ yetmezliği gibi fiziksel ve stres durumlarında gastroduodenal mukozada kendi kendini sindirme gelişebilmektedir. Böyle durumlarda yüzeysel erozyon veya muskularis mukozayı içine alan ülserler görülmektedir. Midede hidroklorik asit (HCl), safra reflüsü, çeşitli içerik ve sıcaklıkta yiyecekler, mikroorganizmalar, alkol ve nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar gibi luminal içeriği hasarlayıcı ajanlara karşı çok sayıda gastroduodenal savunma mekanizmaları mevcuttur. Bunlar müküs-bikarbonat bariyeri, yüzey epitel hücreleri, mukozanın yenilenmesi, kan akımı, asit-baz dengesi, endojen sülfidril ve epidermal büyüme faktörü gibi faktörlerdir (Miller, 1987; De Luca ve Cantorna, 2001; Mathieu ve Adorini, 2002). Gastrik mukozal kan akımının gastrik mukozal hasara karşı önemli bir faktör olduğu ve lokal salıverilen prostaglandinler, nöropeptidler ve nitrik oksit (NO) gibi vazodilatör mediyatörlerin mukozal direnci sağlamada önemli etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (Whittle, 1992).

Gastrik ülser ve duodenal ülser, gastroduodenal mukozayı etkileyen saldırgan ve koruyucu faktörler arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Feldman ve ark., 2002; Hooderwerf ve Pasricha, 2006). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda radikal oksijen türevleri ve serbest radikallerin gastrik ülser patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Bandyopadhyay, 2002). Bunların dışında bazı endojen faktörler olan NO ve sülfidril grupların ülser patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir (Tsukimi ve ark., 2001). Mide mukozasında prostaglandinlerin ve ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasının bikarbonat ve müküs

sekresyonunu uyardığı, mukozal kan akımını sağlayıp asit sekresyonunu önlediği bildirilmiştir (Rainsford, 1978; Garcia ve ark., 1997).

Akut gastrik ülser modeli olarak bilinmekte olan asidifiye etanol uygulaması sıçan midesinde nekrotik lezyonlar oluşturulabilmektedir. Etanol uygulaması direk toksik etkileri indüklemekte, müküs ve bikarbonat salınımını azaltmakta ve damar duvarı kan akımını düşürmektedir (Mincis ve ark., 1995; Samonia ve ark., 2004). Ek olarak lipid peroksidasyonunu arttırmakta, reaktif oksijen türevlerini çoğaltmakta, antioksidan sistem aktivitesini azaltmakta, permeabilite değişikliklerine yol açmakta ve mitokondri membranı depolarizasyonunu değiştirerek hücreyi ölüme sürüklemektedir (Repetto ve Llesuy, 1995; Oliveira ve Da Silva, 2012). HCl ise, gastrik lezyon oluşumunu hızlandırmakta ve mukozal korumayı azaltmaktadır (Sun ve ark., 1991).

Daha önceki çalışmalarda gösterildiği üzere, etanol gastrik mukozada protein olmayan sülfidril gruplarını ve katalaz seviyelerini azaltmaktadır. Bu sülfidril grupları mukoza alt üniteleri arasında disülfid bağları oluşturarak ayrışmalarını önlemektedirler. Katalaz da bilindiği üzere reaktif oksijen türlerinin birikimini önlemektedir (Halliwell, 1990; Avila ve ark., 1996; Pongpriadacha ve ark., 2003)

Prostaglandin E ve I gastrointestinal sistem boyunca özellikle gastrik ve duodenal mukozadan üretilir. Prostaglandinler vagal ve hormonal uyarılar ile mide ve bağırsak lümeni içine serbestlenirler ve mukozal bütünlüğün sağlanmasında, mukozal kan akışının kontrolünde ve potansiyel zararlı ajanlara karşı korumada rol oynarlar. Ülserli hastaların gastrik mukozası, az miktarda prostaglandin E ve I üretilmesine meyillidir. Bu da koruyucu prostaglandin eksikliğinin peptik ülser patogenezinde rol oynadığını desteklemektedir. Non stereoidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID) ile mukozal prostaglandin üretiminin baskılanması, mukozal hasara neden olur ve peptik ülser oluşma veya var olan peptik ülserin şiddetlenmesi riskini artırır. Ekzojen uygulanan prostaglandin E ve onun stabil analogları gastrik ve duodenal ülser tedavisinde koruyucu etki göstermektedir. Sonuçlar, bu ajanların ülser iyileşme oranını belirgin bir düzeyde arttırdığını ortaya koymaktadır. Bazı anti-ülser ilaçları, ülser iyileşmesi üzerindeki yararlı etkilerini, endojen prostaglandin salınımını düzenleyerek göstermektedir (Chodick ve ark., 2010).

NO, mukoza ve gastrik epitelin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır. Farelerin gastrik mukozal hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, NO'nun doza bağlı bir şekilde müküs sekresyonunu uyardığı ve bu uyarının siklik guanil siklaz (cGMP) kaskatı ile bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur (Konturek, 1985). NO potent bir vasodilatördür ve gastrik kan akımını düzenler. Sıçanlar üzerindeki deneyler, NO sentaz inhibitörü olan NG-monometil-L-arjinin'in (L-NMMA) sistemik kan basıncını artırdığını ve istirahat gastrik mukoza kan akımını azalttığını ortaya koymuştur (Brown ve ark.,1993). Ekzojen verilen NO, mukozal kan akımını düzenleyerek ve lökosit-endotel hücre etkileşimini inhibe ederek sıçanlarda indometazin ile indüklenen gastrik mukozal hasardan korumaya yardımcı olmaktadır (Pique ve ark.,1989). Yapılan başka bir araştırmada, indometazin ile indüklenen peptik ülserin iyileşmesinde, NO'nun modülatör etkisi, NO öncülü nitrogliserin, L-arjinin ve NO sentaz (NOS) enziminin kompetitif inhibitörü L-NAME kullanılarak değerlendirilmiş ve L-arjinin ve nitrogliserin'in indometazin ile indüklenen ülseri neredeyse tamamen iyileştirdiği, nitro L-arjinin metil ester'in (L-NAME) ise mukozal hasarı daha da alevlendirdiği bulunmuştur (Calatayud ve ark., 1999).

1,25 dihidroksi vitamin D3 böbreklerde öncül formu olan 25-hidroksi-vitamin D3'den sentezlenmektedir (Sakaki ve ark., 2005). Kemik sağlığı ve mineral yoğunluğu açısından çok önemli bir role sahiptir. Bilinen etkilerinin dışında vitamin D immün sistemde için de gereklidir. Vitamin D'nin T hücreleri, interferonlar, interlökinler ve sitokinler gibi immün sistemin çoğu ara elemanına olan etkileri daha önce gösterilmiştir (Hewison, 2012). Daha önce yapılan çalışmalarda, vitamin D eksikliğiyle inflamatuvar bağırsak hastalığı arasında ilişki olduğu ortaya konulmuştur (Wu ve Sun, 2011). Trinitrobenzen sülfonik asit ile indüklenen kronik kolit modelinde vitamin D analoglarıyla inflamasyonda azalma olduğu gözlenmiştir. Bu azalma mikroskopik ve makroskopik düzeylerde düzelme, kilo alımı ve kolite özgü immünolojik parametrelerde düzelme ile anlaşılabilmiştir (Daniel ve ark., 2008). Benzer şekilde, dekstran sodyum sülfat ile indüklenen kolit modelinde D vitamini eksikliği olan farelerde inflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının D vitamin miktarları yeterli düzeyde olanlara kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (Lagishetty ve ark., 2010).

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında bu tez çalışmasında, sıçanlarda oluşturulan mide ülserine 1,25-dihidroksi-vitamin D3'ün etkilerini ve bu etkilerin olası mekanizmalarını araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmada hidroklorik asit/etanol ile mide ülseri oluşturulan sıçanlarda 1,25-dihidroksi-vitamin D3 tedavisinin mide dokusundaki etkileri oksidan-antioksidan parametreler, apoptoz ve histopatolojik değerlendirme parametreleri ile gösterilmiştir. Buna ek olarak, bu deneysel modelde D vitamininin etki mekanizmasının prostaglandinler, NO, ATP duyarlı K⁺ kanalları ve protein olmayan sülfidril grupları gibi yollar üzerinden olup olmadığını göstererek literatüre ve klinik uygulamalara katkı sağlamak amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1 Peptik Ülser

Histopatolojik olarak, sadece mukozayı tutan çapı 5 mm'den küçük, derinliği 1 mm'den küçük yüzeysel lezyon erozyon olarak tanımlanmakta, lezyonun muskularis mukozayı aşarak submukoza veya muskularis propria tabakasını da içerecek şekilde ilerlemesiyle ülser oluşmaktadır. Ülser yüzeysel fibrin ve eksüda, fibrinoid nekroz, granülasyon dokusu ve fibrozis olmak üzere dört ayrı bileşeni içermektedir.

Peptik ülser peptik sıvıya maruz kalmış (asit-pepsin) bölgelerde oluşan ülserleri tanımlamaktadır (Scott ve Keneth, 2007). Peptik ülser en sık duodenum ve midede görülmektedir. Ayrıca özofagus alt ucu, jejunum, mide cerrahisi sonrası anastomoz yerinde veya nadiren heterotropik mide mukozası içeren herhangi bir yerde de görülebilir (Spechler, 2002). Duodenumdaki peptik ülserlerin %95'i bulbustadır ve %90'ı proksimal 3 cm dahilinde bulunur. Çapı çoğu zaman 1 cm'den küçüktür, bazen 3-6 cm arasında dev ülserler gözlenebilir. Mide ülserleri ise proksimal veya distal yerleşimli olabilirler (Soll, 1998).

4.1.1 Gastrik Ülser'in Tanımı

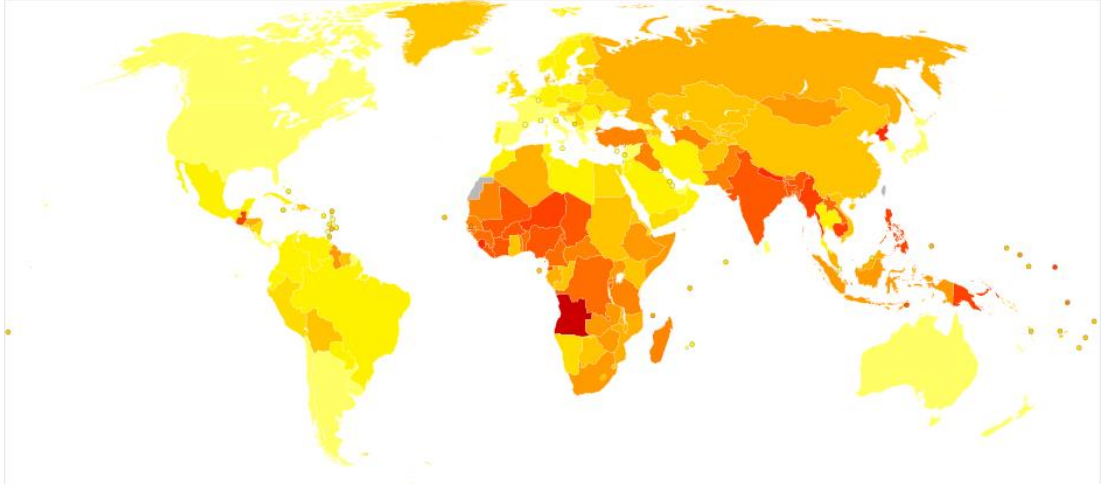
Midenin mukozal yüzeyinin inflamasyonu, irritasyonu veya erozyonu gastrit olarak nitelendirilir ve hafif asemptomatik formundan ağır ülseratif forma kadar değişkenlik gösterebilir (Webster-Gandy, 2012). Bu ülser durumu midenin mukozal yüzeyi üzerinde gerçekleştiği zaman gastrik ülser olarak adlandırılır. Gastrik ülser midenin içinde gelişir; dünya çapında birçok kişiyi etkiler ve mukozadan muskularis mukozaya penetrasyonu temsil eder. Mide ülserleri kanama ve perforasyon gibi birçok komplikasyona dolayısıyla ciddi morbidite ve mortalitaye neden olabilmektedir (Ramakrishnan ve Salinas, 2007). Bu ülser tipinin oluşmasındaki ana mekanizma lümendeki saldırgan faktörler ile koruyucu faktörler arasındaki dengenin bozulmasıdır (Li ve ark., 2014). Ayrıca ülserin ortaya çıkmasına neden olan en

önemli iki etken olarak *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ve nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) gösterilebilir (Ji ve ark., 2012).

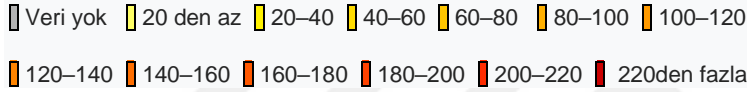
4.1.2 Gastrik Ülser'in Epidemiyolojisi

Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 500.000 kişide mide ülseri oluşmaktadır. Hastalığın yıllık oluşturduğu doğrudan ve dolaylı sağlık bakım masrafları 10 milyar doları bulmaktadır. Hastaların yaklaşık %70'inde hastalık 25 ile 64 yaş grubu arasında gözlenmektedir (Sonnenberg ve Everhart, 1996). Bir kişinin yaşamı boyunca mide ülseri olma ihtimali yaklaşık olarak %10'dur (Snowden, 2008). *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile mide ülseri arasındaki ilişki Avustralyalı iki bilim adamı Robin Warren and Barry J. Marshall tarafından 1982 yılında bildirilmiştir ve fizyoloji alanında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (Marshall, 1983). Batı ülkelerinde *Helicobacter pylori* ile enfekte kişi sayısı yaş gruplarıyla kabaca orantılıdır (20 yaş için %20, 40 yaş için %40 vb.). Üçüncü dünya ülkelerinde prevalans toplam popülasyon için %70'lerde seyrederken; gelişmiş ülkelerde bu oran maksimum %40 civarındadır (Brown, 2000). Dünya Sağlık Örgütü 2004 verilerine bakıldığında dünya genelinde Afrika'nın batı yarısı ile Asya'nın güney bölgesinde daha fazla mide ülseri oranlarına rastlanmaktadır (Resim 1).

Resim 1 : Farklı Ülkelerde Mide Ülseri Oranları



Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 verilerine göre ülkeler arası her 100.000 nüfus için mide ülseri oranları (World Health Organisation, 2009).



Kaynak: Dünya Sağlık Örgütü'nün 2009 yılında yayınladığı "Death and DALY 2004" verilerinden uyarlanmıştır.

4.1.3 Gastrik Ülserin Nedenleri

Mide ülserinin en sık nedenleri arasında *Helicobacter pylori* enfeksiyonu (%48) ve steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) (%24) bulunmaktadır. Bunların dışında bazı enfeksiyonlar (sitomegalovirüs, tüberküloz vb.) ile eşlik eden morbid hastalıklar (siroz, kronik böbrek yetmezliği, Crohn Hastalığı, sarkoidoz vb.) mide ülseriyle birlikte görülebilmektedirler (Kurata ve Nogawa, 1997). Normal midede asit ve pepsinin (saldırgan faktörler) zararlı etkisi ile, koruyucu faktörler (müküs, bikarbonat sekresyonu, mide epitel hücrelerinin bütünlüğü, yenilenmesi ve kanlanması) arasında denge vardır. Bu denge saldırı faktörleri lehine bozulduğunda ülser oluşur (Li ve ark., 2014).

Mukozayı koruyan faktörler arasında epitel hücrelerin yenilenmesi, bütünlüğü ve kanlanmasında prostoglandinler; ayrıca bikarbonat ve müküs sekresyonu gibi etkenler önem taşırlar. Aspirin veya ibuprofen gibi NSAİİ'lerin kullanımı ile endojen prostaglandin sentezi inhibe olur. Bu durum da mukozal dokuda dengenin bozulmasına ve ülser oluşumu için ortam hazırlığına neden olur (Soll ve Isenberg, 2000).

Ülser oluşmasında mide sıvısının peptik aktivitesinin ve asidik oluşunun rolü büyüktür. Bu sebeple ülser neden olan kolaylaştırıcı faktörler arasında asit oranındaki artış sayılabilir. Hastalıklar veya ağır yanık vakalarındaki gibi stres faktörü, Zollinger Ellison sendromu veya mastositoz gibi durumlar ülser oluşumunda artmış asit sekresyonunun primer rolünü gösteren hastalıklara örnek verilebilir. Bu durumlar dışında mide kanseri ya da lenfoma gibi bazı malign hastalıklar, kemoterapotik ajanlar gibi bazı ilaçlar, bifosfonatlar ve steroidler ülser oluşumuna neden olabilmektedir (Kurata ve Nogawa, 1997).

4.1.4 Gastrik Ülser Gelişmesinde Risk Faktörleri

Gastrik ülser oluşumunda ailesel kalıtım ve genetik önemli risk faktörleri arasındadır. Yapılmış çalışmalarda gastrik ülseri olan bireylerin ailelerinde gastrik ülser prevalansı üç kat daha fazla olarak görülmüştür (Rotter, 1983). Hiperpepsinojenemi ayrıca otozomal dominant geçiş gösteren ve ülser eğilim oluşturan bir durum olarak bilinir (Mertz ve ark., 2000). İnterlökin IL-1 β 'nin sitoprotektif özellikler taşımasına rağmen gen seviyesinde olabilecek değişiklikler sonrasında mide dokusunda ülser oluşumuna sebep olabileceği bildirilmiştir (Robert ve ark., 1991). Benzer şekilde siklooksijenaz (COX) 1 veya prostaglandin yolunda oluşan genetik değişiklikler ülser eğilim oluşturabilir (Arisawa ve ark., 2007).

Sigara içiciliği mide ülseri oluşumunu kolaylaştıran faktörlerden biri olarak görülebilir. Sigara gastroduodenal mukoza için zararlıdır ve *Helicobacter pylori* infiltrasyonu sigara içenlerin mide dokularında daha yoğun olarak bulunmuştur (Koivisto ve ark., 2008). Sigara ayrıca pankreastan bikarbonat salınımını da azaltmaktadır (Friedman ve Peterson, 1998).

Yüksek miktarda alkol alımı gastrik mukozal bariyere zarar vererek akut gastrik mukozal lezyonlar oluşturabilmektedir. Ayrıca alkol alımı asit sekresyonunu da artırmaktadır (Peterson ve ark., 1986).

Bazı yiyecek ve içeceklerin dispepsi yaptığı bilinmektedir fakat ülser oluşturduğuna dair kesin veriler henüz yoktur. Bazı gıdalar mide ülserleri için koruyucu da olabilmektedir. Kırmızı acı biberin mukozal adaptasyonu aktive ederek hasara karşı koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi; esansiyel yağ asitlerinin diyetle eksikliğinin ülser oluşumunda kolaylaştırıcı faktör olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Kang ve ark., 1995). Ayrıca meyve ve sebzeler, lifli gıdalar ve vitamin A'dan zengin besinlerin ülserden koruyucu olduğu belirtilmiştir (Hollander ve Tarnawski, 1986). Kahve asit sekresyonu için güçlü bir uyaran olsa da dispepsi ve reflü oluşturmasına rağmen doğrudan mide ülserine yol açtığını bildiren çalışma bulunmamaktadır.

Stres ile ülser arasındaki ilişkiyi sorgulayan birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen birbirini tutmayan sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni ülser patogenezinin çok faktörlü oluşu ve stresin de ölçülmesi zor bir etken olmasıdır.

Ülser oluşumundaki risk faktörler arasında ayrıca ülserin büyüklüğü gibi karakteristik özellikleri ve kişinin yaşam şekli, yaşı, kronik hastalıkları, alışkanlıkları gibi özellikleri de sayılabilir.

4.1.5 Gastrik Ülserin Patogenezi

Normal midede asit ve pepsinin (agresif faktörler) zararlı etkisi ile, koruyucu faktörler (müküs, bikarbonat sekresyonu, mide epitel hücrelerinin bütünlüğü, yenilenmesi ve kanlanması) arasında denge vardır. Bu denge agresif faktörler lehine bozulduğunda ülser gelişir. Kısacası ülserin ortaya çıkmasında temel patogenezi, gastroduodenal mukozanın bütünlüğünün, agresif ve koruyucu/onarıcı faktörler arasındaki dengenin değişmesine bağlı olarak bozulması durumudur. Koruyucu faktörlerin azalması mide ülserinde daha ön plana çıkarken; agresif faktörlerin

artması duodenal ülser gelişiminde daha etkilidir (Soll, 1998; Friedman ve Peterson, 1998; Soll ve Isenberg, 2000).

Gastrik ülser mide sıvısı tarafından gerçekleştirilen sindirim işlevi sonrasında mide mukozasının hasar görmesiyle oluşmuş alan olarak tarif edilebilir. Ülser oluşumu sırasında mide sıvısı salgı oranı ile gastroduodenal mukoza bariyeri ve salgılanan sıvılar ile mide asidinin nötralizasyonu ile sağlanan koruma arasındaki denge kaybolmuştur. Normal şartlarda mide sıvısıyla karşılaşan tüm alanlar müküs bezleri tarafından desteklenir. Bu bezler arasında; alt özofagustaki birleşik müküs bezleri, gastrik bezlerde boyun müküs hücreleri, mideyi saran müküs hücreleri, derin pilor bezleri ve duodenum üst kısımlardaki alkalin sıvı salgılayan Brunner bezleri sayılabilir (Guyton ve Hall, 2013). Gastrik ülserin oluşmasını engellemek adına koruyucu mekanizmalar ve onarıcı mekanizmalar bulunmaktadır;

Koruyucu Mekanizmalar:

1. Epitel öncesi mekanizma: Duodenum ve mideyi saran epitel hücrelerinden ortama salgılanan önleyici müküs tabakası, lümen den mukozaya doğru asit ve pepsinin geçmesini engeller. Yapılmış çalışmalarda ülser varlığında müküsün heterojen ve zayıf bir yapıda olduğu gösterilmiştir. NSAİİ'ler müküs sentezini azaltmakta, *Helicobacter pylori* ise proteaz enzimleri sayesinde müküs yıkımına neden olmaktadır. Epitel hücrelerinden salgılanan bikarbonat ise, pH gradyenti yaratarak mukoza tabakasının lümenal yüzeyinde asidik ve alttaki epitele bakan yüzeyde nötral ortamın oluşmasını sağlar. NSAİİ'ler ve *Helicobacter pylori* bikarbonat sekresyonunu da azaltmaktadır.

2. Epitelyal mekanizma:

- a. Apikal bariyer:** Mide mukoza hücrelerinin özelleşmiş apikal yüzey membranı, asidin geri difüzyonuna dirençlidir. Ayrıca, hücreler sıkı bileşenlerle birbirine tutunarak asit geçişini önlerler.
- b. Difüzyonla giren H⁺ iyonlarının dışarı atılması:** Epitel hücrelerinin bazolateral membranındaki fazla H⁺ iyonlarını hücre dışına atan

taşıyıcı sistemler özellikle mukozal kan akımında azalma durumunda bozulmaktadır.

- c. Epitelin antioksidan özellikleri:** Akut inflamasyonda marjinyasyona uğramış lökositler ve doku makrofajları serbest oksijen radikalleri serbestler. Epitelin bu maddelere bağlı hasarı engelleyen hücre koruyucu özelliği mevcuttur.

- 3. Epitel sonrası mekanizma:** Yüzey epitelinin altında yer alan kapiller ağ, epiteli aşan maddeleri hızla ortamdan uzaklaştırırken, aynı zamanda dokulara oksijen ve besin maddeleri sağlar. Mukozal kan akımında azalma kronikleşme sürecine bu sebeple katkıda bulunur.

Onarıcı Mekanizmalar:

- 1. Epitel hücre göçü:** Epitel hücre hasarı olduğu zaman devreye giren onarıcı mekanizmaların ilki epitel hücre göçüdür. Etraftaki sağlam epitel hücreleri dakikalar gibi kısa bir sürede bazal membran üzerinden kayarak boşluk olan bölgeye göç ederler ve birbirleriyle sıkı bileşkeler oluşturarak epitel bütünlüğünü yeniden meydana getirirler.
- 2. Hücre replikasyonu:** Hücre göçünü takiben hücrelerin yerine yeni epitel hücreleri hızla rejenere olurlar (2-4 gün).
- 3. Yara iyileşmesi:** Hücre göçü ve epitel hücre replikasyonu için sağlam bir bazal membran gereklidir. Koruyucu mekanizmalar hücre yıkımıyla baş edemeyince, bazal membranda da yıkım oluşur. Bu tip lezyonlar sık olarak gelişir ve hızla yenilenir. Mukozal yara iyileşmesi klasik yara iyileşmesine benzer ve fibrinoid nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hücresel debrisin rezorpsiyonu, yeni damar oluşumu, ekstraselüler matriks rejenerasyonu, epitel hücre göçü ve doku remodelingi aşamalarını içerir. Mukozal lezyonların, kronik ülser dönüşmesi ancak bu aşamalar bozulursa gerçekleşir (Friedman ve Marvin, 2006; Tözün ve Şimşek, 2007).

Bunların dışında bir de gastrik mukozanın sindirilmesini engelleyen mekanizmalar mevcuttur (Quan ve Talley, 2002; Özden, 2004; Robbins ve ark., 2007). Bunlar arasında;

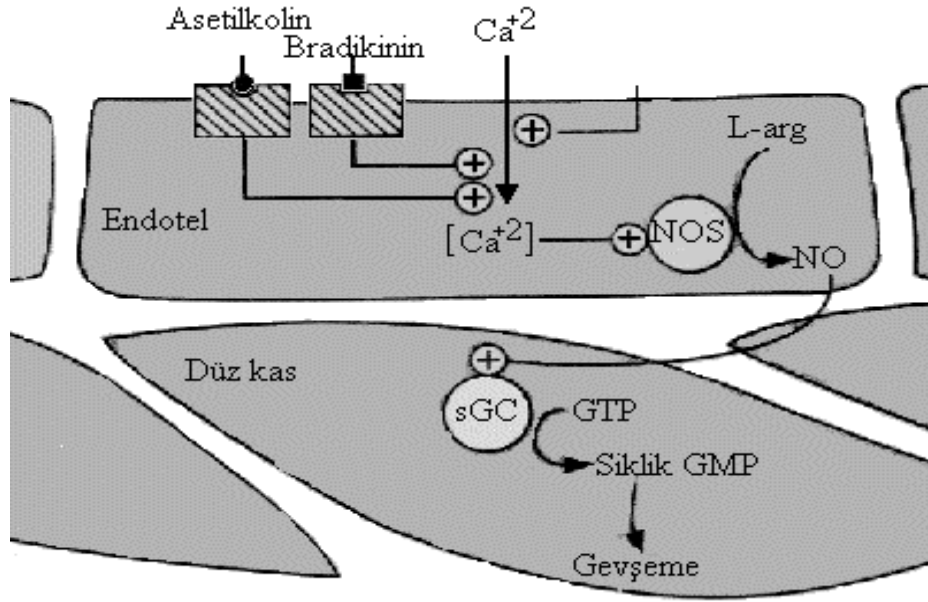
- a. Yüzey epiteli hücrelerinden müküs salgılanması,
- b. Dengelenmiş bir yüzey mikroçevresi yaratmak amacıyla, yüzeydeki müküs içerisine bikarbonat salgılanması,
- c. Gastrik yarıklardan salgılanan asit ve pepsin içeren sıvının yüzey mukus tabakasından geçerken yüzey epitel hücreleri ile direkt kontakt halinde olmaması,
- d. Gastrik epitelin hızlı rejenerasyonu,
- e. Lümen den mukoza içine geriye difüze olan hidrojen iyonlarını bölgeden uzaklaştıran ve yüksek hücre sel metabolik ve rejeneratif aktivitenin devamını sağlayan güçlü kan akımı,
- f. Mukozal kan akımının devamına yardımcı olan prostagandinlerin mukozadaki varlığı sayılabilir.

4.1.5.1 Gastrik Ülser Patogene zinde Nitrik Oksit'in Rolü

Nitrik Oksit (NO) sağlıklı endotel hücrelerden salınan ve vasküler tonus düzenlenmesinde etkili bir medyatördür. Endotel kaynaklı gevşetici faktörlerin en önemlisi olan NO, çeşitli uyarılara yanıt olarak salınan bir maddedir. Vücutta damar endoteli dışında beyin, makrofaj, üriner sistem gibi dokularda da izole edilmiştir. Şekil 1'de gösterildiği gibi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi arjinin ve oksijenden; inorganik nitratın indirgenmesi ile NO sentezler (Türköz ve ark., 1997). NO sadece kanda 6 saniyelik bir yarı ömre sahiptir ve asıl etkisini serbestlendiği dokuda gösterir. (Guyton Hall 12. Baskı sayfa 195).

NO endotel hücrelerinden başka birçok hücre tarafından da sentezlenmekte olup vasküler tonus regülasyonuna ek olarak nöronal aşırım, immun yanıt ve hücre sel adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda da önemli rol oynamaktadır (Atalık ve Doğan, 1997). NO lipofilik bir maddedir; böylece vasküler endotelden

kolayca düz kas hücrelerine geçer ve guanilat siklaz enzimine bağlanır. Bu enzimin aktifleşmesiyle birlikte kas hücrelerinde siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyesi yükselir ve kas hücrelerinde gevşemeye; trombosit adezyon ve agregasyonun inhibe olmasına sebebiyet verir (Moncada ve Higgs, 1993) (Şekil 1). NO vasküler tonusun sağlanmasına ek olarak trombosit aktivasyonunun engellenmesinde, endotele lökosit adezyonunun limitasyonunda ve kalp kası kontraktilesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. NO fibroblastlarda ve düz kas hücre kültüründe mitozu inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu sebeple yapılan çalışmalarda NO yoksunluğunda hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabet gibi hastalıkların daha hızlı geliştiği gözlenmiştir (Busse ve Fleming, 1996) NO seçici ve etkili bir şekilde pulmoner vazodilatasyon sağlamaktadır (Kinsella ve Abman, 1993). Bunların dışında NO sentezi beyinde belirli nöronlarda gösterilmiş ve bu molekülün nörotransmitter fonksiyonunun da olabileceği düşünülmüştür (Bredt ve Snyder, 1992). Gastrointestinal sistemde nöronlar ve pleksuslarda NOS enziminin bulunması NO'nun bu bölgede gevşetici tonusa katkı sağladığını göstermiştir (Anggard, 1994). İmmun sistemle ilgili çalışmalara bakıldığında makrofajların kanser hücrelerini öldürme kabiliyetleri gibi sitotoksik etkiler için NO'ya ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. Akut ve kronik inflamasyonda NO'nun önemi büyüktür. Makrofajların inflamasyon alanında fazla miktarda NO sentezleyip salıverdiği ve bu şekilde enfektif organizmalar ve parazitler üzerinde öldürücü etkilere aracılık ettiği gösterilmiştir (Edwards, 1995). Makrofajların spesifik sitokinlerle aktivasyonu, NOS'un indüksiyonu ve NO sentez edilmesine neden olmaktadır. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- γ veya yüksek konsantrasyonda lipopolisakkaritle uyarılan makrofajlar yüksek oranda NO üretir ve yabancı hücrelerde sitostatik veya sitotoksik etki oluştururlar (Candan ve ark., 1996).



Şekil 1. NOS'un aktive edilmesi ve NO sentezi.

Kaynak: Moncada ve Higgs, 1993'den uyarlanmıştır.

Aktivasyon olmayan durumlarda makrofajlarda NOS bulunmaz. L-Arjinin ve NO yolunun aktive edilmesi, saatlerce hatta günlerce süren NO sentezine neden olabilir. Fakat fazla sentez edilmesi hücreler için zararlı etkiler oluşturabilir (Lowenstein ve ark., 1994). NO birçok patojen ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonun, glikolizin ve TCA siklusunun demir içeren bazı enzimlerini inhibe etmekte ve sonuç olarak mikrobiyal ajanları veya kanser hücrelerini yok etmektedir (Zhang ve Snyder, 1992; Taylor-Robinson ve ark., 1996). NO yine hedef hücrelerde DNA yapımında hız kısıtlayıcı enzim olan ribonükleotid redüktazı bloke ederek sitotoksik etki oluşturmaktadır (Kwon ve ark., 1991). NO gastrik mukozanın bütünlüğünün devamında nöropeptit ve prostaglandinler ile ilişkilidir. NO sentezinin tek başına inhibisyonu ülser oluşumuna neden olmamakla birlikte indometazin gibi ajanların ülser yapmayan dozlarının bile NO inhibisyonu ile birlikte kombine edilmesi gastrik hasara neden olabilir. NO serbest radikal süpürücü olarak rol oynar. Ancak yüksek miktarda NO'nun vasküler sistemde sitotoksik etki gösterebileceği ve hemorajik olaylara neden olabileceği ifade edilmektedir (Calatayud ve ark., 2001). NO'nun mukozal hasar üzerine koruyucu etkisi, serbest

radikal detoksifikasyonu, lökosit adezyonunun önlenmesi ve mikrosirkülasyon hemodinamisini düzenlemesi ile ilgilidir. Vasküler endotelde nötrofil adezyonu ve damar lümeninden migrasyonu NO tarafından inhibe edilmektedir (Kubes ve ark., 1991). iNOS aktivitesinin intestinal inflamasyon üzerinde bir antiinflamatuvar etki gösterdiği bilinmektedir (McCafferty ve ark., 1997). Bununla birlikte NO ve süperoksitlerin kimyasal reaksiyonu ile üretilen peroksinitritler gastrointestinal mukozada bariyer disfonksiyonuna neden olmaktadır (Greenacre ve ark., 2001).

4.1.5.2 Gastrik Ülser Patogenezinde Potasyum Kanallarının Rolü

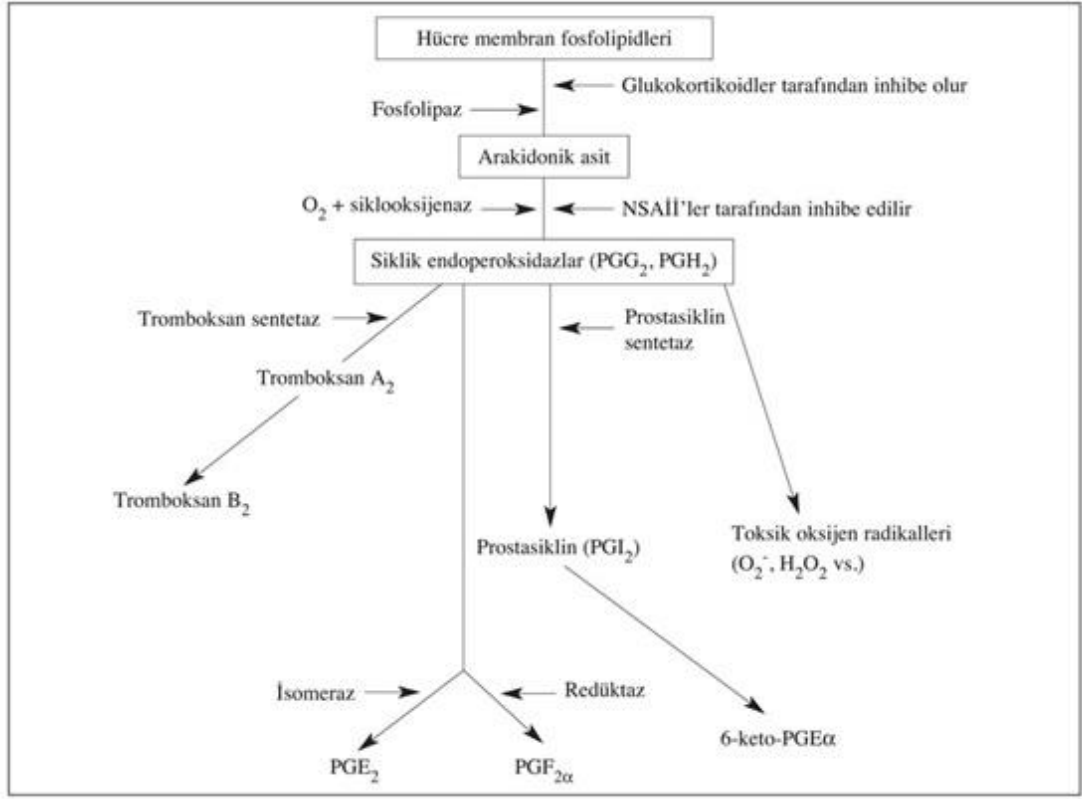
İyon kanalları hücre fiziolojisinde önemli bir role sahiptir bu sebeple kanal fonksiyonunda görülen bir aksaklık hastalıklara neden olabilmektedir. Mide mukozasında adenozin trifosfat (ATP) duyarlı potasyum kanallarının açılmasının bikarbonat ve müküs sekresyonunu uyardığı, mukozal kan akımını sağlayıp asit sekresyonunu önlediği bildirilmiştir (Rainsford, 1978; Garcia ve ark., 1997). ATP bağımlı potasyum kanallarının midede kan akımı düzenlenmesi, asit sekresyonu ve gastrik mukozanın kas kontraktilesiyle ilişkilidir (Toroudi ve ark., 1999). Benzer şekilde yapılan başka çalışmalarda potasyum kanallarının katılımıyla gastrik mukozal koruma modellerinden bahsedilmiştir (Peskar ve ark., 2002; Gomes ve ark., 2006). Literatürde NO ve siklik guanozin monofosfatın potasyum kanal aktivasyonu sağladığı yönünde çalışmalar olduğu gibi; potasyum kanallarının prostaglandin aracılı etki göstererek gastrointestinal mukoza koruyucu rol oynadığını belirten çalışmalar mevcuttur (Archer ve ark., 1994; Thiemermann ve Zacharowski, 2000). Sıçan gastrik mukozasında indometazinin hasar verici etkisinin ATP bağımlı potasyum kanal inhibitörü glibenklamid ile daha da arttığı bildirilmiştir (Akar ve ark., 1999). Başka bir çalışmada asidifiye etanol ile oluşturulmuş mukozal hipereminin glibenklamid ile azaldığı gösterilmiş ve bu durum gastrik mukoza aferent sinir uçlarından salınan endojen kalsitonin gen ilişkili peptidin vazodilatör etkisindeki azalmayla arteriyol seviyesinde ilişkilendirilmiştir (Iwata ve ark., 1997).

4.1.5.3 Gastrik Ülser Patogenezinde Sülfidril Gruplarının Rolü

Protein olmayan sülfidril grupları gastrik mukoza bütünlüğünün sağlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda ortaya çıkan serbest radikalleri bağlayarak müküsün yapısını ve üretimini kontrolünde yardımcı olmaktadır (Andreo ve ark., 2006). Sülfidril grupları mukoza alt üniteleri arasında disülfid bağları oluşturarak ayrışmalarını önlemektedirler (Tsukimi ve Okabe, 2001). Bu birimler arasındaki bağlarda ayrışma olduğu zaman müküs daha çözülebilir bir yapıya dönüşerek mukozanın hasara daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır (Avila ve ark., 1996). Yapılmış bir çalışmada ortamdaki sülfidril gruplarındaki artış oksijen kaynaklı serbest radikallerin temizlenmesiyle ilişkilendirilmiş ve bu da akut gastrik mukozal hasarda iyileşmeyi uyarmaktadır (Whittle, 1989). Glavin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada protein olmayan sülfidril gruplarının gastrik dokudaki koruyucu etkisini kimyasal uyarılı vasküler hasarı azaltıp; gastrik mukozal kan akımını arttırıp vasküler koruma sağlayarak oluşturduğu bildirilmiştir (Glavin ve ark., 1992).

4.1.5.4 Gastrik Ülser Patogenezinde Prostaglandinlerin Rolü

Prostaglandinler prostanoik asit türevidir. Prostanoik asit, özellikle insan ve diğer memelilerde araşidonik asitten oluşur. Prostaglandin oluşumunda kullanılan yağ asitlerinin başlıca kaynağı hücre zarı fosfolipitleri, daha az olarak da diğer lipit bileşikleridir. Şekil 2’de gösterildiği gibi hücre zarı fosfolipitlerindeki araşidonik asit, fosfolipaz A2 enzimi etkisi ile serbest hale gelir. Serbest hale geçen araşidonik asit ise hemen siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimi ile alt ürünlerine dönüşür (Curtis-Prior, 1976)



Şekil 2. Araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz enzim yolu.

Kaynak: Curtis-Prior, 1976'dan uyarlanmıştır.

Sıçanda mide duvarı, özellikle de müköler tabaka prostasiniklinin ana kaynağını oluşturmaktadır. Prostasiniklin, gastrik mukozal kan akımı üzerine olan etkisinden bağımsız olarak gastrik asit sekresyonu üzerine güçlü inhibitör etkisi olan bir maddedir. Ayrıca, gastrik mukozada sentezlenen PGİ2 ve PGE2 ile yapılan çalışmada, gastrik mukozaya hafif şiddette iritan ön tedavisi uygulanmasının, PGİ2 ve PGE2 mukozal sentezini arttırdığı ve dolayısıyla endojen PG'nin adaptif sitolojik koruma mekanizmasında rolü olduğu tespit edilmiştir. (Zengil ve ark., 1986; Brzowski ve Konturek, 2005). Prostaglandinler ekzojen olarak uygulandığında; etanol, hiperosmolar solüsyonlar, güçlü asitler (0,6N HCl gibi), bazlar (0,2N NaOH gibi), ve konsantre safra gibi nekrotizan maddelerin sebep olduğu mukozal hasarın önlenmesinde etkili olabilecekleri bildirilmiş, bu ajanların gastrik müküs ve bikarbonat salgıları üzerindeki uyarıcı etkileri, gastrik mikrodolaşımdaki artış ve mukozal sülfidril bileşiklerinin miktarının yükselmesi, bu durumun açıklanması yönünde ileri sürülen sonuçlardandır (Hawkey ve Rampton, 2002 ; Brzowski ve

Konturek, 2005). Yapılan deneylerde PG'lerin bikarbonat salınımını uyardığı saptanmıştır. PG sentezini inhibe eden indometazin, bu bikarbonat yanıtını ortadan kaldırmaktadır. Yani PG'ler intralüminal aside karşı bikarbonat salınımının ayarlanmasında rol oynamaktadırlar. PG'ler, müküs sentezini ve gastrik sıvı içine müküs salınmasını uyarırlar (Wallace ve Ritchie, 1989).

Prostaglandinler genelde bütün damarları genişletir ve kan basıncını düşürür. Damar düz kaslarına doğrudan doğruya etki ettikleri gibi adrenerjik sinir uçlarında norepinefrin salınımını azaltarak dolaylı olarak damar genişlemesine neden olabilirler. Böylece hem periferik damarları genişletme, hem de böbreklerden fazla sodyum iyonlarının uzaklaştırılmasına neden olduğu için kan basıncını azaltır (Beierwaltes ve ark., 1980; Adams, 1988). PGİ2 başta olmak üzere PGE1 ve PGF1C damar iç yüzeyindeki hücrelerde adenilat siklaz enzimini stimule etmek ve hücrelerde siklik AMP düzeyini yükseltmek suretiyle kan hücrelerinin birbirine yapışarak kümeleşmesini (agregasyon) engeller. Aynı zamanda PGİ2 kan hücrelerinin damar endoteline yapışmasını da (adezyon) engeller (Horton, 1969; Kadowitz ve ark., 1975). Böbrek damarlarında daha çok PGİ2; interstisyel doku, distal tübülüs ve toplayıcı kanal epitelinde ise PGE2 oluşur. PGİ2 ve PGE2 güçlü bir biçimde böbrek damarlarını genişleterek damar direncini azaltır ve böbrekte kan akışını artırır (Challis ve Olson, 1988). Alınan besinler, histamin, gastrin, kafein, insülin ve vagus sinirinin uyarılması ile midede oluşan hidroklorik asit (HCl) salınımı PGA1, PGE1, PGE2 ve PGİ2 etkisi ile azalır. Aksi yönde, mide ve ince bağırsakların müküs salgısı ve pankreasın dış salgısı artar. PGE1 ve PGE2 bronş düz kaslarını gevşetir ve bronşları genişletir. Enfeksiyon hastalıklarında bakterilerin saldıdığı ateş yapan (pirojen) maddeler PGE2 oluşumunu artırarak, hipotalamustaki ısı düzenleyen merkeze etki ettiği düşünülmektedir. Aspirin ve benzeri ilaçlar prostaglandin oluşumunu azaltarak ateşi düşürür. Prostaglandinler ağrı duyusunu ileten sinirler üzerine doğrudan doğruya uyarı yaparak değil, duyu reseptörlerinin uyarıcı maddeler (bradikinin gibi) karşısında eşiğini düşürmek suretiyle ağrıya neden olmaktadır (Horton, 1969; Gündüz, 1977; Kayaalp, 1986; Adams, 1988).

4.2 Vitamin D (1,25 Dihidroksi Vitamin D3)

Vitamin D, güneş ışığı ile temas sonucu deride üretilen, yağda çözünen, sekosteroid yapıda bir prohormondur. Vücutta çeşitli metabolik değişikliklerle kalsitriol olarak bilinen, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında önemli rol oynayan bir hormona dönüşür.

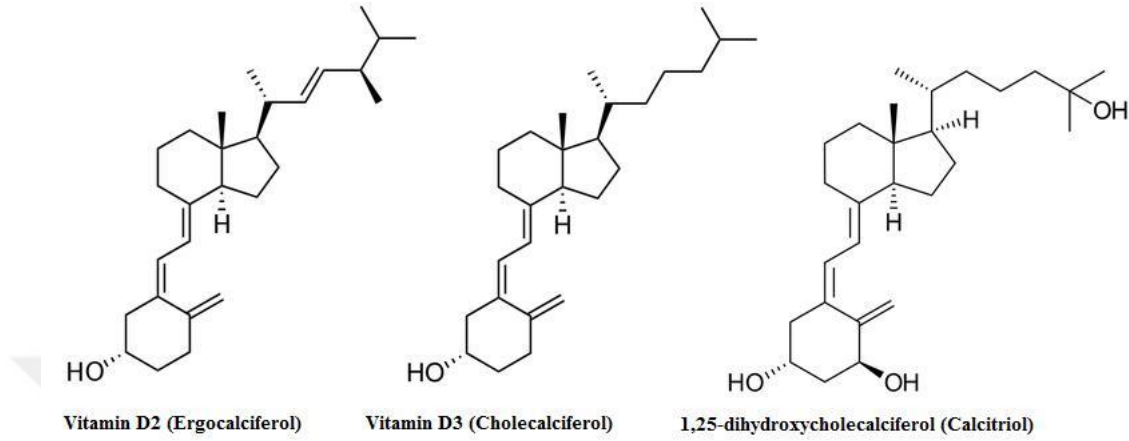
4.2.1 Vitamin D'nin Sentezi ve Yapısı

Vitamin D yağda çözünen bir vitamin; sekosteroid yapıda bir prohormondur. Vitamin D'nin bilinen 5 farklı tipi bulunmaktadır fakat bunlardan sadece iki tanesi (Vitamin D2 ve D3) aktiftir (Şekil 3).

- Vitamin D1 (ergokalsiferol + lumisterol)
- Vitamin D2 (ergokalsiferol)
- Vitamin D3 (kolekalsiferol)
- Vitamin D4 (22-dihidroergokalsiferol)
- Vitamin D5 (sitokalsiferol)

Vitamin D (VD) diyet yoluyla alınır (Vitamin D2) veya epidermiste mevcut bulunan provitamin D3, 7-dehidrokolekalsiferolden (7 DHCC) fotosentez yoluyla oluşur. Pro Vitamin D3 (ProVD3) biyolojik olarak aktif değildir. ProVD3 bir previtamin olan PreVitamin D3'e (PreVD3) güneşin ultraviyole ışınlarına maruziyetiyle fotolize edilir. Bu madde de biyolojik olarak aktif değildir. Solar spektrumun 290-315 nm dalga boyundaki UV ışınları atmosferden geçerek, derinin, epidermal proVD3'ün, preVD3'e fotokimyasal dönüşümünü sağlayacak olan (ProVD3 depolarının %8'ini içeren) epidermisteki stratum spinosum ve stratum bazalis tabakalarına ulaşır, 30 dakikada preVD3 bu iki tabakada nonenzimatik olarak oluşur (Holick, 1994). Dermisin birim santimetrekare alanında, her ne kadar epidermisteki kadar ProVD3 varsa da, UVR 290-315 nm boyutundaki ışınlar, epidermis tarafından absorbe edilir, dolayısıyla dermiste çok az miktarda PreVD3

yapılır. Deride PreVD3 oluşturulunca, tekrar nonenzimatik olarak hemen termal izomerizasyona uğrar ve vitamin D3'e (VD3) dönüşür (Holick, 2008).



Şekil 3. Vitamin D'nin moleküler yapısı.

Kaynak: examine.com/supplements/vitamin-d sitesinden uyarlanmıştır.

VD3 epidermiste oluştuğunda, dermo-epidermal bileşkedeki dolaşıma taşınır; yüksek affinitesi nedeniyle hemen dolaşımdaki vitamin D bağlayıcı proteine (VDBP) ve proteinlerden albumin süper ailesine mensup olanlara bağlanır. Deriden gelen VD3 ile diyetle gastrointestinal sistemden vücuda giren VD2 biyolojik olarak inaktiftirler ve kana geçtiklerinde önce karaciğer parankiminde yüksek kapasiteli sitokrom P450'lerden, 25 hidroksilaz enzimi aracılığıyla 25 hidroksivitamin D3 (25OHD3)'e dönüşür. Bu mikrozomal enzim CYP2R1'in substrat olarak en çok VD'ye affinitesi vardır. Memelilerde bu basamağın güçlü bir düzenleyicisi yoktur ve karaciğerde 25OHD3'ün depolanması yapılmaz ve karaciğerden hemen kana salıverilir; serumda biyolojik yarı ömrü 12-19 gün kadardır. 25OHD3 serumda bol miktarda mevcut en stabil metabolittir ve VD'nin serumdaki en iyi göstergesidir. 25OHD3 daha sonra böbrekte mitokondriyal CYP27B1 hidroksilaz (1 α hidroksilaz enzimi) ile aktif hormon olan 1,25 dihidroksi VD3'e (1,25 (OH) $_2$ D3 = Kalsitriol); gıdalarla alınan VD2 (ergosterol) 1,25 dihidroksi VD2'ye (1,25(OH) $_2$ D2= Kalsidiol) dönüşür. Böbrekteki CYP27B1 hidroksilaz enzim düzeyi, parathormon (PTH)

tarafından kontrol edilir, PTH'nin sentezi serumdaki kalsiyum (Ca^{++}) ve fosfor (P) ile regüle edilir, ayrıca hipokalsemi, hipofosfatemi, büyüme hormonu, prolaktin tarafından da bu enzim uyarılır. Osteositlerden kemikte salgılanan fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF-23), Ca^{++} mobilizasyonunu sağlamak üzere artmış olan PTH ve CYP27B1 hidroksilaz gene ekspresyonunu azaltarak 1,25(OH)2D3 sentezini baskılar. Bu enzim, vitamin D reseptörüne çok yüksek affiniteli bir ligand olup, hedef dokularda 1,25(OH)2D3'ün yönlendirildiği genlerin ekspresyonunu değiştirir (Trang ve ark., 1998).

25(OH) D3, D vitamininin dolaşımdaki asıl formudur. İnaktif olan bu formun konsantrasyonu 1,25(OH)2D3'ün yaklaşık 1000 katıdır. D vitamini sentezinde kilit konumda olan 1 α hidroksilaz enzim aktivitesinin düzenlenmesinde PTH, kalsiyum, fosfor ve FGF 23 rol oynar. Serum kalsiyum ve fosfor düzeylerinin düşmesi ve PTH düzeyi D vitamini üretimini artırır. Ancak, kemikten salınan FGF 23 ise 1,25(OH)2D3 sentezini baskılar ve 24-hidroksilaz enzimini aktive ederek 1,25(OH)2D3'ün inaktif forma dönüşmesine neden olur (Öngen ve ark., 2008; Holick, 2007).

Vitamin D3 ya insan epidermisinde sentezlenmiş olabilir, ya da balık yağı, zenginleştirilmiş besinler ya da suplementlerden alınır (Whayne, 2011) . Aslında vitamin D hem D2 hem de D3'ü ifade eder. D vitamini endojen olarak sentezlenebilmesinin yanısıra diyetle de alınabilmektedir (Öngen ve ark., 2008). Endojen olarak epidermiste prekürsör olan 7 dehidrokolesterol, güneş ışığı maruziyeti ile aktive olur ve PreD3'ü oluşturur. Bu açıdan UVB ışınları çoğu insan için vitamin D'nin ana kaynağıdır (Heath ve Elovic, 2006). Aşırı PreD3 veya vitamin D3 güneş ışığı tarafından zarar gördüğü ve inaktif ürünlerine çevrildiği için, güneş ışığına fazla maruz kalınması vitamin D3 intoksikasyonuna neden olmaz. Vitamin D'nin diyetle alımı ise sınırlıdır. Diyetle D vitamini en fazla somon, uskumru, sardalya gibi yağlı balıklar ve yumurta sarısında bulunmaktadır. D vitamini diyetle, bitkilerde bulunan ergokalsiferol (D2 vitamini) ve hayvan dokularında bulunan kolekalsiferol (D3 vitamini) olmak üzere iki şekilde alınır (Öngen ve ark., 2008). Diyetle alınan VD2 ve VD3 formları ince bağırsaklar tarafından emildikten sonra, şilomikronlar ile birleşip lenfatik sisteme oradan da venöz dolaşıma geçmektedir.

Diyetle alınan veya endojen olarak sentezlenen vitamin D2 veya vitamin D3 yağ hücrelerinde depo edilir ve gerektiğinde dolaşıma verilir (Holick, 2008).

4.2.2 Vitamin D'nin Etki Mekanizması

Yakın zamanlara kadar aktif VD hedef organlarının sadece bağırsak, böbrek ve kemik olduğu sanılıyordu. Bütün bu organlarda net etkisi, mineral metabolizmasını, özellikle Ca^{++} ve inorganik P dengesini sağlamaktır. Kalsitriole ait doku biyolojik etkileri, ya genomik ya da nongenomik yollarla olur. Genomik yanıtlar nükleer VD reseptörü ile olur, nongenomik yolak voltaja bağımlı Ca^{++} kanalları aracılığıyla gerçekleşir; bunlar uygun sinyal iletim yolları ile biyolojik cevapları başlatırlar. Vitamin D reseptörü (VDR)'nün bugün 30'dan daha fazla dokuda bulunduğu bilinmektedir. Endotel, düz kas, kalp kası, beyin, prostat, meme, kolon hücreleri, immün hücreler bunlar arasındadır (Nemere ve Carson, 1998; Norman, 1998 ; De Luca ve Cantorna, 2001). Dolaşımdaki 1,25(OH)2D3 hücre membranlarını ve sitoplazmayı geçer; nükleusa ulaşır, bir steroid hormon gibi VDR'ye bağlanır. 1,25(OH)2D3 nükleer retinoik asit reseptörüne bağlanınca, nükleer transkripsiyon faktörü görevi görür ve genlerin fonksiyonunu ve protein sentezini başlatır. Kalsitriol tarafından düzenlendiği anlaşılan genlerin sayıları giderek artmaktadır. Kalsiyum ve kemikle ilgili genler yanında, hücre siklusları veya hümmoral mekanizmalarla (örneğin immün veya hematopoietik sistem) ile ilgili birçok gen kalsitriole bağımlıdır. Kalsitriol direkt veya indirekt olarak 200 kadar geni regüle eder. Bu arada böbrekten renin, pankreastan insülin, makrofajlardan katelisinidin üretimini, lenfositlerden sitokin serbestlenmesini, kardiyomiyositler ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon ve büyümesini düzenler. Önceleri, normal şartlar altında 25OHD3'ün 1α hidroksilasyonunun sadece böbrekte yapılabildiği ve 1,25(OH)2D3'ün mineral metabolizmasını kontrol ettiği düşünölmekteydi. Oysa bugün 1,25(OH)2D3'ün lokal olarak çeşitli dokularda otokrin veya parakrin şekilde (keratinositler, kolon ve prostat hücreleri, solunum sisteminin epitel hücreleri de dahil olmak üzere, birçok böbrek dışı dokularda) oluştuğunu bilmekteyiz. Bu dokularda 1,25(OH)2D3, hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonu ile ilgili anahtar olayları kontrol eder (Bouillon ve ark., 1998). Sitolik kalsitriol-VDR kompleksinin de novo mRNA ve protein sentezini başlatması saatler veya günler sürebilir. Oysa kalsitriolün çeşitli dokularda

hem hücresel hem de subseleler seviyede çok kısa zamanda oluşan etkileri de olduğu anlaşılmıştır (Norman, 1998). Bu etkileri genomda reseptör-hormon etkileşimi ile açıklamak mümkün değildir. Birçok hücre serilerinde dakikalar içinde spesifik intraselüler metabolik yolların aktivasyonunu oluşturan, membrana bağlı VDR de tanımlanmıştır. İyonize Ca ile oluşan kas kasılmaları, sinir uyarı iletimleri ve diğer ani oluşan, gereğinde hayat kurtaran diğer fizyolojik olaylar bu yolak vasıtasıyla gelişmektedir (Barger ve ark., 1995).

4.2.3 Vitamin D'nin Fonksiyonları ve İnflamasyonla İlişkisi

1,25(OH)2D3'ün majör fonksiyonu plazma kalsiyum seviyesini düzenlemektir. Duodenumdan kalsiyum ve ileumdan fosfor emilimini artırır (Öngen ve ark., 2008). D vitamini olmadığında diyetdeki kalsiyumun ancak %10-15'i ve fosforun ise %60'ı emilebilmektedir (Harvey ve Champe, 2007). Vitamin D olduğunda ise bu oran kalsiyum için %30-40, fosfor için %80'e çıkar. 1,25(OH)2D3 plazma kalsiyum seviyesinin devamı için 1,25(OH)2D3 böbrekten kalsiyum atılımını azaltır. 1,25(OH)2D3'ün diğer görevleri arasında kemik rezorbsiyonunu arttırmak, PTH sentez ve salınımını azaltmak, insülin yapımını arttırmak, renin sentezini azaltmak, miyokardiyal kontraktiliteyi arttırmak bulunur. Aynı zamanda 1,25(OH)2D3, T lenfositleri aktive ederek sitokin salınımı, B lenfositleri aktive ederek immünglobulin sentezini arttıran katherisidin denen bir maddenin yapımını sağlayarak immünmodülatör olarak fonksiyon görür (Holick, 2007; Öngen ve ark., 2008).

Son yıllarda birçok hücrede VD varlığı gösterilmiştir. Bunlar arasında bağırsak hücreleri, kolon enterositleri, karaciğer hücreleri, osteoblastlar, kondrositler, prostat, plasenta, meme, over, hipofiz, pankreas, kas, distal renal hücreler, deri fibroblast ve keratinositleri, epidermal hücreler, aortik endotel hücreleri, dolaşımdaki immün hücreler (monositler, transforme olmuş B hücreleri, aktive olmuş T hücreleri gibi) nöronlar ve beyin sayılabilir ve 1,25(OH)2D3 bu dokularda etkili olur. Ayrıca, bazı doku ve hücreler 25(OH)2D3 1- α hidroksilaz enzimini eksprese ederler. Direkt veya indirekt olarak 1,25(OH)2D3, 200'den fazla geni kontrol eder. Bu genler arasında hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu, apoptozisi ve anjiyogenezisi kontrol

eden genlerde bulunmaktadır. VD hücre proliferasyonunu normal ve kanser hücrelerinde azaltır ve terminal değişimlerini sağlar (Sözen, 2011). Aktive 1,25(OH)2D3 renin-anjiotensin sistemindeki düzenleme ile direkt olarak renin gen ekspresyonunu baskılar. Yeterli vitamin D seviyesi renin-anjiotensin-aldosteron sisteminin down regülasyonunu ile hipertansiyon gelişimini azaltır (Wang ve ark., 2008). Vitamin D'nin vasküler etkileri geniş kapsamlı olmakla birlikte düz kas hücre proliferasyonu, inflamasyonu ve trombozun düzenlenmesini içerir. Antiinflamatuvar etkiyle, makrofajların köpük hücrelerine dönüşümünü durdurarak damar duvarını korur. Aterosklerotik hastalığı baskılar ve trombogenezini azaltır (Thamas ve ark., 2012). D vitamini, insülin direnci ve tip 2 diyabet patogenezinde yer alan insülin duyarlılığı ve beta hücre fonksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Sung ve ark., 2012). 1,25(OH)2D3, kanser hücrelerinde çoğalmayı önleyen en potent inhibitörlerden biridir. Ayrıca aktive olan T ve B hücrelerin fonksiyonunu düzenlemektedir. Bilinen etkilerinin dışında vitamin D immün sistemde için de gereklidir. Vitamin D'nin T hücreleri, interferonlar, interlökinler ve sitokinler gibi immün sistemin çoğu ara elemanına olan etkileri daha önce gösterilmiştir. Vitamin D pankreas hücrelerinden insülin sekresyonunu artırmaktadır (Hollick, 2005). 1,25(OH)2D3 güçlü bir immünmodülatördür.

Yakın zamanlı insan araştırmaları VD sitokin sisteminin, antimikrobiyal peptidlerin monosit-makrofaj sisteminden jenerasyonunda gerekli olan bir ara madde olduğu olasılığını gündeme getirmiştir (Liu ve ark., 2006). İnsan monosit-makrofajlardaki yapılan çalışmalarda bugün, monosit-makrofaj Toll like reseptör (TLR) yolağının, patojenle ilişkili membran örneklerinin (PAMP) aktivasyonu, bu hücrelerde CYP27B1 hidroksilaz ve VDR genlerinin ekspresyonunu başlatır (Adams ve Hevison, 2008). Monositler ve makrofajlar lipopolisakkaritlerle karşılaştırıldıklarında, VDR genini ve 25(OH)2D3 CYP27B1 alfa hidroksilaz genini "up-regule" eder. Artmış 1,25(OH)2D3 yapımı, katelisin senteziyle sonlanır. Bu madde enfeksiyon ajanlarını tahrip edebilecek bir peptittir (Ginde ve ark., 2009). VDR, nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve VDR'nin mononükleer hücreler, dendritik hücreler, antijen sunan hücreler kadar, aktive T-B lenfositlerinde de bulunduğu gösterilmiştir. Primer lenfoid organlar (kemik iliği ve timus) immün sistemin geliştiği ve değişime uğradığı merkezlerdir ve buralarda VDR gösterilmiştir.

Sessiz CD4 hücreleri düşük konsantrasyonlarda VDR eksprese ederler, aktive olduklarında bu ekspresyon beş kat artar, 1,25(OH)2D3'ün kazanılmış, antijen spesifik immün yanıt üzerine etkisi T lenfosit proliferasyonunun inhibisyonu (özellikle Th1 kolu üzerine) ile karakterizedir. İn vitro, 1,25(OH)2D3, monositlerin, dendritik hücrelere değişimini ve T hücrelerinin bunlar üzerinde oluşturduğu uyarıcı aktiviteye müdahale eder. Dendritik hücre değişiminin ve IL-12 salgılanmasının en etkin bloke edicisi 1,25(OH)2D3'tür. Ayrıca 1,25(OH)2D3 fagositozu, makrofajlar tarafından bakteri öldürülüşünü uyarır; fakat dendritik hücrelerin ve makrofajların antijen sunma kapasitelerini baskılar; makrofajların, lenfositlerde antijen sunumunda hücre yüzeyinde MHC-II moleküllerinin ekspresyonunu azaltır (Ginde ve ark., 2009). Obez olmayan diyabetik sıçanlarda, yüksek doz 1,25(OH)2D3 immünmodülasyon ile diyabet başlamasını engellemektedir. Bu etki beta hücresi fonksiyonuna, inflamatuvar sitokinlerin (IL-6 ve TNF- α) yapacağı etkilerle ilgilidir. IL-6 insülin reseptör sinyal iletimini inhibe eder ve bu sitokinin uygulanması hiperglisemiye neden olur. Kronik olarak farmakolojik dozlardaki 1,25OHD3 uygulanması ise obez olmayan diyabetik sıçanlarda diyabet insidansını azaltır (Mathieu ve Badenhoop, 2005). Romatoid artrit, multipl skleroz ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi otoimmün hastalıkları olan kişilerdeki T hücreleri, immün sistemi bireylerin iç organları ve periferik dokularında inflamatuvar yanıt yaratmak üzere yönlendirirler. Miyeloid ve respiratuvar epitel hücrelerinde katelisidin ve TLR koreseptör CD14 eksprese edilirler ve her ikisini de kodlayan genlerin promotorlarında VDR yanıt elemanı vardır ve VD ile regüle edilirler (Hansdottir ve ark., 2008). VD eksikliğinin insülin direncine, pankreatik β hücre disfonksiyonuna ve metabolik sendroma yatkınlık yarattığı da saptanmıştır (Chiu ve ark., 2004). Bazı araştırmalar erişkin obezitesinin 25OHD3 düzeyleri ile ters orantılı olduğunu göstermiştir ve adipogenezin 1,25(OH)2D3 ile inhibe olduğu ileri sürülmüştür (Parikh ve ark., 2004).

Epidemiyolojik veriler koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, diyabet gibi hastalıkların, VD eksikliği gibi, ekvator bölgesinden uzaklaştıkça arttığını bize göstermektedir. Miyokard infarktüsü, inme, kalp yetmezliği, diyabetik kardiyovasküler hastalık ve periferik arter hastalığı olanlarda, düşük VD düzeyleri saptanmıştır. NHANES III çalışmasında 25OHD3 düzeylerinin hipertrigliseridemi,

diabetes mellitus, hipertansiyon ve obezite ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (Martins ve ark., 2007). Prospektif ve retrospektif epidemiyolojik çalışmalar, 25OHD3 düzeylerinin 20 ng/mL'nin altına indiğinde kolon, pankreas, prostat, meme kanseri insidansının %30- 50 ve bu kanserlere bağlı mortalitenin de arttığını göstermiştir. "Nurses Health Study" kolorektal kanserlerin ortanca serum 25OHD3 düzeyleri ile ters yönde ilişkili olduğunu göstermiştir (Fescanich ve ark., 2004). VD konsantrasyonlarının, lökositlerde telomer yıpranma hızını yavaşlatıp uzunluklarındaki kısalmayı engelleyip engellemediği, diyetteki VD konsantrasyonlarının artırılması ile araştırılmış, daha uzun lökosit telomerleri idamesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu bilimsel veri VD'nin yaşlanmayı geciktirebileceği ve yaşamı uzatabileceği ve/veya yaşlılıkla ilgili hastalıkları veya durumları geciktirebileceği şeklinde basit olarak ifade edilebilir (Richards ve ark., 2007).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma protokolü için Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (Ref no. 87.2014.mar, onay yazısı ekte sunulmuştur). Çalışma finansal olarak Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) (Proje no: SAG-C-DRP-100615-0253) tarafından desteklenmiştir.

5.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilen 250-300 gr ağırlığında her iki cinsiyetten Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 20-22 °C sıcaklıkta üçerli olarak kafeslerde rahat hareket edebilecekleri şekilde korunmuşlardır. Laboratuvarında 12 saat gündüz /12 saat gece ışık uygulanmış, deney başlangıcından sonuna kadar havalandırma ile diğer temizlik kurallarına dikkat edilmiş laboratuvar hayvanları bakım kılavuzlarına uygun olarak bakım yapılmıştır. Hayvanlara deney öncesi 24 saat açlık durumu hariç; su ve yem (standart laboratuvar yemi) *ad libitum* olarak sağlanmıştır.

5.2. Deney Grupları

Sıçanlar rastgele şekilde Tablo 1’de gösterildiği şekilde gruplara ayrılmıştır.

Tablo 1. Deney grupları

| Deney grupları | n |
|---------------------------------|----------|
| Kontrol grubu | 8 |
| Ülser grubu | 8 |
| Ülser + Tedavi grupları | |
| Vitamin D3 grubu | 8 |
| Vitamin D3 + L-NAME grubu | 8 |
| Vitamin D3 + NEM grubu | 8 |
| Vitamin D3 + İndometazin grubu | 8 |
| Vitamin D3 + Glibenklamid grubu | 8 |

5.3 Deney Protokolü

Randomize olarak gruplara ayrılan deney hayvanları kafeslerine ve laboratuvar ortamına alıştırdıktan sonra hem ülser modelinin doğruluğundan emin olmak hem de vitamin D3’ün etkin dozunu saptayabilmek için preliminere çalışmalar yapıldı. 0,3, 2,5 ve 25 µg/kg oral vitamin D3 (Devit-3 damla, Deva İlaç, Türkiye) ve intraperitoneal 0,25 µg/kg vitamin D3 (Calcijex ampul, Abbott, Türkiye) kullanılarak 3’er hayvanlık gruplar oluşturularak makroskopik skor parametresi üzerinden doz-yanıt çalışmaları yapıldı. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, intraperitoneal 0,25 µg/kg dozunda vitamin D3’ün etkin olduğuna karar verildi ve tüm deneyler için bu doz seçildi.

Vitamin D3 tedavisi gören gruplara 14 gün boyunca hergün aynı saatte vitamin D3 (0,25 µg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. 14. Gün geceden aç bırakılan sıçanlara tek başına vitamin D3 veya vitamin D3 ile birlikte aşağıdaki tedavi ajanları (vitamin D3'den 60 dakika önce) uygulandı:

- Non-selektif NOS inhibitörü L-NAME (20 mg/kg; intraperitoneal)
- Sülfidril gruplarının inhibitörü N-etilmaleimid (NEM) (10 mg/kg; intraperitoneal)
- ATP-sensitif K⁺ kanal blokörü glibenklamid (10 mg/kg; oral yolla)
- Non-selektif siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10 mg/kg; subkutan)

Bu tedavileri takiben 50 dakika sonra hayvanlara mide ülseri oluşturma protokolü uygulandı. Ek olarak, L-NAME, NEM, glibenklamid ve indometazin'in tek başına ülser üzerine etkileri de makroskopik olarak incelendi ve değerlendirildi. Bu amaçla, her grupta 4 sıçan olacak şekilde ajanlar yukarıdaki doz ve uygulama şekillerinde ülserden 50 dakika önce uygulandı.

5.4 Gastrik Ülser Modelinin Uygulanması

Ülser grubunu oluşturan sıçanlara 24 saat açlığı takiben orogastrik gavaj yoluyla 0,3 M HCl/%60 etanol karışımı (0,2 ml) uygulandı. Kontrol grubu hayvanlara aynı yolla aynı hacimde serum fizyolojik uygulandı. Tüm sıçanlar 0,3 M HCl/%60 etanol solüsyonu uygulamasından 60 dakika sonra dekapite edildi; gövde kanı toplandı ve mideleri eksize edildi. Büyük kurvatürden açılarak serum fizyolojik ile içeriğinden temizlenen mideler makroskopik olarak değerlendirildi ve daha sonra mide örneklerinin bir bölümü biyokimyasal analizler için -80°C'de saklandı, diğer bölümü de mikroskopik değerlendirmeler için %10'luk formaldehit çözeltisi içine alındı.

5.5 Mide Hasarının Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi

Çıkarılan mideler makroskopik olarak incelendi. Ülserlerin uzunlukları mm cinsinden ölçüldü ve toplanarak “ülser indeksi” şeklinde ifade edildi (Amirshahrokhi ve Khalili, 2014).

5.6 Doku Hasarının Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

Işık mikroskopik değerlendirmeler için mide dokuları %10'luk formaldehit ile fikse edildi, yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen ile şeffaflandırıldı ve parafine gömüldü. Yaklaşık 4 µm kalınlığındaki parafin kesitler hematoxilen ve eosin (H&E) ile boyandı. İnceleme ve fotoğraf çekimi dijital kamera (Olympus C-5060) eklentili fotomikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan) ile yapıldı. Gastrik hasar Tablo 2’de gösterilen histopatolojik kriterlere göre skorlandı (Toplam skor=12) (Özveri ve ark., 2001).

Tablo 2. Mide Lezyonlarını Mikroskopik Olarak Skorlama Kriterleri

| | Yok | Hafif | Orta | Şiddetli |
|--|-----|-------|------|----------|
| <i>Yüzey epitelinde ayrılma ve hasar</i> | 0 | 1 | 2 | 3 |
| <i>Kanama, fokal nekroz ve mukozal konjesyon</i> | 0 | 1 | 2 | 3 |
| <i>Glandüler epitelde genişleme ve glandüler epitel hücrelerinde hasar</i> | 0 | 1 | 2 | 3 |
| <i>İnflamatuvar hücre infiltrasyonu</i> | 0 | 1 | 2 | 3 |

5.7 Midede Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeyi Ölçümleri

Dokuda oksidan hasara bağlı lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyinin ve endojen antioksidan olan glutasyon (GSH) miktarının ölçüldüğü bu yöntemde mide örnekleri ağırlıklarınının 10 katına denk gelen

miktarda %10'luk triklorasetik asit (TCA) solüsyonu ile homojenizasyonunu takiben 3000 devir ve 4°C'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılıp 15000 devirde 8 dakika daha santrifüj edildi. MDA düzeyi spektrofotometrede 535 nm abzorbansta okunarak nmol/g cinsinden ifade edildi (Beuge ve Aust, 1978; Kurtel ve ark., 1992). Glutatyon ölçümlerinde, modifiye Ellman yöntemi kullanıldı ve GSH miktarı spektrofotometrik olarak 412 nm'de okunarak belirlendi (Beutler, 1975).

5.8 Midede Miyeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü

Dokuda nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü için, 0,2-0,5 gram ağırlığındaki mide örnekleri %0.5'lik hekzadesiltrimetilamonyum bromid (HETAB; 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH=6,0) 10 kez sulandırılıp homojenize edildikten sonra 12.000 devirde 10 dakika süreyle 4°C'de santrifüje edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet, aynı hacimde %0.5'lik HETAB içeren 50 mM K₂HPO₄ ile yeniden homojenize edilip daha sonra o-dianisidin 2HCl (20 mg/ml) + H₂O₂ (20 mM) + pellet olacak şekilde oda ısısında 3 dakika inkübe edildi. Reaksiyon %2'lik sodyum azid ile durdurulduktan sonra abzorban değerleri spektrofotometrik olarak 460 nm'de okundu (Bradley ve ark., 1982).

5.9 Midede Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü

Dokuda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidin foto-oksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçülmektedir. Riboflavin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'nin etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. H₂O₂ ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Mylorie ve ark., 1986). Deney için gerekli çözeltiler aşağıda belirtildiği gibidir:

- **Fosfat tamponu (50 mM, pH = 7,8):** 0,136 gr KH_2PO_4 ve 0,697 gr K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH=7,8'e ayarlanır ve 2 °C'de saklanır).
- **Fosfat tamponu + 0,1 mM Na-EDTA:** 0,0037 gr Na-EDTA tartılır ve 50 mM'lık fosfat tamponunda çözülür ve hacmi 50 mM'lık fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.
- **Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH=7,5):** 0,041 gr KH_2PO_4 ve 0,122 gr K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH=7,5'e ayarlanır ve 2 °C'de saklanır).
- **Riboflavin (0,2 mM):** 7,5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (10 mM, pH=7,5) çözülür.
- **o- dianisin (6 mM):** 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözülür.

Deneyin yapılışı sırasında %10 gr doku homojenti 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alındı. Her tüpe 30 saniye ara ile 0,2 ml riboflavin konuldu ve karıştırıldı. 460 nm'de abzorban okundu. Floresans lamba 20 dakika önceden açılıp ve ısınması sağlandı. Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W Floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dakika inkübe edildi. 460 nm'de abzorban okunduktan sonra süpernatantın SOD aktivitesi (U/mg protein/dak) cinsinden hesaplandı.

5.10 Midede Katalaz Aktivitesi Ölçümü

Katalaz enzimi H_2O_2 'nin, H_2O 'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'de abzorbanın azalması ile takip edilebilir. 1 dakikada abzorbanstaki azalma katalaz aktivitesi ile ilgilidir. Deney için gerekli çözeltiler aşağıdaki gibidir:

- **Fosfat tamponu (50 mM, pH=7,0) :** a) 6,81 gr KH₂PO₄ ve b) 8,90 gr Na₂HPO₄.2H₂O tartılıp ayrı ayrı biraz distile suda çözüldükten sonra hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanılacağı vakit a'dan 1 hacim b'den 1,5 hacim alınarak karıştırılır (pH=7,0) ve 2°C'de saklanır).
- **H₂O₂ çözeltisi (30 mM) + Fosfat tamponu:** Yoğunluğu d=1,11 gr/ml olan % 30 gr'lık H₂O₂ çözeltisinden 0,31 ml alınır ve 50 mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile 100 ml'ye seyreltilir.
- **Doku homojenatı :** Doku serum fizyolojik ile homojenize edilir.

Deneyin yapılışı sırasında %10'luk doku homojenatı 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve serum fizyolojik ile seyreltildi. Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpü alındı. Tablo 3'de belirtilen miktarlar ilave edildi ve karıştırıldı. 1 dakika sonra 240 nm'de abzorbansları okunarak kaydedildi. Sonuçlar bu deney için ekstinksiyon katsayısı 0,004 (0,00394) mM⁻¹/ mm⁻¹ göz önüne alınarak (U/mg protein/dak) cinsinden hesaplandı (Aebi, 1984).

Tablo 3. Katalaz Aktivitesi Ölçümü İçin Çözelti Miktarları

| | Numune | Kör |
|--|--------|--------|
| Fosfat tamponu | - | 0,3 ml |
| Dilue süpernatant | 0,6 ml | 0,6 |
| H ₂ O ₂ çözeltisi + fosfat tamponu | 0,3 ml | -- |

5.11 Serumda İnterlökin IL-1 β ve IL-10 Düzeyi Ölçümleri

Dekapitasyon sonrasında toplanan gövde kanı, 15 dak 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen serum örneklerinden IL-1 β (ASSAYPRO) ve IL-10 (ASSAYPRO) özel ticari kit kullanılarak, ELISA yöntemi ile (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) çalışıldı. Değerler pg/ml cinsinden ifade edildi.

5.12 Midede Nükleer Faktör Kappa (NF)- κ B Ekspresyonu Ölçümü

Sıçanlardan eksize edilen mide dokuları histolojik doku takibi için ilk olarak 4°C'de %10'luk nötral formaldehit (pH=7,4) ile fikse edildi. Sonrasında alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96 ve %100 dereceli alkol) geçirilerek dokunun dehidratasyonu sağlandı. Dokuların şeffaflandırma işlemi için ksilen kullanıldı. Ardından sıvı parafinde immersiyon sağlandıktan sonra mide dokularından kesit alınması amacıyla parafine gömülerek histolojik doku takibi sonlandırıldı. Elde edilen bloklardan histolojik incelemeler için 5 μ m kalınlığında kesitler alınarak (Leica RM 2245 model; Almanya) poly-L-lysine lamlara aktarıldı.

Kesitlerin immunohistokimyasal incelemesinde NF- κ B p65 primer antikoru (Cell Signaling) kullanılarak (1:100 oranında; 1 μ l antikor+99 μ l Permeabilizasyon solüsyonu olacak şekilde hazırlanır) boyama işlemi avidin biyotin kompleks (ABC) yöntemine göre yapıldı. İkincil antikor (RTU Botinylated Universal Antibody, Anti-Rabbit/Mouse IgG (H+L); RTU Vectastain, Vector Lab) damlatılarak humidifiye alan içinde 15-25°C'de 30 dakika bekletildi. Sonrasında ABC Reagent (RTU Vectastain) damlatılarak humidifiye alan içinde 30 dakika daha bekletildi. Yıkamadan sonra kromojen olarak 3,3' diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. DAB + Subsrat solüsyonu (Vector Lab) damlatılarak 1 dakika bekletildi. Yıkama ve hematoksilen ile zıt boyama işleminden sonra preparat %100'lük alkole alındı. Xylene ile şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile preparat kapatıldı.

NF- κ B antikoru ile boyanan kesitlerin pozitif kontrolleri yapıldı. Deney grupları ile karşılaştırıldı. Antikor ile verilen veri sayfası ekinde prosedürün nasıl uygulanacağı ve boyanma sonucunda boyanmanın pozitifliği bu sayfaya bakılarak

doğrulandı. Boyanan kesitlerdeki NF-κB aktivasyonu H skor ile değerlendirildi. H skor incelemesinde hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesi hesaplandı. Kesitler ışık mikroskopunda (Leica DM 6000B, Wetzlar, Almanya) incelenerek boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesi hesaplandı. Boyama derecesi 0; boyanmamış, 1; az boyanmış, 2; orta derecede boyanmış, 3; çok boyanmış olarak değerlendirildi. Rastgele olarak üç alanda tüm boyanma dereceleri için yüzde boyanmalar belirlendi. Bir alan için boyanma dereceleri ile yüzdelerinin çarpılması ile H skor elde edildi. 0 ile 300 arasında elde edilen H skorundaki 300 değeri, %100 NF- κB güçlü boyanan pozitif hücreleri göstermektedir (3; çok boyanmış) (Choudhury ve ark., 2010; Abueid ve ark., 2016).

H skor= (% hücrelerin boyanma derecesi 1x1) + (% hücrelerin boyanma derecesi 2x2) + (% hücrelerin boyanma derecesi 3x3).

5.13 Midede Apoptozis Ölçümleri

Mide dokularında histolojik doku takibi yapıldıktan sonra apoptotik indeks analizinin ölçülmesi için 5 µm kalınlığında kesitler alındı (Leica RM 2245 model; Almanya) ve poly-L-lysine lamlara aktarıldı.

Kesitler apoptotik indeksin değerlendirilmesi amacıyla TUNEL (TdT - mediated dUTP nick end labeling; Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Germany) tekniğiyle immunohistokimyasal olarak boyandı. 37°C'de karanlık ve nemli ortamda 60 dakika inkübasyondan ve yıkamadan sonra kesitleri ışık mikroskopunda görünür hale getirmek için kesitlere POD (horseradish peroksidaz) çevirici (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) eklenerek etüvde 37°C'de 30 dakika bekletildi. Dahra sonra renklendirme için %0,05 DAB (SkyTek; Utah, USA) karışımı kullanıldı. Kesitler ışık mikroskobu olan Leica DM 4000B mikroskopunda Stereoinvestigator 11,0 image analiz programıyla (Microbrightfield, Colchester, VT, USA) incelendi. Sayım sırasında 3 farklı işaretleyici kullanıldı. Apoptotik, nekrotik ve normal hücreler ayrı işaretleyiciler ile işaretlendi. Her bir karede, sayım alanı bias olmayacak şekilde

belirlendi ve apoptotik indeks (%) apoptotik hücre/toplam hücre x 100 formülüne göre hesaplandı (Karakoyun ve ark., 2011).

5.14 İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki tüm veriler ortalama±standart hata şeklinde ifade edildi. İstatistiksel analiz, Mann-Whitney U parametrik olmayan test histolojik verileri ve ANOVA ardından diğer parametreler için Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak yapıldı. Analizler için InStat istatistiksel analiz programı (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanıldı. p değerinin 0,05'den küçük olması ($p<0,05$) halinde veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

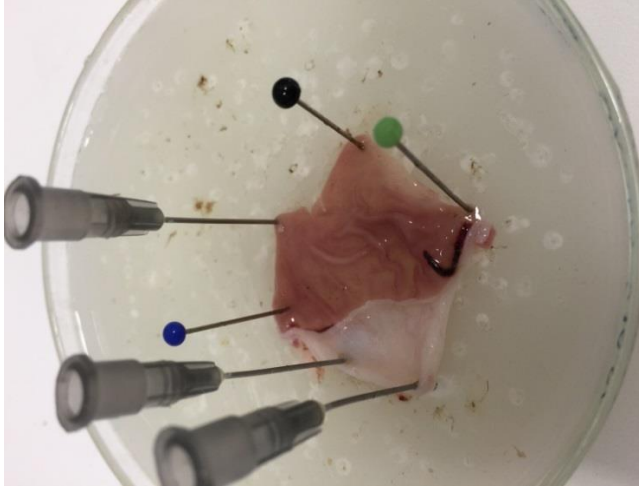
6.1 Mide Lezyonlarının Makroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ($0,1 \pm 0,1$ mm) göre ülser oluşturulan gruba ($33,1 \pm 5,1$ mm), bakıldığında ülser indeksi açısından anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,001$) (Resim 2). Ülser oluşturulmuş hayvanlara vitamin D3 ön tedavisi uygulandığında ($19,0 \pm 4,3$ mm) ise ülser indeksinin ülser grubuna ($33,1 \pm 5,1$ mm) göre azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$) (Resim 3). Ülserli hayvanlara vitamin D3 ön tedavisine L-NAME eklendiğinde tek başına vitamin D3 uygulanmış gruba göre daha az ülser oluştuğu gözlemlendi ($0,1 \pm 0,1$ mm; $p < 0,01$). Ülserli hayvanlara vitamin D3 ön tedavisine NEM veya glibenklamid eklendiğinde tek başına vitamin D3 uygulanmış gruba göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Aksine, vitamin D3 ile birlikte indometazin uygulandığında ise tek başına vitamin D3 ön tedavisi almış ülserli gruba göre ülser indeksi büyük oranda artmış olarak saptandı ($45,3 \pm 6,0$ mm) (Şekil 4).

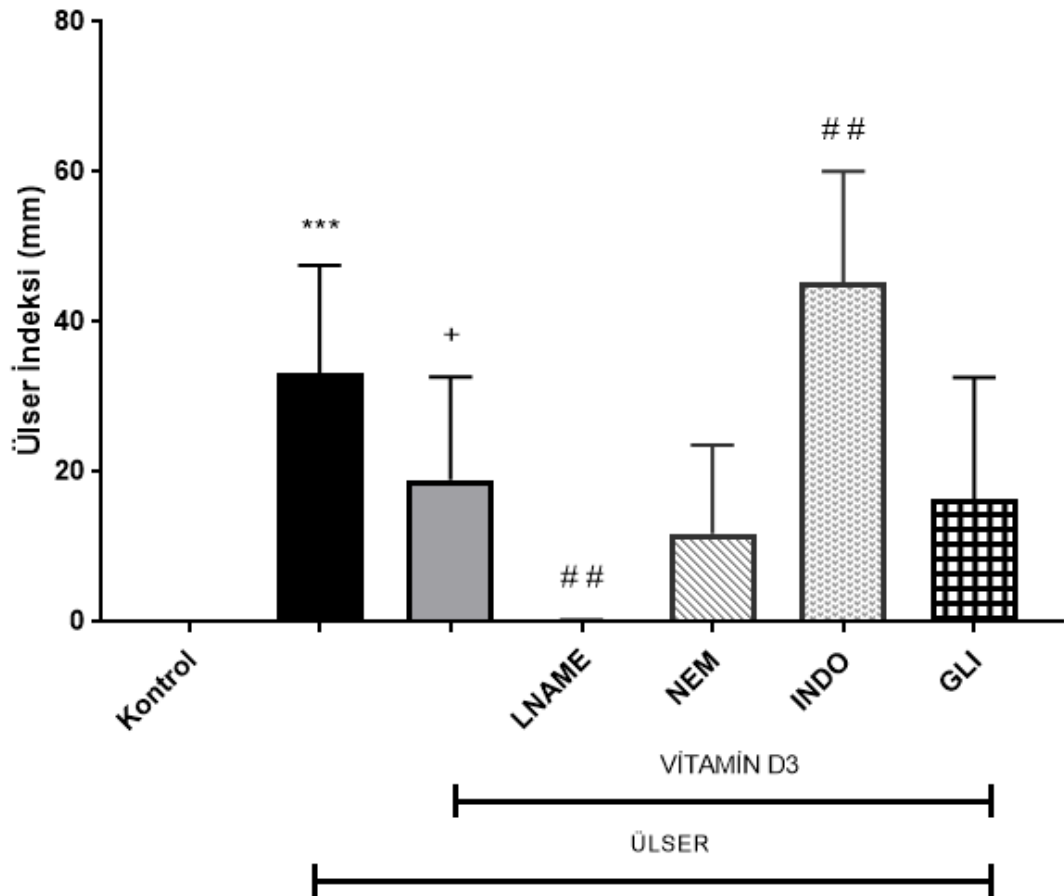
Ülserli hayvanlara tek başına L-NAME ($9,7 \pm 2,6$ mm) veya tek başına glibenklamid ($12,5 \pm 3,9$ mm) uygulaması yapıldığında ülser oranında azalma olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Tek başlarına NEM ($40,8 \pm 7,9$ mm) ve indometazin ($43,2 \pm 17,1$ mm) uygulaması sonucu ülser oranlarında anlamlı bir değişiklik saptanmadı.



Resim 2. Ülser grubuna ait örnek midenin makroskopik görünümü.



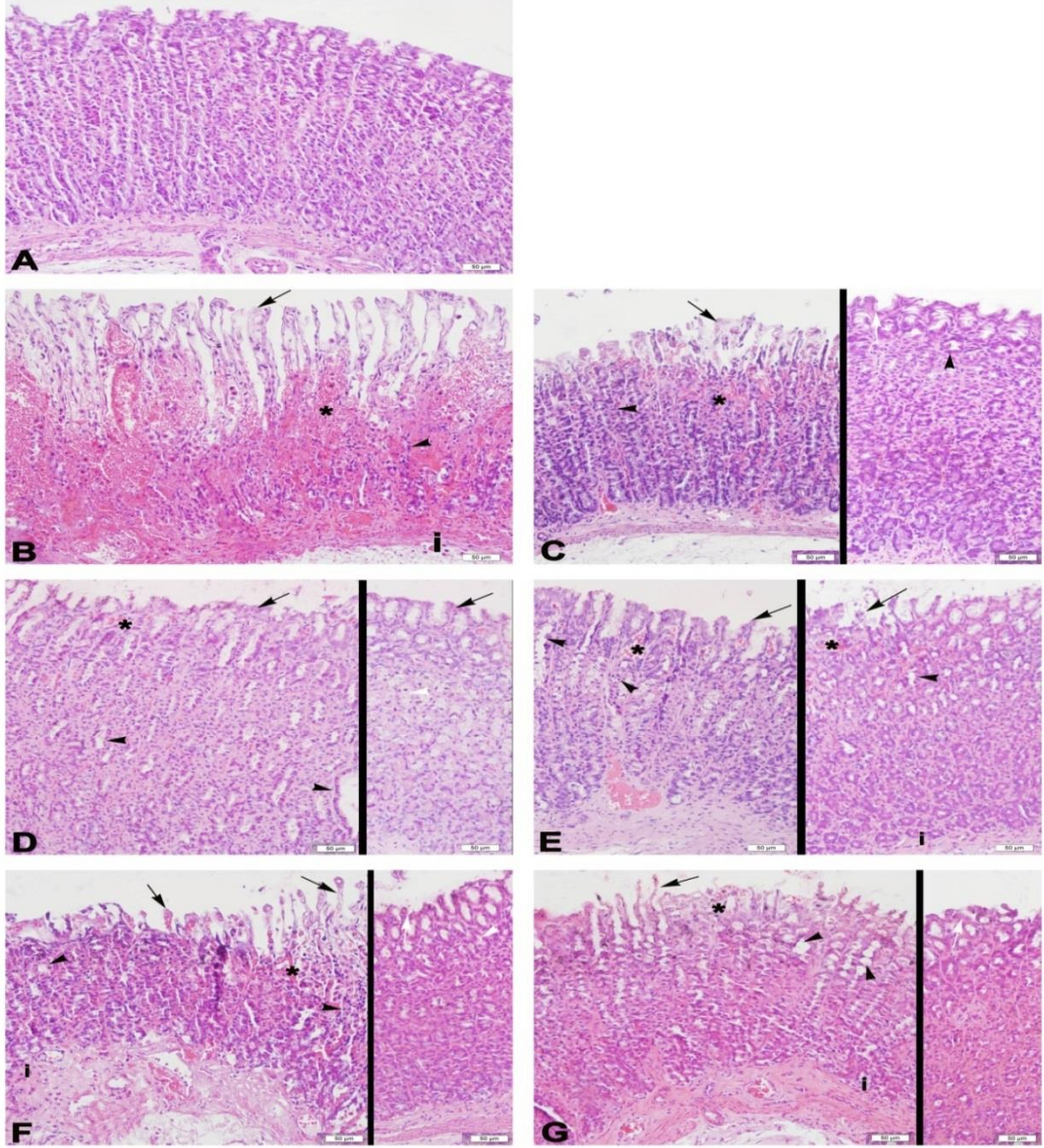
Resim 3. Vitamin D3 ön tedavisi uygulanmış ülser grubuna ait örnek midenin makroskopik görünümü.



Şekil 4. Deney gruplarında mide lezyonlarının makroskopik olarak incelenmesi sonucu elde edilen ülser indeksi (mm) değerleri. Tüm veriler ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. *** $p < 0,001$ kontrol grubuna kıyasla; + $p < 0,05$ ülser grubuna kıyasla; ## $p < 0,01$ vitamin D3 ön tedavisi verilmiş ülser grubuna kıyasla.

6.2 Mide Lezyonlarının Mikroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi

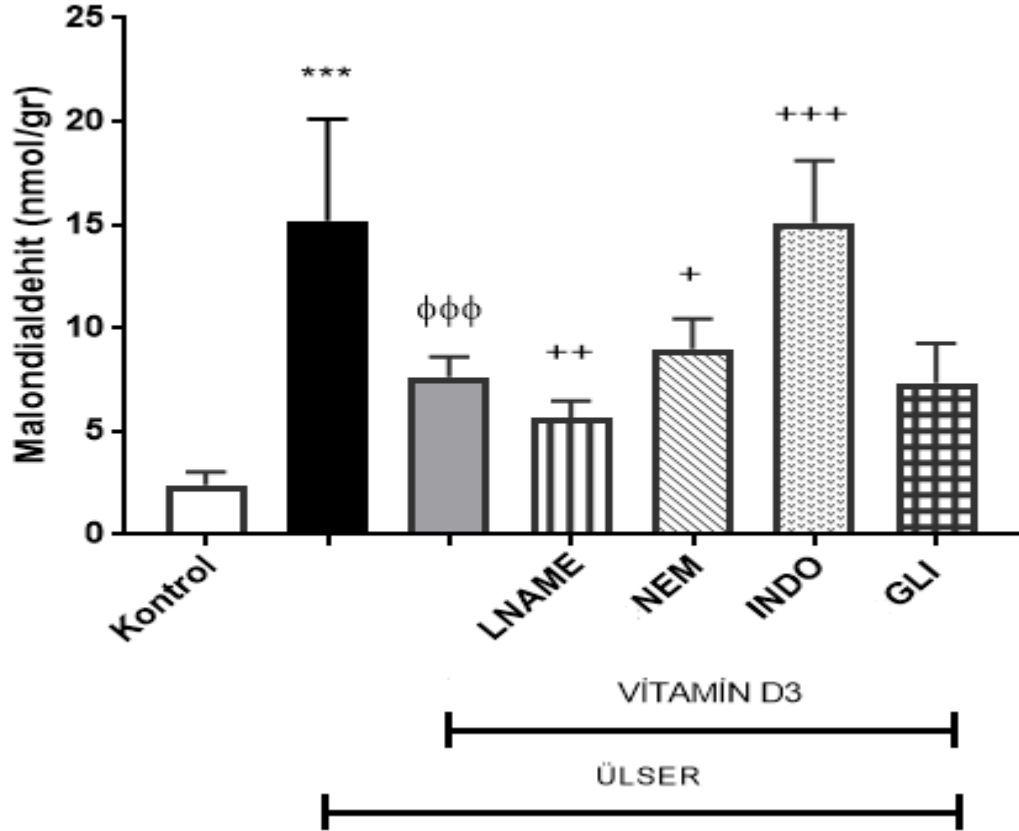
Kontrol grubunda (Resim 4A) düzenli morfolojide mukozal ve submukozal yapılar gözlendi. Ülser grubunda (Resim 4B) ciddi yüzey ve glandüler epitel hasarı, mukozal kanama ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlendi. Mide lezyonlarının mikroskopik skor değerlendirme sonuçlarına bakıldığında ülser grubunda ($10,67 \pm 0,67$) kontrole göre ($0,02 \pm 0,02$) ortalama skorlar belirgin oranda fazlaydı ($p < 0,001$). Vitamin D3 ($6,80 \pm 1,86$) ön tedavisi alan ülser grubunda (Resim 4C) ve L-NAME+vitamin D3 ($4,00 \pm 1,15$) ön tedavisi alan ülser grubunda (Resim 4D) hafif düzeyde yüzey epitel hücre hasarı, orta düzeyde glandüler epitel hücre hasarı, vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlendi. NEM+vitamin D3 ($8,00 \pm 1,41$) ön tedavisi alan ülser grubunda (Resim 4E), indometazin+vitamin D3 ($8,50 \pm 1,71$) ön tedavisi alan ülser grubunda (Resim 4F) ve glibenklamid+vitamin D3 ($8,00 \pm 2,31$) ön tedavisi alan ülser grubunda (Resim 4G) yüzey müküs hücrelerinde ve glandüler hücrelerde orta derecede hasar, vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlendi.



Resim 4. Deney gruplarına ait örnek mide dokularının histolojik mikrografları. Kontrol grubunda (A), düzenli morfolojide yüzey müküs ve glandüler epitel görülmektedir. Ülser grubunda (B), ciddi düzeyde yüzey müküs hücrelerinde (ok) ve glandüler hücrelerde (okbaşı) hasar, mukozal kanama (*) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (i) görülmektedir. Vitamin D3 ön tedavisi alan ülser grubunda (C), bazı bölgelerde orta düzeyde yüzey müküs hücre hasarı (siyah ok) ve birçok bölge oldukça düzenli morfolojide yüzey müküs hücreleri (beyaz ok), orta düzeyde genişlemiş ve hasarlı glandüler epitel (okbaşı) ve vasküler konjesyon (*) görülmektedir. L-NAME+vitamin D3 ön tedavisi alan ülser grubunda (D), birçok bölgede oldukça düzenli yüzey müküs hücreleri (ok) ve glandüler epitelde genişleme ve glandüler epitel hasarı (siyah okbaşı), bazı alanlarda oldukça düzenli glandüler epitel /beyaz okbaşı), vasküler konjesyon (*) görülmektedir. NEM+vitamin D3 (E), indometazin+vitaminD3 (F) ve glibenklamid+vitamin D3 (G) alan ülser gruplarında, birçok alanda yüzey müküs hücrelerinde (siyah ok) ve glandüler epitelde orta derecede hasar (siyah okbaşı), bazı alanlarda oldukça düzenli yüzey müküs hücreleri (beyaz ok) ve glandüler epitel (beyaz okbaşı), orta düzeyde vasküler konjesyon (*) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (i) görülmektedir. H&E boyası: büyütme: x200.

6.3 Midede Lipid Peroksidasyonun Değerlendirilmesi

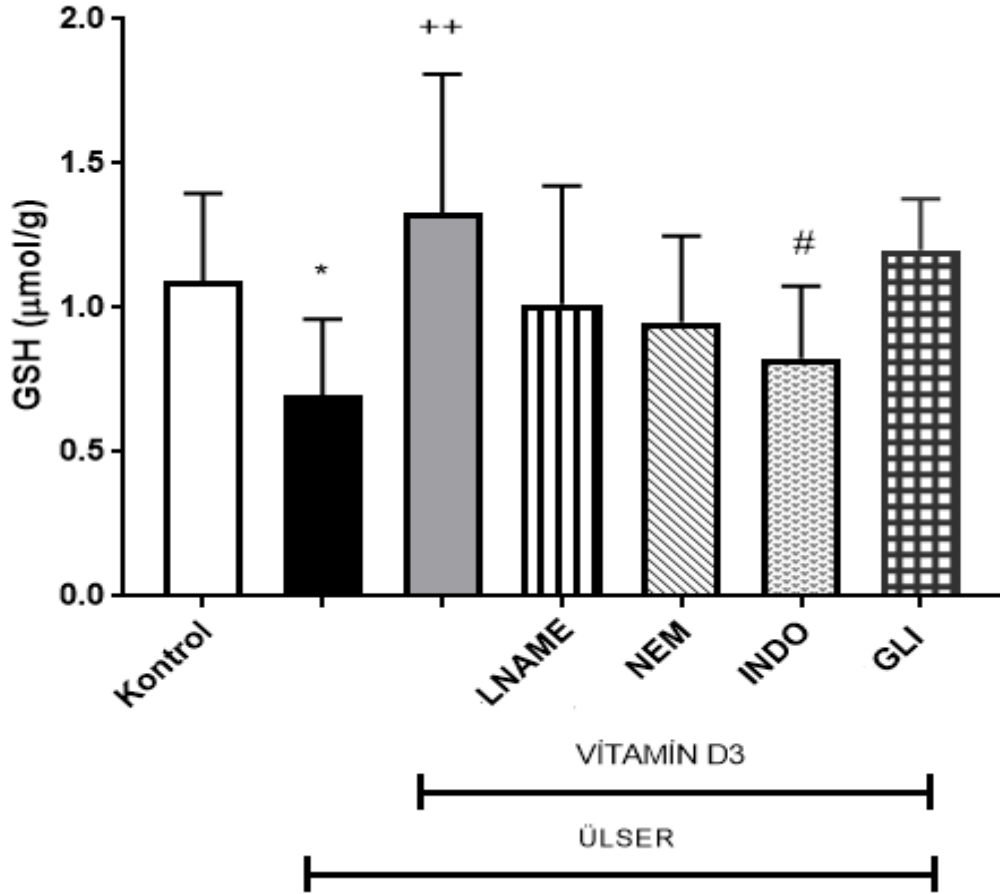
Lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA seviyesi kontrol grubuna ($2,40 \pm 0,23$ nmol/gr) göre ülser oluşturulan grupta ($15,20 \pm 1,64$ nmol/gr) yüksek bulundu ($p < 0,001$). Vitamin D3 ön tedavisi ($7,63 \pm 0,31$ nmol/gr) ile MDA düzeyinde azalma gözlenmiştir ($p < 0,001$). Vitamin D3 ile birlikte L-NAME uygulanması MDA seviyelerinde sadece vitamin D3 almış ülser grubuna kıyasla daha fazla düşüşe neden olurken ($5,68 \pm 0,28$ nmol/gr; $p < 0,01$); vitamin D3 ile birlikte NEM ($8,99 \pm 0,51$ nmol/gr; $p < 0,05$) veya indometazin ($15,10 \pm 1,13$ nmol/gr; $p < 0,001$) uygulaması MDA düzeylerini vitamin D3 ile tedavi edilen ülser grubuna göre arttırmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Deney gruplarında mide doku örneklerinde malondialdehit düzeyleri. Tüm veriler ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. *** $p < 0,001$ kontrol grubuna kıyasla; φφφ $p < 0,001$ ülser grubuna kıyasla; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ ve +++ $p < 0,001$ vitamin D3 ön tedavisi almış ülserli gruba kıyasla.

6.4 Midede Glutasyon (GSH) Düzeyinin Değerlendirilmesi

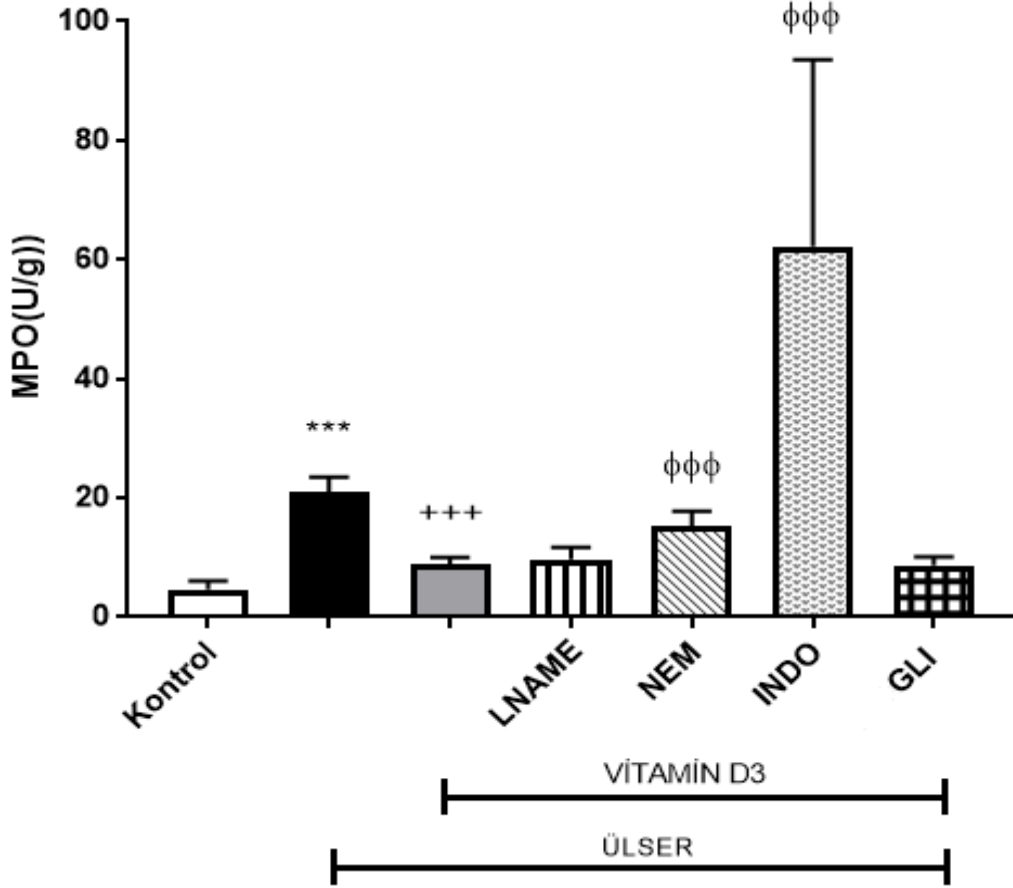
Kontrol grubuna ($1,09 \pm 0,11 \mu\text{mol/gr}$) göre kıyaslandığında ülser oluşturulmuş grupta ($0,69 \pm 0,09 \mu\text{mol/gr}$) glutasyon düzeylerinde azalma gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu gruba vitamin D3 ön tedavisi ($1,33 \pm 0,16 \mu\text{mol/gr}$) uygulandığında GSH düzeyinde artış gözlemlendi ($p < 0,01$). İndometazin+vitamin D3 alan ülser grubundaki GSH düzeyinin ($0,83 \pm 0,09 \mu\text{mol/gr}$) sadece vitamin D3 alan ülser grubuna kıyasla azaldığı görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 6).



Şekil 6. Deney gruplarında mide doku örneklerinde glutasyon düzeyleri. Tüm veriler ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna kıyasla; ++ $p < 0,01$ ülser grubuna kıyasla; # $p < 0,05$ vitamin D3 ön tedavisi verilmiş ülser grubuna kıyasla.

6.5 Midede Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ($4,68 \pm 0,49$ U/gr) kıyasla ülser oluşturulmuş grupta ($20,96 \pm 0,86$ U/gr) artmış düzeyde MPO aktivitesine rastlandı ($p < 0,001$). Vitamin D3 ön tedavisi alan ülser grubunda MPO düzeyinin ($8,81 \pm 0,41$ U/gr), tedavi almayan ülser grubuna kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$). Vitamin D3 ön tedavisi ile birlikte NEM ($15,17 \pm 0,93$ U/gr) veya indometazin ($30,82 \pm 0,09$ U/gr) uygulandığında vitamin D3'ün düşürdüğü MPO düzeylerinin tekrar arttığı görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 7).



Şekil 7. Deney gruplarında mide doku örneklerinde miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin değerlendirilmesi. Tüm veriler ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. *** $p < 0,001$ kontrol grubuna kıyasla; +++ $p < 0,001$ ülser grubuna kıyasla; φφφ $p < 0,001$ vitamin D3 ön tedavisi uygulanmış ülser grubuna kıyasla.

6.6 Midede Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Kontrol, ülser ve vitamin D3 ön tedavisi almış ülser gruplarında mide SOD ve katalaz aktiviteleri açısından istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark gözlenmedi. Vitamin D3 ile birlikte glibenklamid uygulanması ($84,01 \pm 7,19$ U/gr) tek başına vitamin D3 ön tedavisi uygulanmış ülser grubuna ($59,51 \pm 3,3$ U/gr) ve tek başına ülser ($53,06 \pm 6,13$ U/gr) oluşturulmuş gruba göre SOD aktivitesini arttırdı (Tablo 4).

Tablo 4. Deney gruplarında mide doku örneklerinde SOD ve Katalaz aktivitelerinin düzeyleri. Tüm veriler ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. ⁺⁺ $p < 0,01$ ülser grubuna kıyasla; ^{##} $p < 0,01$ vitamin D3 ön tedavisi almış ülser grubuna kıyasla.

| Deney grupları | SOD (U/gr) | Katalaz (U/mg) |
|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Kontrol | $60,01 \pm 8,90$ | $7,74 \pm 0,38$ |
| Ülser | $53,06 \pm 6,14$ | $7,27 \pm 0,21$ |
| Ülser + Tedavi grupları | | |
| Vitamin D3 | $59,51 \pm 3,31$ | $7,01 \pm 0,13$ |
| Vitamin D3 + L-NAME | $72,63 \pm 7,03$ | $7,04 \pm 0,07$ |
| Vitamin D3 + NEM | $63,33 \pm 6,85$ | $6,97 \pm 0,10$ |
| Vitamin D3 + İndometazin | $80,54 \pm 12,54$ | $7,11 \pm 0,09$ |
| Vitamin D3 + Glibenklamid | $84,01 \pm 7,19$ ^{++##} | $7,14 \pm 0,06$ |

6.7 Serumda IL-1 β ve IL-10 Düzeyi Ölçümleri

Kontrol ve ülser gruplarında serum IL-1 β düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Vitamin D3 ön tedavisi almış ülser grubunda kontrol grubuna göre azalmış IL-1 β düzeylerine rastlandı ($p < 0,01$). Vitamin D3 + indometazin ön tedavisi alan ülser grubunda IL-1 β seviyesinin tek başına vitamin D3 ön tedavisi almış ülser grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Serum IL-10 düzeyleri açısından deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 5).

Tablo 5. Deney gruplarında serumda IL-1 β ve IL-10 seviyeleri. Tüm veriler ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. ** $p < 0,01$ kontrol grubuna kıyasla; # $p < 0,05$ vitamin D3 uygulanmış ülser grubuna kıyasla.

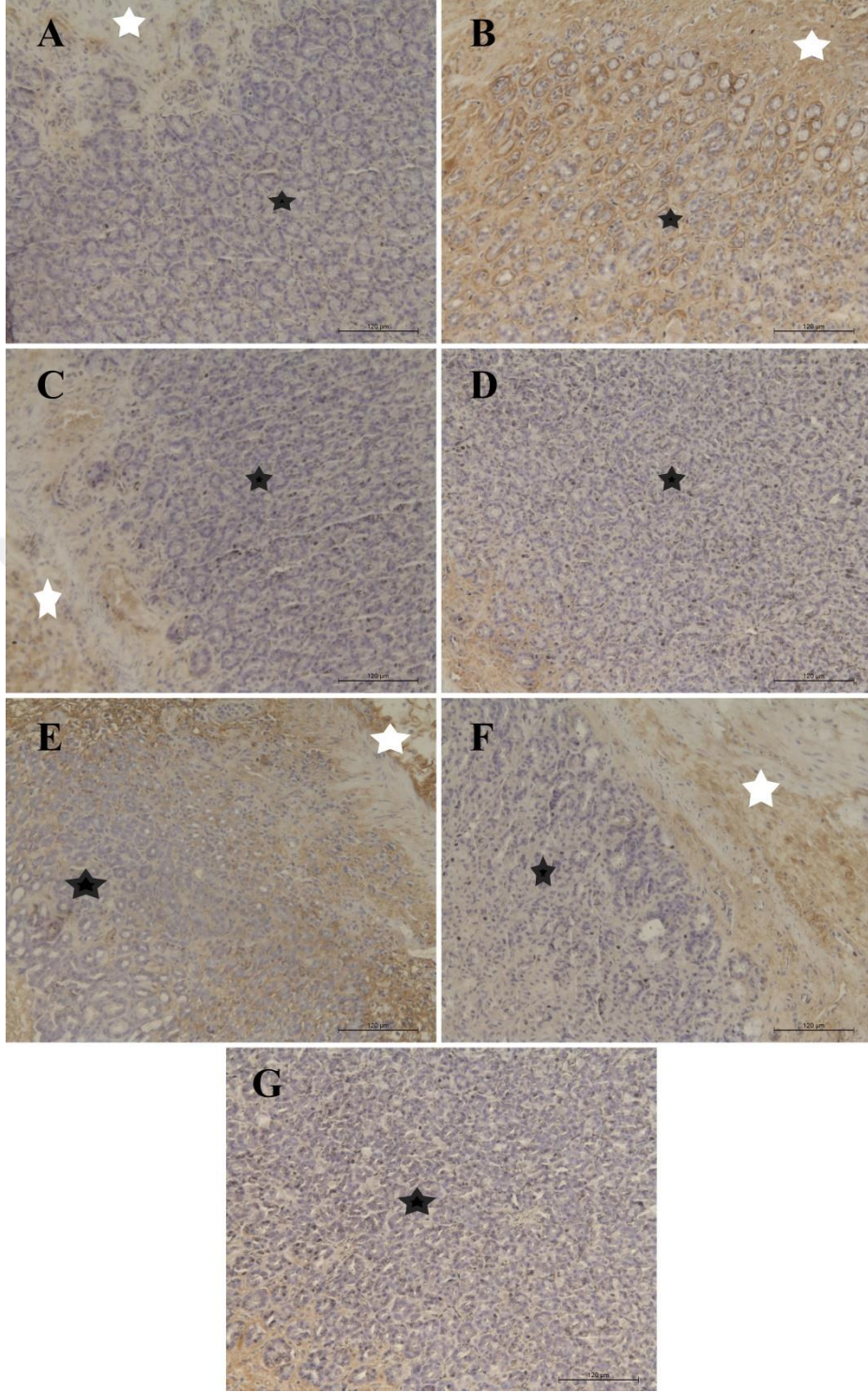
| Deney grupları | IL-1 β (ng/ml) | IL-10 (ng/ml) |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Kontrol | 691,70 \pm 139,30 | 197,20 \pm 30,39 |
| Ülser | 402,60 \pm 83,54 | 160,60 \pm 20,19 |
| Ülser + Tedavi grupları | | |
| Vitamin D3 | 222,00 \pm 40,81 ** | 146,10 \pm 28,31 |
| Vitamin D3 + L-NAME | 401,20 \pm 129,80 | 140,60 \pm 21,61 |
| Vitamin D3 + NEM | 260,27 \pm 80,71 | 267,90 \pm 69,06 |
| Vitamin D3 + İndometazin | 743,00 \pm 196,50 # | 132,90 \pm 22,42 |
| Vitamin D3 + Glibenklamid | 108,50 \pm 23,31 | 172,90 \pm 23,67 |

6.8 Midede Nükleer Faktör Kappa B (NF)-κB Ekspresyonu

Ülser grubunda kontrol grubuna göre NF-κB immünohistokimya boyamada H skoru değerinde anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,001$). Vitamin D3 ön tedavisi uygulanmış ülser grubunda H skoru değerinin ülser grubuna kıyasla düşüş gösterdiği görüldü ($p<0,05$). Vitamin D3 + indometazin verilmiş ülser grubunda H skorunun ülser grubu değerlerine geri döndüğü gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 6 ve Resim 5).

Tablo 6. Deney gruplarında mide doku örneklerinde NF-κB immünohistokimya boyaması ile elde edilen H skoru değerleri. *** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla; + $p<0,05$ ülser grubuna kıyasla; # $p<0,05$ vitamin D3 ön tedavisi verilmiş ülser grubuna kıyasla.

| Deney Grupları | H Skoru |
|--------------------------------|------------------|
| Kontrol | 1,60 ± 0,68 |
| Ülser | 20,20 ± 1,24 *** |
| Ülser + Tedavi grupları | |
| Vitamin D3 | 12,20 ± 2,06 + |
| Vitamin D3 + L-NAME | 10,60 ± 0,24 |
| Vitamin D3 + NEM | 15,00 ± 2,32 |
| Vitamin D3 + İndometazin | 22,20 ± 2,39 # |
| Vitamin D3 + Glibenklamid | 13,00 ± 1,00 |



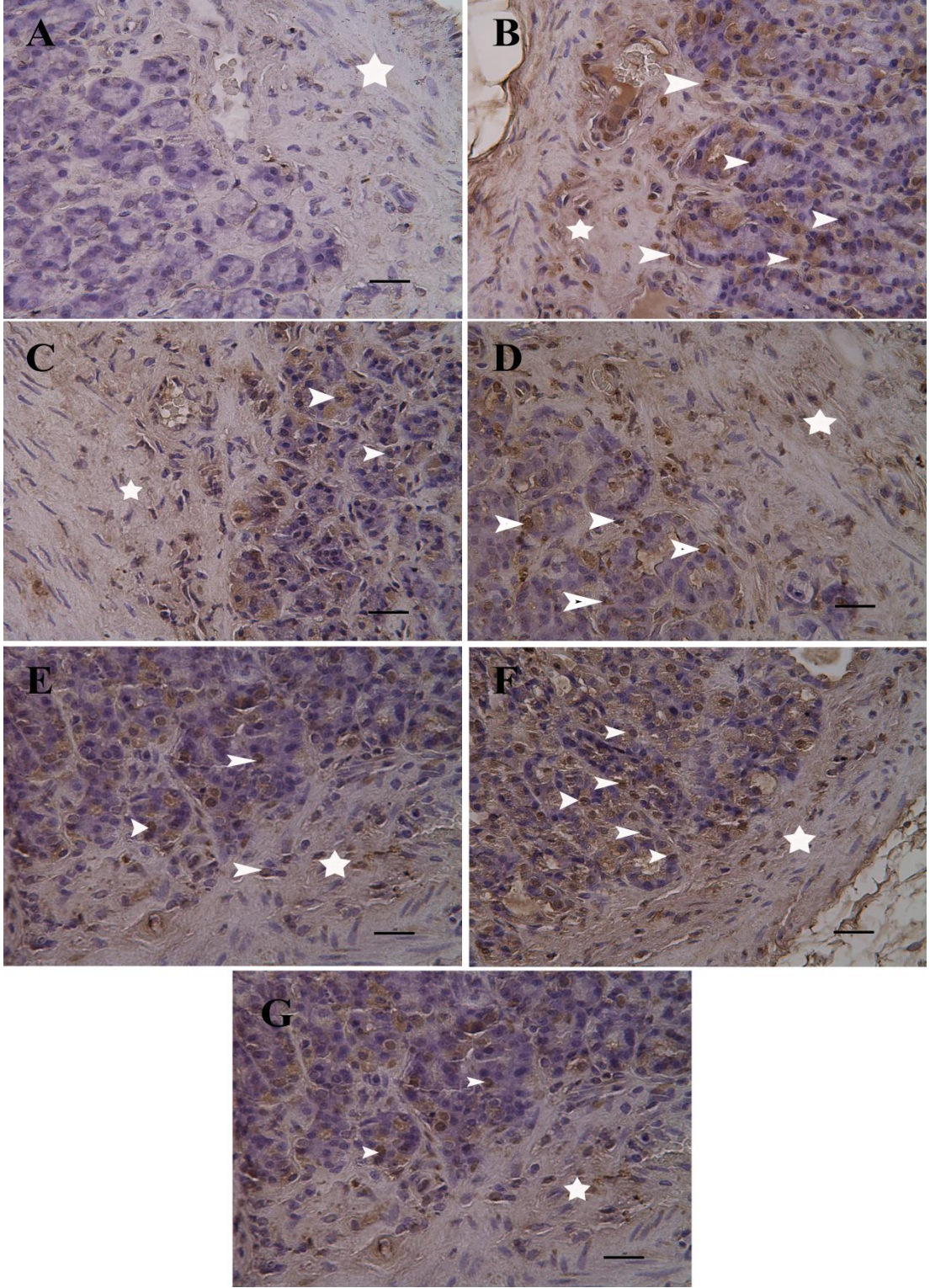
Resim 5. Deney gruplarına ait örnek mide dokularında NF-κB ekspresyonunu gösteren fotoğraflar. Gruplar: Kontrol (A), ülser (B), vitamin D3 + ülser (C), vitamin D3 + ülser + L-NAME (D), vitamin D3 + ülser + NEM (E), vitamin D3 + ülser + indometazin (F), vitamin D3 + ülser + glibenklamid (G). Kesitlerde mukoza tabakası (siyah yıldız), submukoza tabakası (beyaz yıldız) olarak gösterilmiştir. Ülser grubunda NF-κB ekspresyonunun hem mukoza hem de submukoza tabakasında yoğun olduğu görülmektedir. Büyütme: x20; bar=120 µm.

6.9 Midede Apoptozun Değerlendirilmesi

Ülser grubunda kontrol grubuna kıyasla apoptotik indeks (%) değerlerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p<0,001$). Vitamin D3 ön tedavisi uygulanmış ülser grubunda tedavisiz ülser grubuna göre apoptoz oranında anlamlı derecede azalma ($p<0,05$) gözlemlendi. Vitamin D3 ön tedavisi ile birlikte indometazin verilmiş ülserli grupta tek başına vitamin D3 ön tedavisi uygulanmış ülser grubuna göre apoptoz oranında artış ($p<0,05$) saptandı (Tablo 7 ve Resim 6).

Tablo 7. Deney gruplarına ait mide doku örneklerinde apoptoz indeksinin değerlendirilmesi.
*** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla; + $p<0,05$ ülser grubuna kıyasla; # $p<0,05$ vitamin D3 ön tedavisi verilen ülser grubuna kıyasla.

| Deney Grupları | Apoptotik İndeks (%) |
|--------------------------------|-----------------------|
| Kontrol | $2,82 \pm 0,25$ |
| Ülser | $9,16 \pm 0,32^{***}$ |
| Ülser + Tedavi grupları | |
| Vitamin D3 | $5,88 \pm 0,24^{+}$ |
| Vitamin D3 + L-NAME | $7,16 \pm 0,64$ |
| Vitamin D3 + NEM | $6,28 \pm 0,47$ |
| Vitamin D3 + İndometazin | $9,42 \pm 0,28^{\#}$ |
| Vitamin D3 + Glibenklamid | $6,38 \pm 0,38$ |



Resim 6. Deney gruplarına ait örnek mide dokularında TUNEL pozitif apoptotik hücreleri gösteren fotoğraflar. Gruplar: Kontrol (A), ülser (B), vitamin D3 + ülser (C), vitamin D3 + ülser + L-NAME (D), vitamin D3 + ülser + NEM (E), vitamin D3 + ülser + indometazin (F), vitamin D3 + ülser + glibenklamid (G). TUNEL pozitif hücreler beyaz ok başı ile gösterilmiştir. Mide tunika submukozası beyaz yıldız ile gösterilmiştir. Büyütme: x40; bar=250 µm.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, hidroklorik asit/etanol modeliyle oluşturulan mide ülserine 1,25-dihidroksi-vitamin D3'ün etkilerini ve bu etkilerin olası mekanizmaları araştırılmıştır. Hidroklorik asit/etanol bileşiğine maruz kalan sıçanların mide mukozalarında artmış lipid peroksidasyonu, nötrofil infiltrasyonu, NF-kB ekspresyonu ve apoptoz oranı ile azalmış endojen anti-oksidan glutatyon düzeyleri gibi ciddi hasar bulguları gözlenmiştir. Çalışmamızın histolojik ve biyokimyasal sonuçları, sıçanlara ülser oluşturulmadan önce 14 gün boyunca intraperitoneal olarak verilen 0,25 µg/kg vitamin D3'ün, hidroklorik asit/etanol ile oluşturulan ülser modelinde; doku lipid peroksidasyonunu azaltması, glutatyon düzeyini arttırması, miyeloperoksidaz seviyesindeki artışı azaltması, NF-kB ve apoptoz oranlarındaki artışları azaltması sonucunda yararlı etkileri olduğunu göstermiştir.

Gastrik ülser toplumda çok yaygın olarak görülen, kronik bir hastalıktır. Midenin mukozal yüzeyinin inflamasyonu, irritasyonu veya erozyonu gastrit olarak nitelendirilir ve hafif asemptomatik formundan ağır ülseratif forma kadar değişkenlik gösterebilir (Webster-Gandy, 2012). Gastrik ülser ve duodenal ülser, gastroduodenal mukozayı etkileyen saldırgan ve koruyucu faktörler arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Feldman ve ark., 2002; Hooderwerf ve Pasricha, 2006). Midede hidroklorik asit (HCl), safra reflüsü, çeşitli içerik ve sıcaklıkta yiyecekler, mikroorganizmalar, alkol ve NSAİİ gibi luminal içeriği hasarlayıcı ajanlara karşı çok sayıda gastroduodenal savunma mekanizmaları mevcuttur. Bunlar müküs-bikarbonat bariyeri, yüzey epitel hücreleri, mukozanın yenilenmesi, kan akımı, asit-baz dengesi, endojen sülfidril ve epidermal büyüme faktörü gibi faktörlerdir (De Luca ve Cantorna, 2001; Mathieu ve Adorini, 2002; Miller, 1987). Gastrik mukozal kan akımının gastrik mukozal hasara karşı önemli bir faktör olduğu ve lokal salıverilen prostaglandinler, nöropeptidler ve NO gibi vazodilatör mediyatörlerin mukozal direnci sağlamada önemli etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (Whittle, 1992). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda radikal oksijen türevleri ve serbest radikallerin gastrik ülser patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Bandyopadhyay, 2002). Bunların dışında bazı endojen faktörler olan

NO ve sülfidril grupların ülser patogeneğinde yer aldığı gösterilmiştir (Tsukimi ve ark., 2001). Mide mukozasında prostaglandinlerin ve ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasının bikarbonat ve müküs sekresyonunu uyardığı, mukozal kan akımını sağlayıp asit sekresyonunu önlediği bildirilmiştir (Rainsford, 1978; Garcia ve ark., 1997).

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz ülser modeli olan asidifiye etanol uygulaması sıçan midesinde nekrotik lezyonlar oluşturmaktadır. Uygulama sonrasında gastrik kan akımında meydana gelen yavaşlama gastrik mukozada ülser ve hemorajiye neden olmaktadır (Phull ve ark., 1995). Etanol uygulaması direk toksik etkileri indüklemekte, müküs ve bikarbonat salınımını azaltmakta ve mukozal kan akımını düşürmektedir (Mincis ve ark., 1995; Samonia ve ark., 2004). Ek olarak lipid peroksidasyonunu arttırmakta, reaktif oksijen türevlerini çoğaltmakta, antioksidan sistem aktivitesini azaltmakta, permeabilite değişikliklerine yol açmakta ve mitokondri membranı depolarizasyonunu değiştirerek hücreyi ölüme sürüklemektedir (Repetto ve Llesuy, 1995; Oliveira ve Da Silva, 2012). HCl ise, gastrik lezyon oluşumunu hızlandırmakta ve mukozal korumayı azaltmaktadır (Sun ve ark., 1991).

Vitamin D3, güneş ışığı ile temas sonucu deride üretilen, yağda çözünen, sekosteroid yapıda bir prohormondur. Vücutta çeşitli metabolik değişikliklerle kalsitriol olarak bilinen, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında önemli rol oynayan bir hormona dönüşür. Majör fonksiyonu plazma kalsiyum seviyesini düzenlemek olup diğer görevleri arasında kemik rezorpsiyonunu arttırmak, parathormon sentezini azaltmak, insülin yapımını arttırmak, renin sentezini azaltmak, kalp kası kontraktilesini arttırmak gibi sistemik etkilerinin yanı sıra T lenfosit aktivasyonu ile sitokin salınımı ve B lenfosit aktivasyonu ile immünglobulin sentezi gibi immünmodülatör etkileri de vardır (Çalışkan ve ark., 2012). Vitamin D3 multisistemik etkileri ve özellikleri nedeniyle birçok inflamasyon modellerinde çalışılmış bir moleküldür. Çalışmamızda akut mide ülser modelini kullanarak vitamin D3'ün lezyon oluşumu üzerine etkilerini ve etki mekanizmalarını mikroskopik ve makroskopik düzeylerde, antioksidan parametreler düzeyinde, immünolojik olarak da sitokin seviyeleri ve apoptoz düzeylerinde değerlendirdik.

Çalışmamızda ülser oluşturulan sıçanlarda mide dokusunda makroskopik düzeyde hasar ve mikroskopik değerlendirmesinde yüzey müküs hücrelerinde ve glandüler hücrelerde önemli ölçüde hasar, mukozal kanama ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu görüldü. Bu gruba vitamin D3 ön tedavisi verildiğinde makroskopik olarak ülser boyutlarında anlamlı bir azalma görüldü. Bu azalış vitamin D3 yanına NOS inhibitörü L-NAME eklendiği zaman daha da belirginleşirken indometazin eklendiğinde ise ortadan kalktı. Benzer şekilde, mikroskopik değerlendirmede de vitamin D3 ön tedavisi verilmiş ülser grubunda tedavisiz ülser grubuna kıyasla daha hafif inflamasyon bulguları saptandı.

Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının en önemli mekanizması hücre zarlarında bulunan lipidlerin peroksidasyonudur. Normal sağlıklı dokuda düzeyi çok düşük olan lipid peroksidasyonundaki artış serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarın göstergesi olarak düşünülebilir (Özaras ve ark., 2000). Hidroksil radikallerinin doymamış lipidlerle reaksiyona girmesi lipid peroksidasyonunu başlatır ve lipid radikalleri oluşturur. Bu radikaller çift bağlarında oluşan değişiklik sonucunda dien konjugata; sonrasında da oksijen varlığında sırasıyla lipid hidroperoksidikale ve lipid endoperoksidikale dönüşür. Endoperoksidikale ya diğer lipidleri okside edip lipid hidroperoksit ve lipid radikali oluşturur; ya da oksijen ve demir varlığında lipid alkoksiradikale dönüşür. Bunun yıkılması sonucunda da alkil radikal, lipid aldehit ve MDA son ürünleri oluşur. Bunların sonucunda detoksifiye edilemeyen reaktif oksijen radikalleri (ROS) öncelikle membran lipidlerini okside eder; böylece hücrenin bütünlüğü ve fonksiyonlarını bozmuş olur (Atalay ve Leaksonen, 2002). Bu lipid peroksidasyonuna yanıt olarak doku glutatyon gibi anti-oksidan savunma mekanizmasını harekete geçirip ortamdaki reaktif oksijen radikallerini azaltır ve inaktive eder. Gastrik mukozada da karaciğerle kıyaslanabilecek miktarlarda yüksek konsantrasyonlarda glutatyon mevcuttur (Boyd ve ark., 1997). Yapılan çalışmalarda gastrik ülser modellerinde hasar oluşturulmuş dokularda kontrol grubuna göre daha fazla lipid peroksidasyonu görüldüğü belirtilmiştir (Laine ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda ülser oluşturulmuş sıçanlarda MDA seviyeleri kontrol grubuna göre benzer şekilde yüksek bulunurken bu yükseklik vitamin D3 ön tedavisi ile birlikte

önemli derecede azaldı. Bu düşüş vitamin D3 ön tedavisi ile birlikte L-NAME verildiğinde daha belirginleşirken indometazin verildiğinde ortadan kayboldu.

Yapılan çalışmalarda prostoglandinlerin intralüminal aside karşı bikarbonat sekresyonunun düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu, mukus sentezini ve gastrik sıvı içine mukus salgılanmasını stimüle ettikleri gösterilmiştir (Wallace ve Ritchie, 1989). Ortamda prostaglandin azaldığında müküs ve bikarbonat salınımında azalma, asit sekresyonunda artış, gastrik kan akımında azalma, nötrofil aktivasyon ve infiltrasyonunda artış meydana getirerek ROS üretimine ve lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. İndometazin gibi NSAİİ'ler siklooksijenaz aktivitesini ve endojen prostaglandin yapımını azaltırlar (Ashley ve ark., 1985; McCafferty ve ark., 1995; Fiorucci ve ark., 2003; Wallace ve Devchand, 2005). Etanol gastrik mukozada venüllerin konstriksiyonu aracılığıyla hasar oluşturmaktadır ve ekzojen prostaglandinler bu etkiyi geri döndürürler (Saeki ve ark., 2004). Çalışmamızda indometazin verilen ülser grubunda makroskopik gastrik lezyonların daha da arttığı ve vitamin D3 verilen grupta ise vitamin D3'ün mide koruyucu etkisini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca, vitamin D3 + indometazin verilen ülser grubunda yüksek IL-1 β düzeylerine rastlanmıştır. Siklooksijenaz inhibisyonu etanolün ülser oluşturucu potansiyelini şiddetlendirmektedir diyebiliriz. Ortamda indometazin varlığının lipid peroksidasyonunu daha da arttırması vitamin D3'ün koruyucu etkisinin prostoglandin yolağı üzerinden olabileceğini akla getirmektedir. NO yolağının inhibisyonu ile de MDA seviyelerinde düşüş gözlendi. Vitamin D3'ün gastrik dokuda koruyucu etkisinde NO'nun rolünü değerlendirmek adına spesifik olmayan NOS inhibitörü olan L-NAME kullanıldı. Sonuçlar arasında L-NAME'nin gastrik hasar seviyesinde ciddi bir düşüş oluşturduğu ve bu durumun vitamin D3 varlığında daha da belirgin olduğu gözlenmiştir. Yapılmış çalışmalarda NOS inhibisyonunun midenin etanol hasarına duyarlılığını arttırdığı ya da NO serbestleyen ajanların etanol indüklü mide lezyonlarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Kawano ve ark., 2000), fakat çalışmamızda çıkan farklı sonuç L-NAME'nin NOS inhibisyonundan farklı bir mekanizma ile etki ettiğini düşündürtebilir. Örneğin, yapılmış bir çalışmada L-NAME'in muskarinik reseptörler üzerinde antagonistik etkisinin olduğunu ve bu etkinin L-arjinin tarafından değiştirilemeyeceğini bildirmişlerdir (Buxton ve ark., 1993). Daha önce yapılmış çalışmalarda NO'nun gastrointestinal mukozal hasar

üzerine koruyucu etkisi gösterilmiştir ve bu durum serbest radikal detoksifikasyonu, lökosit adhezyonunun önlenmesi ve mikrosirküler hemodinamisini düzenlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Kubes ve ark., 1991). Yine başka bir çalışmada NO ve süperoksitlerin kimyasal reaksiyonu ile üretilen peroksinitritler gastrointestinal mukozada bariyer disfonksiyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür (Greenacre ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda kullandığımız inflamasyon modelinde vitamin D ve NO ilişkisine benzer bir şekilde Djereba ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Behçet hastalığının aktif dönemindeki hastalarda vitamin D3 düzeyleri düşük saptanmış ve bu durum artmış NO miktarıyla ilişkilendirilmiştir. Vitamin D3'ün NO sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir (Djereba ve ark., 2017). Bu şekilde farklı sonuçların çıkması vitamin D3 ile NO arasındaki ilişkiyi gösterecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunun bir kanıtıdır.

Etanol uygulaması ile oluşturulan akut gastrik hasardaki nekrotik lezyonlardaki artış birden fazla etkenle oluşmaktadır. Etanol uygulaması direkt toksik etkiler oluşturmasının yanı sıra müküs üretimi ve bikarbonat salgılanmasında azalmaya; ayrıca damar duvarlarını yıkarak kan akımında azalmaya neden olmaktadır (Samonina ve ark., 2004). Ek olarak bu model lipid peroksidasyonunu ve reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu arttırmakta; antioksidan sistem aktivitesini azaltmakta ve mitokondri membran depolarizasyonunu bozarak hücreyi ölüme sürüklemektedir (Repetto ve Llesuy, 2002). Bu ülser modeline HCl eklenmesiyle ise gastrik lezyon oluşumu hız kazanmakta ve yoğunlaşmakta; kimyasal ajanlara karşı mukozal koruma zayıflamaktadır (Sun ve ark., 1991). Glutatyon ve bunun yapımı ve yıkımındaki enzimler gastrik mukoza antioksidan savunma sisteminin önemli bileşiklerindedir. Vitamin D3'ün inflamasyon modellerinde antioksidan sisteme olan etkisinin incelendiği çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir araştırmada yüksek yağlı diyetle obezite oluşturulan şıçanlarda vitamin D3 kardiyak oksidatif stresi ve inflamasyon parametrelerini iyileştirmiştir. Bu parametreler arasında glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan sistemin önemli molekülleri yer almıştır (Farhangi ve ark., 2017). Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene yıkımını hızlandıran ve bazı metabolik işlemler sonrasında ortamda radikal oksijen türevlerinin birikimini kontrol eden bir enzimdir (Halliwell, 1990). Literatürde vitamin D uygulaması sonrasında süperoksit anyonlarının en önemli

temizleyicilerinden GPx ve SOD aktivitelerinde artış görülmüştür (Taheri ve ark., 2010). Ayrıca vitamin D3'ün antioksidan özellikleri arasında lipid peroksidasyonunu azaltması, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) enzim ekspresyonunu baskılaması, hidrojen peroksit sonrası oluşan stres aracılı endotel hasarını azaltması, ekstrinsik kaspaz zinciri aktivasyonunu engellemesi, MEK/ERK/SIRT-1 aksını başlatması ve radikal oksijen türleri oluşumunu engellemesi sayılabilir (Uberti ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda glutatyon düzeylerine bakıldığı zaman ülser oluşturulan grupta kontrol grubuna göre mide glutatyon seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlenirken bu düşüş vitamin D3 ön tedavisi verildiği zaman ortadan kalkarak glutatyon seviyelerinde artış gösterdi. Vitamin D3 ile birlikte indometazin verildiğinde ise glutatyon düzeyindeki bu artış anlamlı olarak geriledi. İndometazin uygulandığı zaman çoğu parametrenin daha kötüleştiğini görmekteyiz; bu durum bize vitamin D3'ün antioksidan etkilerini gerçekleştirirken prostaglandin yolağına ihtiyaç duyduğunu düşündürmektedir.

Myeloperoksidaz (MPO) enzimi başta nötrofillerde daha düşük oranda da monosit ve makrofajlarda bulunan bir enzimdir. Doku MPO aktivitesi direkt olarak inflamasyonlu dokudaki nötrofil düzeyi ile orantılıdır (Roumegue're ve ark., 2009). Hasarlı dokuya inflamatuvar hücrelerin gelmesi ve aktivasyonu ile lipid peroksidasyonu artış gösterir ve özellikle nötrofiller ortama yıkıcı proteolitik enzimlerini serbestler. HCl/etanol ile tetiklenen gastrik hasarda nötrofil infiltrasyonu önemli role sahiptir (Santin ve ark., 2013). Çalışmamızda ülser grubunda kontrole göre yüksek mide MPO düzeyleri tespit edilirken vitamin D3 ön tedavisi ile MPO düzeylerinde anlamlı derecede azalma görüldü. Vitamin D3 ile birlikte indometazin uygulandığında MPO seviyelerinde yalnızca vitamin D3 uygulanmış ülser grubuna göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Çalışmamızın sonuçları arasında ülser grubunda artmış gastrik MPO aktivitesinin vitamin D3 uygulaması ile önemli oranda azalması, vitamin D3'ün ülser oranındaki azalışı nötrofil toplanmasını inhibe ederek gerçekleştirdiğini göstermektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda gösterilmiştir ki etanol gastrik mukozada protein olmayan sülfidril gruplarını ve katalaz seviyelerini azaltmaktadır (Pongpiriyadacha ve ark., 2003). Bilindiği üzere protein olmayan sülfidril grupları müküs alt üniteleri arasında disülfid bağları oluşturarak ayrışmasını önlemekte ve serbest radikalleri ortamdan temizlemektedir

(Avila ve ark., 1996). Yine başka bir çalışmada mukozal protein olmayan sülfidril gruplarının muhtemelen gastrik mukozada serbest radikal miktarını azaltması etkisiyle rol alan endojen hücre koruma molekülleri olduğu belirtilmiştir (Szabo ve ark., 1981). Çalışmamızda vitamin D3'ün ülserde MPO düzeyini azaltıcı etkisinin NEM varlığında bozulması vitamin D3'ün sülfidril grupları üzerinden koruyucu bir mekanizmayla etki ettiğini düşündürmektedir. NEM varlığında lipid peroksidasyonu miktarında da benzer bir değişiklik gözlemiş olmamız bunu desteklemektedir. Benzer durum vitamin D3 ile birlikte indometazin uygulandığında görüldü. Vitamin D3'ün tek başına MPO seviyelerini azaltıcı etkisi indometazin eklendiğinde ortadan kalkmıştır.

Çalışmamızda vitamin D3'ün anti-ülserojen etkisi üzerinde K_{ATP} kanallarının rolü K_{ATP} kanal blokleri glibenklamid kullanılarak araştırılmıştır. K_{ATP} kanalları gastrik kan akımı, düzenlenmesi ve kontraktilesi gibi midenin fizyolojik fonksiyonlarında (Garcia ve ark., 1997) rol alan proteinler olup çalışmamızda vitamin D3'ün mide koruyucu etkisi üzerinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Bu sonuç doğrultusunda K_{ATP} kanallarının vitamin D3'ün mide koruyucu fonksiyonunda bir rolü olmadığı sonucu çıkartılabilir.

Vitamin D'nin T hücreleri, interferonlar, interlökinler ve sitokinler gibi immün sistemin çoğu ara elemanına olan etkileri daha önce gösterilmiştir (Hewison, 2012). Daha önce yapılan çalışmalarda, vitamin D eksikliğiyle inflamatuvar bağırsak hastalığı arasında ilişki olduğu ortaya konulmuştur (Wu ve Sun, 2011). Trinitrobenzen sülfonik asit ile indüklenen kronik kolit modelinde vitamin D analoglarıyla inflamasyonda azalma olduğu gözlenmiştir. Bu azalma mikroskopik ve makroskopik düzeylerde düzelmeye, kilo alımı ve kolite özgü immünolojik parametrelerde düzelmeye ile anlaşılabilmiştir (Daniel ve ark., 2008). Benzer şekilde, dekstran sodyum sülfat ile indüklenen kolit modelinde D vitamini eksikliği olan farelerde inflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının D vitamini miktarları yeterli düzeyde olanlara kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (Lagishetty ve ark., 2010). Başka çalışmalarda vitamin D3'ün TNF- α 'ya karşı antagonist etkisinin mevcut olduğu bildirilmiş olup; farklı doku ve organlarda vitamin D3'ün TNF- α 'yı hedef alarak konsantrasyonunu azattığı gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2005). Çalışmamızda kontrol ve tedavisiz ülser grupları arasında serum proinflamatuvar

sitokin IL-1 β ve anti-inflamatuvar sitokin IL-10 düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Diğer taraftan vitamin D3 tedavisi alan ülser grubunda serum IL-1 β düzeyinin kontrol seviyesinin de altında olması ilgi çekicidir. İndometazin tedavisi vitamin D3'ün bu yöndeki etkisini ortadan kaldırarak yüksek seviyelere taşımıştır.

Çalışmamızda ayrıca vitamin D3'ün ülserli mide dokusunda apoptoz ve NF- κ B ekspresyonu üzerine etkileri de çalışılmıştır. Oksidan stres ve eşlik eden bozulmuş redoks durumu mide mukozasında indüklenebilir bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B aktivasyonu ile ilişkilidir. NF- κ B çok fazla sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesinde, ayrıca inflamasyon ve apoptoz gibi çok sayıda hücrel işlevlerde önemli rol oynar (Bindu ve ark., 2013). Çalışmamızda ülser grubunda kontrole göre artmış apoptoz ve artmış NF- κ B ekspresyonu gözlemledik. Vitamin D3 ön tedavisi ile her iki parametrede ülser grubuna kıyasla anlamlı azalmalar tespit ettik. Vitamin D3 ile birlikte L-NAME verildiği zaman NF- κ B düzeyindeki düşüş daha da artış gösterdi. Çalışmamızın immün boyama ve H skoru sonuçları göstermiştir ki HCl/etanol uygulaması gastrik ülserde artmış NF- κ B aktivasyonunu bildiren daha önceki çalışmalarda (Li ve ark., 2013) olduğu gibi NF- κ B ekspresyonunu arttırmıştır. Bu artışın vitamin D3 ile baskılanması vitamin D3'ün gastrik dokudaki bu koruyucu etkisinin NF- κ B baskılanması ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

İnflamasyon ortamında ROS mitokondri membranına hasar vererek apoptoz kompleksinin bir parçası olan sitokrom c serbestlenmesine neden olur. Ayrıca, ROS lizozomların yıkımına neden olarak kaspaz aktivasyonu sağlayan kathepsin serbestlenmesine neden olur. Apoptoz ile ilişkili biyolojik ve morfolojik değişiklikler mitokondri ve kaspaz bağımlı sinyal yolağı aracılığıyla meydana gelir (Trinidad ve ark., 2011). Çalışmamızın sonuçları arasında gastrik ülser grubunda artmış TUNEL boyama vitamin D3 ön tedavisi ile birlikte önemli oranda azaldı. Yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir ki hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozu düzenleyen gen kodlayıcı proteinler vitamin D3 ile ilişki içerisindedirler (Chu ve ark., 2010). Apoptoz grubunda vitamin D3 ile birlikte indometazin uygulaması vitamin D3'ün apoptoz azaltıcı etkisini geriye döndürdü. Literatürde kanser modeli inflamasyon çalışmalarında vitamin D3 apoptoz miktarını arttırırken kendi çalışmamızda azaltıcı bir etkiye rastadık (Yang ve ark., 2017). Aksine, vitamin

D3'ün anti-apoptotik rolü pulmoner epitel hücrelerinde (Shi ve ark., 2016) ve 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit indüklü sıçan kolit modelinde (Zhu ve ark., 2015) kaspaz-3 ve p53 ekspresyonları inhibisyonu aracılığıyla gösterilmiştir. Bu durumun hücreyi apoptoza sürüklemeyen önce nükleer düzeyde koruyucu mekanizmalarla inflamasyonu geriye döndürecek bir rolü olup olmadığını görmek adına ek çalışmalar yapılmalıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda vitamin D3 ile NF- κ B arasındaki antagonist ilişkinin nükleer düzeyde NF- κ B'nin p65 alt ünitesi ve IL-8 promotor bölgesi ekspresyonları aracılığıyla olduğu belirtilmiştir (Tan ve ark., 2008). Fakat kendi çalışmamızda bu parametreler değerlendirilmemiş olup yapılacak farklı bir araştırma ile aralarındaki ilişki bu model üzerinden gösterilebilir. Literatürde vitamin D3 ile inflamasyon ve immün sistem arasındaki ilişkiler IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN- γ , TGF- β , IGF-1, E-kaderin, β -kadenin, IL-8, IL-17, TLR-9 gibi birçok farklı parametre üzerinden değerlendirilmiştir (Samuel ve ark., 2008; Wu ve ark., 2011; Bruce ve ark., 2011).

Sonuç olarak, bu çalışma HCl/etanol ile oluşturulmuş gastrik mukozal hasara karşı vitamin D3'ün gastrik mukozayı koruduğunu ilk defa gösteren çalışma niteliğindedir. Bu koruyucu rolün mekanizması vitamin D3'ün etanol indüklü inflamatuvar reaksiyon, oksidatif stres ve hücrel apoptoz düzeylerini azaltıcı etkisiyle ilişkilendirilebilir. Bu çalışmanın sonuçları vitamin D3 ön tedavisinin anti-inflamatuvar ve anti-oksidan etkileriyle sıçan asidifiye etanol ile oluşturulan mide ülserinde koruyucu olduğunu ortaya koymaktadır. Vitamin D3'ün bu etkilerinde NO ve/veya prostaglandinlerle etkileşiminin açıklığa kavuşturulabilmesi için reseptör düzeyinde ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

Abueid L, Uslu Ü, Cumbul A, Velioglu Ögünç A, Ercan F, Alican İ. Inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in a rat model of myocardial infarction. *Anatol J Cardiol* 2017 Apr; 17(4):269-275.

Adams HR. Prostaglandins: In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Eds: Booth HN, Mc Donald IE. Iowa State University Press, 6th ed.,1988; 459-467.

Adams JS, Hevison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4:80-90.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.

Aggard E. Nitric oxide: Mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199-206.

Akar F, Uydes-Dogan BS, Buharalioglu CK, Abban G, Heinemann A, Holzer P, Van de Voorde J. Protective effect of cromakalim and diazoxide and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. *Eur J Pharmacol* 1999; 374:461–470.

Amirshahrokhi K, Khalili AR. The effect of thalidomide on ethanol-induced gastric mucosal damage in mice: Involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide. *Chem Biol Interact* 2014 Dec 3; 225, 63-69.

Andreo MA, Ballesteros KVR, Hiruma-Lima CA, Machado da Rocha LR, Souza Brito ARM, and Vilegas W. Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; vol. 107, no. 3, pp. 431–441.

Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:7583–7587.

Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. Association between genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-1 gene promoter and peptic ulcers in Japan. *Int J Mol Med* 2007; 20:373.

Ashley SW, Sonneschein LA, Cheung LY. Focal gastric mucosal blood flow at the site of aspirin-induced ulceration. *Am J Surg* 1985; 149:53-9.

Atalay M, Leaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *J Sci Med Sport* 2002; 1: 1-14.

Atalık KE ve Doğan N. Selçuk Üniv Tıp Fak Farmakoloji Abc, Genel Tıp Dergisi 1997;7(3):167-9.

Avila JR, De La Lastra CA, Martin MJ, Motilva V, Luque I, Delgado D, Esteban J, Herrerias J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm Res* 1996; 45:83–88

Bandyopadhyay U, Biswas K, Chatterjee R, Bandyopadhyay D, Chattopadhyay I, ganguly CK, Chakraborty T, Bhattacharya K, Banerjee RK, Gastroprotective effect of Neem bark extract: possible involvement of H-K-ATPase inhibition and scavenging of hydroxy radical. *Life Sci* 2002; 71:2845-2865

Barger-Lux MJ, Heaney RP, Lanspa SJ, Healy JC, DeLuca HF. An investigation of sources of variation in calcium absorption efficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:406-11.

Beierwaltes WH et al. Interaction of the prostaglandin and renin-angiotensin systems in isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 1980; 239 (6): 602-608.

Beuge JA and Aust SD. The thiobarbituric acid assay. *Meth Enzymol* 1978; 52:306-307.

Beutler E. Glutathione in red blood cell metabolism. *A manual of biochemical methods*. 1975; New York, Grune & Stratton, 112-4.

Bindu S, Mazumder S, Dey S, Pal C, Goyal M, Iqbal MS, Sarkar S, Azhar Siddiqui A, Banerjee C, Bandyopadhyay U. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF-kappa B activation and neutrophil infiltration: anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:456-67.

Bouillon R, Camelié G, Daci E, Seagart S, Verstuyf A. Vitamin D Metabolism and Action. *Osteoporos Int* 1998; 8:13-9.

Boyd SC, Sasame HA, Boyd MR. High concentrations of glutathione in glandular stomach: Possible implications for carcinogenesis. *Science*. 1997;205:1010-2.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78: 206-9.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: A novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8:3-11.

Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22 (2): 283-97.

Brown JF, Keates AC, Hanson PJ, Whittle BJ. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *The American Journal of Physiology* 1993 September; 265(3 Pt 1): G418-22

Bruce D, Yu S, Ooi JH, Cantorna MT. Converging pathways lead to overproduction of IL—17 in the absence of vitamin D signaling. *Int Immunol* 2011; 23: 519-528.

Brzozowski T, Konturek PC. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J of Physiology* 2005; 56: Supp 5: 33-55.

Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 1996; 33:181-94

Buxton IL, Cheek DJ, Eckman D, Westfall, DP, Sanders KM, Keef KD. NG-nitro L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circulation*. 1993;72:387-95.

Calatayud S, Barrachina D, Esplugues J. Nitric oxide: Relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Mic Res Technique* 2001;53:325-35.

Calatayud S, Sanz MJ, Canet A, Bello R, de Rojas FD, Esplugues JV. Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. *Br J Pharmacol* 1999; 127:1111-1118

Cendan JC, Topping DL, Pruitt J, Snowdy J, Copeland EM, Lind DS. Inflammatory mediators stimulate arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer line. *J Surg Res USA* 1996; 60(2): 248-88.

Challis JRG and Obson DM. Parturition. In *The Physiology of Reproduction*. Eds: Knobil E, Neill JD et al. Raven Press Ltd New York 1998; Vol 2: 2177-2205.

Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and the beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:820-5.

Chodick G, Amital H, Shalem Y, Kokia E, Heymann AD, Porath A, Shalev V. Persistence with statins and onset of rheumatoid arthritis: a population based cohort study. PLoS Med 2010 Sep; 7;7(9):e1000336

Chu MP, Alagiakrishnan K, Sadowski C. The cure of ageing: Vitamin D - magic or myth? Postgrad Med J 2010;86:608-16.

Curtis Prior PB. Prostaglandins. An introduction to their Biochemistry, Physiology and Pharmacology 1976; North Holland Publishing Company.

Çalışkan D, Koçer H, Kasım İ, Şencan İ, Kahveci R, Özkara A. D Vitamini. Turkish Medical Journal 2012; 6 (2).

Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immun modulatory treatment of TNBS colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper 1/17 to a Th2 and regulatory T cell profile. J Pharmacol Exp Ther 2008;324: 23-33

De Luca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J 2001; 15: 2579-2585.

Djeraba Z, Benlabidi F, Djaballah-Ider FZ, Medjeber O, Arroul-Lammali A, Belguendouz H, Otmani F, Touil-Boukoffa C. Vitamin D status in Algerian Behçet's disease patients: an immunomodulatory effect on NO pathway. Immunopharmacol Immunotoxicol 2017 Aug; 39(4):243-250.

Edwards AD. The pharmacology of inhaled nitric oxide. Arch Dis Child 1995; 72:127-30.

Farhangi MA, Nameni G, Hajiluian G, Mesgari-Abbasi M. Cardiac tissue oxidative stress and inflammation after vitamin D administrations in high fat- diet induced obese rats. BMC Cardiovasc Disord 2017 Jun 19;17(1):161.

Feldman F, Friedman LS, Sleisenger MH. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver disease, WB Saunders Co, Philadelphia, 2002, 615.

Fescanich D, Ma J, Fuchs CS, Kirkner GJ, Hankinson SE, Holli BW, et al. Plasma vitamin D metabolites and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:1502-8.

Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, Morelli A, Lafor SA, Cirino G, Wallace JL. Evidence that 5-lipoxygenase and acetylated cyclooxygenase 2-derived eicosanoids regulate leukocyte-endothelial adherence in response to aspirin. *Br J Pharmacol* 2003; 139:1351-9.

Friedman Marvin H. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: pathophysiology, diagnosis, management. 8th ed. 2006; Volume1; Chapter 50:1091-94.

Friedman LS, Peterson WL. Peptic ulcer and related disorders. In Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th Ed. New York, Mc Graw-Hill, 1998; 1596-1616.

Garcia ML, Hanner M, Knaus HG, Koch R, Schalhofer W, Slaughter RS, Kaczorowski GJ. Pharmacology of potassium channels. *Adv Pharmacol*. 1997;39:425-71.

Ginde AA, Mansbach JM, Camargo Jr Ca. Association between serum 25 hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition examination Survey. *Arch Intern Med* 2009; 169:384-90.

Glavin G and Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: Laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. 1992, *FASEB J*. 6, 825-831.

Gomes AS, Lima LM, Santos CL, Cunha FQ, Ribeiro RA, Souza MH. LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin-induced gastropathy in rats - role of ATP-sensitive potassium channels. Eur J Pharmacol. 2006;547:136–142.

Greenacre S, Ridger V, Wilsoncroft P, Brain S.D. Peroxynitrite: a mediator of increased microvascular permeability. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2001; 24: 880-882.

Gündüz M., Fiziopatoloji. Cilt 1, 1977, F.Ü. Matbaası, Bornova, İzmir.

Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. Free Radical Res Commun, 1990; 9:1–32

Hansdottir S, Monich MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunnighake GW. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. J Immunology 2008; 181:7090-9.

Harvey RA, Champe PC, Biyokimya Lippincott's Illustrated Reviews (Çev. Edt. Ulukaya E.) 5. Ünite Metabolizmasının düzenlenmesi, 28. Bölüm Vitaminler (Çev: Delen Akçay Y), 3.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Yayınevi;2007:384-387.

Hawkey CJ, Rampton DS. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease or treatment. Gastroenterology 2002; 89: 1162-88.

Heath KM, Elovic EP. Vitamin D Deficiency: Implications in the Rehabilitation Setting. Am J PhysMedRehabil, 2006;85:916-923.

Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. Proc Nutr Soc 2012;71;50-61

Holick MF. McCollum award lecture, vitamin D: new horizons for the 21st century. Am J Clin Nutr 1994; 60:619-30.

Holick MF. Vitamin D Deficiency Medical Progress. *N Engl J Med* 2007;357:266-81.

Holick MF. Vitamin D: Important for Prevention of Osteoporosis, Cardiovascular Heart Disease, Type 1 Diabetes, Autoimmune Diseases, and Some Cancers. *South Med J*. 2005;98:1024- 7

Holick MF. Vitamin D: a delightful health perspective. *Nutr Rev* 2008; 66:182-94.

Hollander D, Tarnawski A. Dietary essential fatty acids and the decline in peptic ulcer disease--a hypothesis. *Gut* 1986; 27:239.

Hooderwerf WA, Pasricha PJ. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease, in: L Brunton, Goodman and Gilman's *Pharmacological Basis of Therapeutics*, Mc Graw-Hill, New York, 2006, 967-981

Horton E. Hypothesis on physiological roles of prostaglandins. *Physiological Rev* 1969; 49 (1): 122-153.

Iwata F, Koo A, Itoh M, Lam K, Leung JW, Leung FW., Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. *Life Sci* 1997; 61:1713–1720.

Ji C, Fan D, Li W, Guo L, Liang Z, Xu R, Zhang J. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of the antidepressants duloxetine, amitriptyline, fluoxetine and mirtazapine in different models of experimental gastric ulcer in rats. *Eur J Pharmacol* 2012; 691:46–51.

Kadowitz PJ, Joiner PD, Hyman AL. Physiological and pharmacological roles of prostaglandins. *Annu Rev Pharmacol* 1975; 15:283-306.

Kang JY, Yeoh KG, Chia HP, et al. Chili--protective factor against peptic ulcer? *Dig Dis Sci* 1995; 40:576.

Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, Aydin MS, Yuksel M, Ogunc AV, Alican I. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. *Life Sci* 2011; 89: 402-7.

Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastrointestinal injury and protection. *J Gastrointest Hepatol* 2000;15:D1-D6.

Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Prostaglandinler, Prostaglandinler ve Tromboksanlar. 1986, Cilt 3, 3. Baskı, sayfa 2504-2509, 2586-2613, Ankara.

Kinsella JP, Abman SH. Methemoglobin during nitric oxide therapy with high frequency ventilation. *Lancet* 1993;342:615

Koivisto TT, Voutilainen ME, Farkkila MA. Effect of smoking on gastric histology in *Helicobacter pylori*-positive gastritis. *Scand J Gastroenterol.* 2008. 43 (10):1177-83.

Konturek SJ. *Digestive Diseases and Sciences* November 1985, Volume 30, Issue 11 Supplement 1985; pp 105S-108S.

Kubes P, Susuki M, Granger D. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *PNAS* 1991; 88: 4651-4655.

Kurata JH, Nogawa AN. Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Helicobacter pylori*, and smoking. *J Clin Gastroenterol.* 1997;24:2-17.

Kurtel H, Granger N, Tso P and Grisham MB. Vulnerability of interstitial fluid to oxidant stress. *Am J Physiol* 1992; 263, 573-578.

Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991;174:761-8.

Lagishetty V, misharin AV, Liu NQ, Lisse TS, Chun RF; Ouyang Y, McLachlan SM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. *Endocrinology* 2010;151:2423-2432.

Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection; bench to bedside. *Gastroenterology* 2008; 135:41-60.

Li WF, Hao DJ, Fan T, Huang HM, Yao H, Niu X. Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 208(1):18–27.

Li WF, Huang HM, Niu XF, Fan T, Mu QL, Li HN. Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272:21-9.

Li Y, Wang WP, Wan HY, Cho CH. Intra-gastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxide dependent mechanism in rats. *Eur J Pharmacol*. 2000;299:205-14.

Liu PT, Stenger S, LI H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR et al. Activation of human TLR 2/1 triggers a vitamin D receptor-dependent antimicrobial response. *Science* 2006; 311:1770-3.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-37.

Marshall BJ. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1 (8336): 1273–75.

Martins D, Wolf M, Pan D. Prevalence of cardiovascular factors and the serum levels of 25 hydroxyvitamin D in the United States: data from the third National Health and Nutrition Examination Surveys. *Arch Intern Med* 2007; 167:1159-65.

Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002;8:174-179

Mathieu C, Badenhoop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of art. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16:261-6.

McCafferty DM, Granger DN, Wallace JL. Indomethacin-induced gastric injury and leukocyte adherence in arthritic versus healthy rats. *Gastroenterology*. 1995;109:1173-80.

McCafferty DM, Mudgett JS, Swain MG, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1997 ;112 : 1022-1027.

Mertz HR, Peterson WL, Walsh JH. "Familial hyperpepsinogenemia" and *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:943.

Miller TA. Mechanisms of stress- related mucosal damage. *Am J Med* 1987; 83 (supl 6A): 8-14.

Mincis M, Chebli JMF, Khouri ST, Mincis R. Etanol e o trato gastrointestinal. *Arch Gastroenterol* 1995; 32:131-139.

Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-nitric oxide pathway. *New England Med* 1993;329:2002-12.

Munger KLM, Zhang SM, O'Reilly E. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62:60-5.

Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied pharmacology* 1986; 82: 512-520.

Nemere I, Carson F. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 248:442-9.

Norman AW. Receptors for 1,25(OH)₂D₃: past, present and future. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1360-9.

Oliveira IS, Da Silva FV, Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385:899-908

Ozaras R, Tahan V, Turkmen S, Talay F, Besirli K, Aydin S, Uzun H, Cetinkaya A. Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2-agonist. *Respirology* 2000; 5, (3), 289-292.

Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2008; 6: 23-31.

Özden A. Mikrop ve Mide Hastalıkları. 1.baskı, Ankara 2004:142-143.

Özveri ES, Bozkurt A, Haklar G et al. Estrogens ameliorate remote organ inflammation induced by burn injury in rats. *Inflamm. Res.* 2001; 50: 585–91

Parikh SJ, Edlman M, Uwaifo GI, Freedman R, Semega-Janneh Mreynolds J. The relationship between obesity and serum 1,25 dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1196-9.

Peskar BM, Ehrlich K, Peskar BA. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301:969–974.

Peterson WL, Barnett C, Walsh JH. Effect of intragastric infusions of ethanol and wine on serum gastrin concentration and gastric acid secretion. *Gastroenterology* 1986; 91:1390.

Phull PS, Green CJ, Jacyna MR. A radical view of stomach: the role of oxygen-derived free radicals in gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1995; 7:265-74.

Pique JM, Whittle BJ, Esplugues JV. The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation, *Eur J Pharmacol* 1989; 174:293-296.

Pongpiriyadacha Y, Matsuda H, Morikawa T, Asao Y, Yoshikawa M. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. *Biol Pharm Bull* 2003; 26:651–657

Quan C, Talley NJ. Management of peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or NSAIDs. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2950-61.

Rainsford KD. Structure activity relationships of non steroid anti-inflammatory drug gastric ulcerogenic activity. *Agents Actions* 8, 1978; 587-605.

Ramakrishnan K, Salinas RC. Peptic ulcer disease. *Am Fam Physician* 2007; 76: 1005– 1012.

Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:523–534

Richards JB, Valdes AM, Gardner JP, Paximadas D, Kimu M, Nessa A, et al. Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leucocyte telomere length in women *Am J Clin Nutr* 2007; 86:1420-5.

Robbins, Cotaran, Kumar. *Basis Patology*. 8th ed. 2007; Chapter 15:591-97. 68
Okmeydanı Tıp Dergisi 27(2):65-69, 2011

Robert A, Olafsson AS, Lancaster C, Zhang WR. Interleukin-1 is cytoprotective, antisecretory, stimulates PGE2 synthesis by the stomach, and retards gastric emptying. *Life Sci* 1991; 48:123.

Roumeguère T, Boudjeltia KZ, Babar S , Nuyens V , Rousseau A, Antwerpen PV , Ducobu J, Wespes E, Vanhaeverbeek M. Effects of Phosphodiesterase Inhibitors on the Inflammatory Response of Endothelial Cells Stimulated by Myeloperoxidase-Modified Low-Density Lipoprotein or Tumor Necrosis Factor Alpha. *European Association of Urology*. March 2010 Volume 57, Issue 3, Pages 522–529.

Rotter JI. Peptic ulcer. In: *The principles and practice of medical genetics*, Emery AEH, Rimoin DL (Eds), Churchill Livingstone, New York 1983. p.863.

Saeki T, Ohno T, Kamata K, Arai L, Mizuuchi S, Katori M, Saiqenji K, Majima M. Mild irritant prevents ethanol-induced gastric mucosal microcirculatory disturbances through actions of calcitonin-gene-related peptide and PGI2 in rats. *Am J Physiol* 2004; 286:G68-G75.

Sakaki T, Kagawa N, Yamamoto K, Inouye K. Metabolism of Vitamin D3 by cytochromes P450. *Front Biosci* 2005; 10:119-134

Samonia GE, Kopylova GN, Lukjanzeva SE, Smirnova EA, German SV, Guseva AA. Antiulcer effects of amylin: a review. *Pathophysiology*, 2004; 11:1-6

Samuel S, Sitrin MD. Vitamin D role in cell proliferation and differentiation. *Nutr Rev* 2008; 66 (10 Suppl 2): S116-S124.

Santin JR, Daufenback Machado I, Rodrigues SF, Teixeira S, Muscara MN, Lins Galdino S, da Rocha Pitta I, Farsky SH. Role of an indole-thizolidine molecule PPAR pan-agonist and COX inhibitor on inflammation and microcirculatory damage in acute gastric lesions. PLoS ONE. 2013;8:e76894.

Scott LF, Keneth RM. Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology. Güneş kitabevi, Gönen, 2. baskı, 2007:323-25.

Shi YY, Liu TJ, Fu JH, Xu W, Wu LL, Hou AN, Xue XD. Vitamin D/VDR signaling attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by maintaining the integrity of the pulmonary epithelial barrier. Mol Med Rep 2016;13:1186-94.

Snowden FM. Emerging and reemerging diseases: a historical perspective. Immunol. Rev 2008; 225 (1): 9–26.

Soll AH. Peptic ulcer and its complications. In Feldman M, Scharschmidt B, Slesenger MH. Eds . SlesengerFordtran's Gastrointestinal and Hepatic Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management 6th ed. Philadelphia: Saunders 1998; 620-78.

Soll AH, Isenberg J. Peptic ulcer disease: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and diagnosis.; In Drazen JM, Gill GN, Griggs RC, Kokko JP, Mandel GL, Powell DW, Schafer AI. eds. Goldman Bennett Cecil Textbook of Medicine. 21st Ed. Philadelphia, Saunders, 2000 671-5.

Sonnenberg A, Everhart JE. The prevalence of self-reported peptic ulcer in the United States. Am J Public Health. 1996;86:200–5.

Sozen T. D Hormonu: Güncel Gelişmeler. Hacettepe Tıp Dergisi 2011; 42: 14-27.

Spechler SJ. Peptic Ulcer Disease and Its Complications. In: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Ed by: Feldman M, Freidman LS, Sleisenger MH. 7th ed. Saunders Company, Philadelphia 2002;1:747-781.

Sun XB, Matsumoto T, Yamada H, Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum folcatum* on experimental gastric ulcer in rats and mice. *J Pharm Pharmacol.*, 1991; 43:699-704

Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of Vitamin D in Insulin Resistance. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:1-11.

Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 1981; 214:201–202

Taheri E, Jalali M, Saedi A, Jazayeri A, Rahimi A. Association between 25(OH) D and antioxidant marker in type 2 diabetes mellitus with healthy subjects. *Iran J Diabetes Metab.* 2010;10:502–13

Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D-receptor-mediated sequestration of NF-kappa B signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1741-1752.

Taylor-Robinson AW, Severn A, Phillips RS. Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*. *Parasite-Immunology* 1996;18-8:425-30.

Thiemermann C, Zacharowski K. Selective activation of E-type prostanoid (3) - receptors reduces myocardial infarct size. A novel insight into the cardioprotective effects of prostaglandins. *Pharmacol Ther.*, 2000; 87:61–67

Thomas GN, Hartaigh BO, Bosch JA, Pilz S et al. Vitamin D Levels Predict All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Subjects With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 2012; 35: 1158–1164.

Toroudi HP, Rahgozar M, Bakhtiarian A, Djahanguiri B. Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. *Scand J Gastroenterol.* 1999 Oct; 34(10):962-6.

Tözün N, Şimşek H. *Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji.* MN Medical&Nobel Tıp Kitabevi, Birinci baskı, 2007:91-96.

Trang H, Cole DE, Rubin LA, Pierrtos A, Siu S, Vieth R. Evidence that VD3 increases serum 25hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:854-8.

Trinidad PC, Miryam CF, Gisbert JP. *Helicobacter pylori and Peptic Ulcer-Role of Reactive Oxygen Species and Apoptosis.* In: Chai J, editör. *Peptic Ulcer Disease.* InTech; 2011; p. 165-86.

Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 1-9

Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, Amagase K, Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Physiol Pharmacol* 52, 2001; 391-406.

Türköz Y ve Özerol E. Nitrik Oksit'in etkileri ve Patolojik Rollerini. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1997;4(4):453- 461.

Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, Nava U, Bolis G, Vacca G, Squarzanti DF, Cisari C, Molinari C. Vitamin D protects human endothelial cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Apr; 99(4):1367-74

Wallace JL, Devchand PR. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Br J Pharmacol.* 2005;145:275-82.

Wallace P, Ritchie JR. Prostaglandins a surgeons prospective. *Digestive diseases and sciences* 1989; 31, 32: S-34 S.

Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease, *Circulation.* 2008; 117:503-511.

Webster-Gandy J, Madden A, Holdsworth M, Oxford handbook of nutrition and dietetics. 2nd ed. Oxford University Press, 2012, Oxford.

Whayne TF. Vitamin D. Popular Cardiovascular Supplement But Benefit Must Be Evaluated, *International Journal of Angiology,* 2011;20:63-71.

Whittle BJR. Protective mechanisms of the gastric mucosa, in Gustavsson S, Kumar D, Graham DY (ed): *The stomach.* New York: Churchill Livingstone, 1992, pp 81-101

Whittle BRT. The defensive role played by the gastric microcirculation. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1989; 11, Suppl.1, 35-43.

"WHO Disease and injury country estimates". World Health Organization. 2009. Retrieved 11 November 2009.

Wu S, Sun J. Vitamin D, vitamin D receptor, and macroautophagy in inflammation and infection. *Discov Med* 2011; 11: 325-335.

Yang J, Zhu S, Lin G, Song C, He Z. Vitamin D enhances omega-3 polyunsaturated fatty acids-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Biol Int.* 2017 Aug; 41(8):890-897.

Zengil H, Onuk E, Gökök N, Ercan ZS, Türker RK. Prevention by a new synthetic stable analog of prostacyclin of the gastric lesions due to restraint-cold stress. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 1986; 36 (1): 3. 482-483.


Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9382-5.

Zhu T, Liu TJ, Shi YY, Zhao Q. Vitamin D/VDR signaling pathway ameliorates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by inhibiting intestinal epithelial apoptosis. *Int J Mol Med.* 2015;25:1213-8.

Zhu Y, Mahon BD, Froicu M, Cantorna MT. Calcium and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ target the TNF-alpha pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol.* 2005 Jan; 35(1):217-24.

9. EKLER

9.1 Ek-1 Etik Kurul Onayı

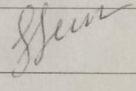
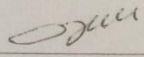
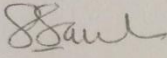
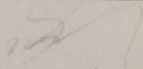


MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

| | | | | |
|-------------------|-------------------------------|--|-----------------------|--|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | PROTOKOL KODU | 87.2014.mar | Çalışma: Doktora Tezi | |
| | PROJE ADI | Sığıçında hidroklorik asit/etanol ile indüklenen mide ülserinde 1.25 – dihidroksi vitamin D3'ün etkisi | | |
| | SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI | Prof.Dr. İnci ALICAN | | |
| | ARAŞTIRMA MERKEZİ | Marmara Üniversitesi Tıp fakültesi Fizyoloji ABD lab. Yeditepe Üniv. Histoloji ve Embriyoloji Lab. | | |
| | DESTEKLEYİCİ | BAPKO | | |

KARAR BİLGİLERİ
Tarih: 06.01.2015
Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ
ÇALIŞMA ESASI
Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.

ÜYELER

| Unvanı / Adı / Soyadı | Uzmanlık Dalı | Kurumu / EK Üyeligi | Onaylanan Proje ile İlişkisi | | Toplantıya katılım | | İmza |
|-------------------------|---------------------------|--|------------------------------|-----|--------------------|-------|---|
| Prof. Dr. Göksel ŞENER | Farmakoloji | M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü | Var | Yok | Evet | Hayır |  |
| Prof.Dr. İnci ALICAN | Fizyoloji | Yürütücü Sekreteri | Var | Yok | Evet | Hayır | YÜRÜTÜCÜ |
| Prof. Dr. Ayşen YARAT | Biyokimya | M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi | Var | Yok | Evet | Hayır |  |
| Doç.Dr. Serap ŞIRVANCI | Histoloji Embriyoloji ABD | M.Ü Tıp Fakültesi | Var | Yok | Evet | Hayır |  |
| Doç.Dr. Rezzan AKER | Farmakoloji | M.Ü Tıp Fakültesi | Var | Yok | EVET | HAYIR | |
| Doç.Dr. Gürkan SERT | Tıp Tarihi ve Etik | M.Ü Tıp Fakültesi | Var | Yok | Evet | Hayır |  |
| Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ | Veteriner Hekim | M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri | Var | Yok | Evet | Hayır |  |
| Bio. Arif GÜMÜŞ | Biyoloji | İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye | Var | Yok | Evet | Hayır | |
| Bilal AYĞOR | Emekli Memur | Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye | Var | Yok | Evet | Hayır | |

10. ÖZGEÇMİŞ

| | | | |
|-------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| Adı | Hasan Hüseyin | Soyadı | Şahin |
| Doğum Yeri | Gülнар | Doğum Tarihi | 16.10.1985 |
| Uyruđu | T.C | Tel | 05327933686 |
| E-mail | hassah54@hotmail.com | | |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|-------------------------|------------------------------------|----------------|
| Doktora/Uzmanlık | | |
| Lisans | Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi | 2009 |
| Lise | Sakarya Atatürk Süper Lisesi | 2002 |

İş Deneyimi

| Görevi | Kurum | Süre (Yıl - Yıl) |
|--------|--|------------------|
| Doktor | Kaynarca İlçe Hastanesi | 2009-2010 |
| Doktor | Sakarya Eđt ve Arş Hastanesi | 2010-2011 |
| Doktor | İstanbul Gürsel ASM | 2011-2012 |
| Doktor | İstanbul Mevlana ASM | 2012-2014 |
| Doktor | Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi | 2014-halen |

| Yabancı Dilleri | Okuduđunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|-----------------|-------------------|----------|--------|
| İngilizce | Çok İyi | İyi | İyi |

| Yabancı Dil Sınav Notu # | | | | | | | | |
|--------------------------|------|-------|-----------|-----------|-----------|--------|-----|-----|
| YDS | ÜDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | YÖKDİL | CAE | CPE |
| 73,75 | 72,5 | | | | | 83,75 | | |

| | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|-------------------|---------|--------------|-------|
| ALES Puanı | 79,1 | 79,6 | |

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanma becerisi |
|------------------------------------|-------------------|
| MS Office, Excel, Word, PowerPoint | Çok iyi |

BİLDİRİLER/YAYINLAR:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

- 1) Deniz M, **Sahin HH**, Tekin S, Yeşiller M, Ağaoğlu B, Cetinel S, Yeğen BÇ. Nicotine withdrawal alleviates acetic acid-induced gastric injury in rats. Environ Toxicol Pharmacol. 2009 Mar;27(2):200-5. doi: 10.1016/j.etap.2008.10.006. Epub 2008 Oct 28.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

- 1) M.Deniz, S.Tekin, G.Cakirsoy, M.Pehlivançik, T.Ocek, H.Caglioz, N.Orak, N.Poci, **H.H.Sahin**, S.Arbak, B.C.Yegen. Central administration of Glucagon like peptid-2 (GLP-2) alleviates Ethanol-induced oxidative gastric damage in rats. Digestive Disease Week 2007, May 19-24, Washington /USA, 2007.
- 2) Nuray Alaca , Dilek Özbeyli, Serap Uslu, **Hasan H. Şahin**, Hızır Kurtel, Berrak C. Yeğen. Treatment with Milk Thistle, Ursodeoxycholic Acid or Their Combination Attenuates Liver Injury in Bile Duct-Ligated Rats. Digestive Disease Week 2015, May 16-19, Washington, USA, 2015.
- 3) **Hasan Hüseyin Şahin**, Ozge Borklu, Pemra Unalan. How can we establish positive communication with the caregivers in home care visits? 20th Wonca Europe Conference, October 22-25, Istanbul, Turkey, 2015.
- 4) Mustafa Deniz, Serap Arbak, **Hasan H. Sahin**, Nertila Poci, Nilay Orak, Bahar Uslu, Berrak C. Yegen. Centrally administered oxytocin alleviates oxidative gastric damage in rats: Light, Transmission and Scanning Electron Microscopical study. The 16th International Microscopy Congress-September 3-8, Sapporo, Japan, 2006

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. **Hasan Hüseyin Şahin** ve A. Altuğ Çiçin. Gingival Hyperplasia and Aggressive Periodontitis Induced by Long Term Nifedipine Use. Turkish Family Physician, Issue 2, 2015.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- 1) Nurav Alaca, Dilek Ozbeyli, Serap Uslu, **Hasan Hüseyin Şahin**, Gurkan Yigitturk, Hızir Kurtel, Gilperi Oktem, Berrak C. Yegen. Safra yolu ligasyonu ile kolestaz oluşturulmuş sıçanlarda Silybum marianum ekstraktının, ursodeoksikolik asitin ve kombine tedavinin hepatik kök hücrelere ve karaciğer hasarına etkisi. 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 9-13 Eylül, Çanakkale, Türkiye, 2015.
- 2) **Hasan Hüseyin Şahin**, Saliha Serap Cifcili, Omer Karahan, Burcu Basaran, Senem Bugdayci. Olgu Sunumu: Ev temizliği sonrası Refleks Sempatetik Distrofi Sendromu, 9. Aile Hekimliği Güz Okulu, 1-5 Mayıs, Antalya, Türkiye, 2015.
- 3) Senem Bugdayci, Mehmet Akman, **Hasan Hüseyin Şahin**, Burcu Basaran, Emre Yilmaz. Birinci Basamakta Obstrüktif Uyku Apne Tanısı: Metodolojik bir çalışma. 7. Aile Hekimliği Araştırma Günleri, 2-5 Nisan, Antakya, Türkiye, 2015.
- 4) Emre Yilmaz, Pemra Unalan, **Hasan Hüseyin Şahin**, Senem Bugdayci, Arzu Uzuner. Aile Hekimliği Obezite Polikliniği Başvurularının 1 Yıllık Değerlendirilmesi. 9. Aile Hekimliği Güz Okulu, 1-5 Mayıs, Antalya, Türkiye, 2015.
- 5) M.Deniz, S.Tekin, G.Cakirsoy, M.Pehlivancik, T.Ocek, H.Caglioiz, N.Orak, N.Poci, **H.H.Şahin**, S.Arbak, B.C.Yegen. The effects of Oxytocin on oxidative gastric damage and anxiety in rats. 32. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 18-22 Eylül, Denizli, Türkiye, 2006.
- 6) M.Deniz, **H.H.Şahin**, S.Tekin, M.Yesiller, N.B.Agaoglu, S.Cetinel, B.C.Yegen. The effects of nicotine on pathogenesis of gastric ulcer in rats. 31. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 27-30 Eylül, Gaziantep, Türkiye, 2005.