

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

UZUN SÜRELİ DÜŞÜK DOZ ASPİRİN KULLANIMININ
GASTRİK-DUODENAL ETKİLERİ VE GLUTATYON-VİTAMİN C-E'NİN
KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. SEHER AYDOĞAN

SAMSUN/ Mart 2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

UZUN SÜRELİ DÜŞÜK DOZ ASPİRİN KULLANIMININ
GASTRİK-DUODENAL ETKİLERİ VE GLUTATYON-VİTAMİN C-E'NİN
KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. SEHER AYDOĞAN

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. RAMAZAN AMANVERMEZ

SAMSUN/ Mart 2011

İÇİNDEKİLER

Tablolar	IV
Şekiller	V
Kısaltmalar	VI
Özet	VIII
Summary	IX
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Asetilsalisilik Asid	3
2.1.1. Tarihçesi	3
2.1.2. Etki Mekanizması	3
2.1.2.1. Siklooksijenaz Enzimi	3
2.1.2.2. Prostaglandin Vücuttaki Görevleri	4
2.1.3. Aspirin Kullanım Alanları ve Dozu	6
2.1.4. Farmakokinetiği	6
2.1.5. Yan Etkileri	6
2.2. Aspirin ve Gastrointestinal Hasar Patogenezi	8
2.2.1. Gastrik Mukozanın Özellikleri	8
2.2.2. Topikal Etkiler	9
2.2.3. Sistemik Etkiler	10
2.2.3.1. Siklooksijenaz İnhibisyonu	10
2.2.3.2. Hipermotilitenin Rolü	10
2.2.3.3. Asidin Rolü	11
2.2.3.4. Aspirinin Tetiklediği Lipoksinin (ATL) Rolü	11
2.2.3.5. Mukozal Kan Akımı, Sitokinler ve Nötrofiller	11
2.2.3.6. Büyüme Faktörlerinin Rolü	12
2.2.3.7. Stres Proteinleri	12
2.2.3.8. Poliaminler	13
2.2.3.9. Melatonin	14
2.2.3.10. Matriks Metalloproteinazlar	14
2.2.3.11. Genetik Durumlar	14
2.2.3.12. Nitrik Oksidin Rolü	15

2.3. Oksidan ve Antioksidanlar	15
2.3.1. Serbest Radikaller	15
2.3.2. Oksijen Radikalleri	16
2.3.2.1. Singlet Oksijen	17
2.3.2.2. Süperoksid Radikali	18
2.3.2.3. Hidroksil Radikali	18
2.3.2.4. Hidrojen Peroksid	18
2.3.3. Reaktif Nitrojen Ürünleri	19
2.3.3.1. Nitrik Oksit ve Peroksinitrit	19
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	19
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar	20
2.4.1.1. Süperoksid Dismutaz	20
2.4.1.2. Katalaz	21
2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz	21
2.4.1.4. Glutasyon –S- Transferaz	23
2.4.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar	23
2.4.2.1. Vitamin C (Askorbik Asid)	23
2.4.2.2. Vitamin E (α -Tokoferol)	25
2.4.2.3. Redükte Glutasyon	26
2.4.2.3.1. Sentezinin Düzenlenmesi ve Fonksiyonları	28
2.4.3. Diğer Antioksidanlar	31
2.5. Protein Oksidasyonu	31
2.5.1. Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu (PCO)	33
2.5.1.1. Aminoasit Zincir Oksidasyonu ile Karbonil Grupları Oluşumu	34
2.5.2. Sülfür İçeren Aminoasitlerin Oksidasyonu	34
2.5.3. Nitrotirozin (NT) Oluşumu	35
2.5.4. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu	35
2.6. Lipid Peroksidasyonu	36
3. Gereç ve Yöntem	37
3.1. Kullanılan Cihazlar	37
3.2. Kullanılan Kimyasallar	37
3.3. Çalışma Populasyonunun Özellikleri	39

3.3.1. Çalışmanın Uygulanması	39
3.3.1.1. Aspirin Solusyonu Hazırlanması	39
3.3.1.2. Antioksidan Solusyonunun Hazırlanması	39
3.3.1.3. Deneyin Yapılışı	39
3.4. Biyokimyasal Analizler	40
3.4.1. Serum ve Doku Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini	40
3.4.2. Serum ve Doku Protein Oksidasyon Düzeyinin Tayini	41
3.4.3. Doku Myeloperoksidaz (MPO) Aktivite Tayini	44
3.4.4. Doku Hsp 70 Seviyesi Tayini	45
3.4.5. Total Tiyol Tayini	46
3.4.6. Protein Miktarının Tayini	47
3.5. Mide ve Duodenum Patolojik Değerlendirmesi	48
3.6. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	48
4. Bulgular	48
4.1. Biyokimyasal Parametreler	49
4.2. Patolojik Bulgular	55
5. Tartışma ve Sonuç	58
6. Kaynaklar	64

TABLolar:

Tablo I. Hücrelerde serbest radikal kaynakları	16
Tablo II. Oksijen Türevi Bileşikler	17
Tablo III. GSH-Px izoenzimlerinin doku dağılımı	22
Tablo IV. Serum ve doku lipid peroksidasyon düzeyi tayininin çalışma prosedürü	41
Tablo V. Serum protein oksidasyonu düzeyi tayininin çalışma prosedürü	43
Tablo VI. Doku protein oksidasyonu düzeyi tayininin çalışma prosedürü	43
Tablo VII. Doku MPO aktivite düzeyi tayininin çalışma prosedürü	45
Tablo VIII. Doku total tiyol düzeyi tayininin çalışma prosedürü	47
Tablo IX. Protein miktarının tayini çalışma prosedürü	48
Tablo X. Mide ve duodenum histopatolojik lezyon skoru	49
Tablo XI. Serum protein oksidasyonu ve serum MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı	50
Tablo XII. Mide dokusunda çalışılan testlerin gruplara göre dağılımı	50
Tablo XIII. Duodenum dokusunda çalışılan testlerin gruplara göre dağılımı	51
Tablo XIV. Mide histopatolojik skorlaması	56
Tablo XV. Duodenum histopatolojik skorlaması	56

ŞEKİLLER:

Şekil 1: Asetilsalisilik Asid	3
Şekil 2: Prostaglandinlerin Sentezi	5
Şekil 3: Mide Mukus Bariyer Yapısı	9
Şekil 4: Hsp 70'in Antiapoptoz Mekanizması	13
Şekil 5: Askorbik Asid Sentezi	24
Şekil 6: Askorbik Asid Metabolizması	24
Şekil 7: Tokoferoller	26
Şekil 8: Glutasyon	27
Şekil 9: Sistein Siklusu	30
Şekil 10: Redoks Siklusu	30
Şekil 11: Peptid omurgasının oksidasyonu	32
Şekil 12: Aminoasit yan gruplarının oksidasyonu	34
Şekil 13: Grupların serum MDA düzeylerinin grafiği	52
Şekil 14: Grupların mide MPO aktivite düzeylerinin grafiği	53
Şekil 15: Grupların mide mukozası hsp 70 düzeylerinin grafiği	54
Şekil 16: Grupların duodenum total tiyol düzeylerinin grafiği	55
Resim 1: ASA grubunda mide mukozası	57
Resim 2: ASA+antioksidan grubunda mide mukozası	57

KISALTMALAR VE SİMGELER

ASA	Asetilsalisilik asid
COX	Siklooksijenaz enzimi
NSAID	Non-steroid antiinflamatuvar ilaç
ROS	Reaktif oksijen radikalleri
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ATL	Aspirin Triggered Lipoksin
CGRP	Calcitonin gene related peptide
VEGF	Vasküler endotelial growth faktör
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
IL-1 β	İnterlökin-1 β
PAF	Platlet aktive edici faktör
EGF	Endotelial growth faktör
TGF- α	Transforming growth faktör
HGF	Hepatosit growth faktör
FGF	Fibroblast growth faktör
PDGF	Platlet derived growth faktör
IGF-1	İnsülin like growth faktör
Hsp 70	Heat shock protein 70
MMP	Matrix metalloproteinaz
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentetaz
n NOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
R \cdot	Serbest radikal
O ₂ \cdot	Süperoksit radikali
OH \cdot	Hidroksil radikali
ROO \cdot	Peroksil radikali
RO \cdot	Alkoksil radikali
RS \cdot	Tiyil radikali
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit

NO	Nitrik Oksit
ONOO ⁻	Peroksinitrit
SOD	Süperoksid Dismutaz
GSH -Px	Glutatyon Peroksidaz
c-GPx	Stoplazmik Glutatyon Peroksidaz
p-GPx	Plazma Glutatyon Peroksidaz
PH-GPx	Fosfolipid Hidroperoksid Glutatyon Peroksidaz
GI-GPx	Gastrointestinal Glutatyon Peroksidaz
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
GR	Glutatyon redüktaz
GST	Glutatyon S-transferazlar
GSH	Redükte glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GCS	γ -glutamil sistein sentaz
GCL	Glutamat sistein ligaz
NF κ B	Nükleer Faktör kappa B
PCO	Protein Karbonilleri
AOPP	Advanced Oxidation Protein Products
MDA	Malonaldialdehid
TCA	Trikloroasetikasid
DTNB	Dithiobis-2-nitrobenzoik asid
TBA	Thiobarbitirik asid
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
TBARS	Tiyobarbitürik asid-reaktif substratları
DTPA	Dietilentriaminpenta asetik asid
MPO	Myeloperoksidaz
DTNB	Ditiyobis-2-nitrobenzoik asid
DMSO	Dimetilsülfoksit
TMB	Tetrametilbenzidin
PBS	Phospat buffer solution
HO-1	Hem Oksijenaz-1
NT	Nitrotirozin

ÖZET

Düşük doz aspirin, iskemik kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklarda, olası trombus ve emboli'nin önlenmesinde en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. Ancak, aspirin hem topikal hemde sistemik etki göstererek özellikle gastrointestinal mukozal kanama ve ülserleşmeye sebep olabilir. Mukozal hasara, protaglandin yetersizliği, nötrofil-aracılı inflamasyon ve oksidatif stres'in sebep olabileceği ifade edilmektedir. GSH, vitamin C ve E iyi bilinen güçlü antioksidanlardır. Düşük doz aspirinin mukoza üzerine olan hasar verici etkileri, bu antioksidanlarla önlenir. Amacımız, uzun dönem düşük doz aspirin kullanımına bağlı oluşabilecek gastrik ve duodenal hasarın önlenmesidir.

Deneyel çalışma protokolüne göre; erişkin erkek ratlar her grupta 8'er olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kontrol gruba serum fizyolojik, ASA gruba aspirin (1,44 mg/kg/gün) ve ASA + antioksidan alan gruba ise aspirin (1,44 mg/kg/gün) + vitamin C (50 mg/gün), vitamin E (25 mg/gün) ve glutatyon (25 mg/gün) 40 gün boyunca gavaj ile intragastrik verildi. Ayrıca ratlar çalışma süresince normal rat diyeti ile beslendiler. Tedavi sonrası kan, mide ve duodenum patolojik ve biyokimyasal inceleme için alındı.

ASA grubundaki ratların mide ve duodenumları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla patolojik bulguya sahipken, ASA + antioksidan alan grubun patolojik bulguları ASA grubundan daha az bulunmuştur. Mide mukozal doku MPO enzim aktivitesi ASA grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu. Ancak ASA grubuna kıyasla, ASA + antioksidan grubunda MPO aktivite düzeyi anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,01$). Ayrıca, ASA grubunda mide mukozal doku hsp 70 düzeyi, kontrol grubuna göre yüksek belirlendi ($p<0,05$). Bununla birlikte ASA grubuna kıyasla, hsp 70 düzeyleri ASA + antioksidan grubunda istatistiksel olarak düşük bulundu ($P<0,05$). Sonuç olarak, GSH-vitamin C ve E'nin aspirinle beraber alınması gastrik hasarı hafifletmiştir. GSH-vitamin C-E kombinasyonu, uzun dönem düşük doz aspirin kullanımına bağlı oluşan gastrik mukozal hasara karşı koruyucu olabilir.

Anahtar kelimeler: Düşük doz aspirin, oksidatif stres, gastroduodenal mukozal hasar, antioksidan

SUMMARY

Low dose aspirin is widely used for the prevention of probable thrombus and embolus in patients suffering from ischemic heart disease and ischemic cerebrovascular disease. However this drug acts both topically and systemically and aspirin might lead to hemorrhage and ulceration on gastrointestinal mucosa. It is expressed that the insufficiency of prostaglandin, neutrophil-mediated inflammation and oxidative stress may cause mucosal injuries. GSH, vitamin C and E are the potent anti-oxidants. It is hypothesized that GSH-vitamin C-E may protect to the upper gastrointestinal mucosa against low dose aspirin's adverse effects. The aim of this study is the preventing of gastric and duodenal damage induced by low dose aspirin on a long-term basis.

The adult male rats were randomly divided into three groups of 8 each. Rats were fed regular diets and maintained for 40 days in the control group, the L-ASA group, which was given aspirin (1.44 mg/kg/day) administered intragastrically by feeding tube to rats, or the L-ASA with antioxidant supplement group, to whom 1.44 mg of aspirin/kg/day + a solution that contained 50 mg vitamin C, 25 mg vitamin E and 25 mg GSH was administered intragastrically by feeding tube to rats everyday. After the treatments, blood, stomach and duodenum were taken for pathological and biochemical analysis.

The stomach and duodenum of the ASA group rats had higher scores of pathological findings compared with the control group, whereas the scores of the antioxidant-supplemented group were lower than the ASA group. In addition, gastric MPO activity was higher in the ASA group than control group. The MPO activity in the gastric mucosa is significantly lower in the ASA + antioxidant group than ASA group ($p < 0,01$). Hsp 70 levels in the ASA group were measured higher than the control ($p < 0,05$). But its levels were lower in the ASA + antioxidant group than ASA group ($p < 0,05$). In conclusion, a simultaneous intake of GSH-vitamin C-E along with aspirin attenuated the gastric injury. GSH-vitamin C and E could play a protective role in the stomach against gastric damage resulting from low dose daily long-term aspirin use.

Key words: Low dose aspirin, oxidative stress, gastroduodenal mucosa damage, antioxidant

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri; tez danışmanım Doç. Dr. Ramazan Amanvermez'e, Prof.Dr. Abdülkerim Bedir'e, Doç. Dr. Nermin Kılıç'a, Yrd. Doç. Dr. Birşen Bilgici'ye, Yrd. Doç.Dr. Bahattin Avcı'ya, Yrd. Doç.Dr. Özgür Korhan Tunçel'e, Yrd. Doç.Dr. Hasan Alaçam'a, Arş. Gör. Dr. Murat Günay ve diğer asistan arkadaşlarıma, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Not: Bu çalışma (PYO. TIP. 1904.09.024) Ondokuz Mayıs Üniversitesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ticari ilaç formunda bulunan aspirin, birçok hastalığın tedavi ve profilaksisinde günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar etkilerinden dolayı tedavi amacıyla kullanılan aspirin ayrıca antitrombotik etkisi nedeniyle, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklarda, trombüs ve emboli oluşumunu önlemek için düşük dozda, uzun dönem yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Aspirinin tedavi ve korunmada kullanımını sınırlayan en önemli yan etkisi gastrointestinal sistem üzerine olan yan etkileri olmuştur. Bu yan etkiler basit erozyondan yaygın gastrik ülser, perforasyon ve kanamaya kadar giderek hayatı tehdit edebilir. Düşük doz aspirin kullanımıyla gastrointestinal yan etkiler azalmış görülse de risk gruplarında ülserasyon ve kanamalar oluşmaktadır (1,13,14,35,72,77,87).

Aspirinin yaptığı gastrointestinal mukoza hasarının patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Ancak sistemik ve topikal olarak basitçe sınıflandırılabilir (45). Sistemik yan etki COX inhibisyonu sayesinde olur ve prostaglandinlerin azalmasıyla birliktedir. Mide ve duodenum mukozası için koruyucu olan prostaglandinlerin azalması ülser oluşumunu kolaylaştırır. Topikal yan etki ise ilacın yapısıyla ilgilidir. Zayıf asit yapısında olan aspirin midede non iyonize formdadır ve tamamına yakını mide ve bağırsaklardan absorbe olur. Mide yüzey fosfolipidleriyle etkileşerek mide mukus bariyer yapısını bozar. Mide asidinin geri difüzyona sebep olarak nötrofil-aracılı inflamasyonu ile lokal doku hasarını başlatır. Ayrıca noniyonize formdaki aspirin mitokondrial iyon tuzağı oluşturarak mitokondrial oksidatif fosforilasyonun ayrılmasına sebep olur. Böylece ATP depleasyonu ve ROS oluşur. Topikal ve sistemik etkiler sonucu lökositlerin hasar alanına göçü artar. Artan lökosit göçü sonrası, nötrofil MPO aktivitesinin artması ROS oluşumunu artırır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı artması sonucu, doku antioksidan kapasitenin yetersiz kalması ile makromoleküler hasar başlar (18,29,30,34,39,40,41,55).

Gastrointestinal sistemde en önemli antioksidanlar, enzim olanlar ve enzim olmayanlar olarak iki kısımda incelenir (2,93). Vitamin C, E ve glutatyon gastrointestinal sistemin önemli antioksidanlarıdır (93). Aspirinin hem topikal hem de sistemik yan etkileri sonucunda oluşan ROS gastrointestinal mukozal hasarın patogenezinde önemli role sahiptir (45). ROS'un aşırı artması ve antioksidan

yetersizlikte oksidatif stres meydana gelir. Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların yaptığı gastrik hasarda oksidan stresin varlığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (21,48,49,55,71,73,91,93).

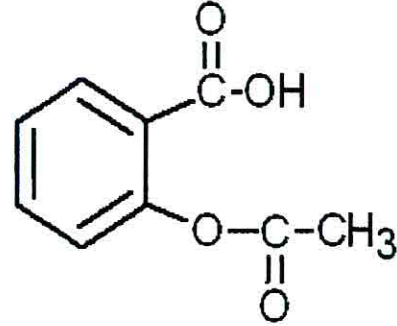
Aspirin kullanımına bağlı oluşan üst gastrointestinal hasarların gastroprotektif ajanlar (fosfotidilkolin, H₂ reseptör antagonistleri, proton pompainhibitörleri) ve antioksidan kullanılarak önlenmesi son yıllarda önem kazanmıştır. Aspirinin yaptığı gastrointestinal mukozal hasarın antioksidanlarla önlenmesi konusunda hayvan ve insan çalışmaları yapılmıştır. C ve E vitamininin antioksidan özelliğinden dolayı aspirinin sebep olduğu gastrik hasarda kullanılmış ve gastrik mukozal doku hasarını kısmen de olsa azalttığı gösterilmiştir (31,33,36,37,45,55,71,91). Bu çalışmalar incelendiğinde aspirin dozu yüksek tutulmuş ve çalışma kısa sürede sonlandırılmıştır. Ancak hastalar düşük doz aspirini (50-325 mg/gün) uzun dönem kullanmaktadırlar (1,13,14,77). Bu nedenle amacımız, uzun süreli düşük doz aspirin kullanımına bağlı gastrik ve duodenal mukozal hasarın patolojik ve biyokimyasal oksidatif stres markırları ile belirlenmesi ve vitamin C/ E / glutatyon kombinasyonu ile bu mukozal hasarın önlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ASİRİN (ASETİLSALİSİLİK ASİD, ASA)

2.1.1. Tarihçesi

Söğüt ağacı yapraklarının ve kabuklarının ağrı kesici ve ateş düşürücü özelliği yaklaşık bin yıldan beri biliniyordu. 1897'de Bayer'in kimyacısı Felix Hoffmann asetilsalisik asid sentezlemeyi başarmış ve aspirin ticari ismi ve patenti alınmıştır. Aspirin başlangıçta ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılmış, antiinflamatuvar etkisini prostaglandin sentezini inhibe ederek gerçekleştirdiği 1971 yılında John Vane tarafından açıklanmıştır. İlk kez John Vane doku zedelenmesinde prostaglandinlerin rolünü ve aspirinin PGE₂ ve F_{2α} biyosentezini inhibe ettiğini göstermiştir. Aspirinin antiinflamatuvar etki mekanizmasını açıklaması buluşuyla John Vane, 1982 yılında Nobel ödülü almıştır (77,79,80).



Şekil:1 Asetilsalisilik Asid

2.1.2 Etki Mekanizması

2.1.2.1. Siklooksijenaz Enzimi (COX Enzimi)

Siklooksijenaz ya da diğer adıyla PGH₂ sentetaz, araşidonik asidden prostaglandinlerin sentezini iki basamakta katalizleyen bir enzimdir (Şekil 2). Bu enzim ilk kez 1976'da izole edilmiştir. Siklooksijenaz enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu vardır. COX-1 mide mukozası, trombositler, endotel hücreleri ve böbrekte bulunur ve hücre koruyucu protoglandinlerin yapımından sorumludur. COX-2 izoformu mitojenler, sitokinler ve endotoksinler tarafından indüklenebilen formudur.

İnsanlarda sağlam mide dokusunda COX-2 izoformları bulunmamasına rağmen ratlarda varlığı gösterilmiştir. İnsanlarda gastrik mukozanın H. Pylori enfeksiyonu, ülseratif kolit ve gastrik ülserin iyileşme döneminde COX-2 enzimi ekspresyonları artmıştır. Bu izoform inflamatuvar etkili prostaglandinlerin sentezinden sorumludur. Aspirin, enzimin her iki izoformunu da geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. COX-1 ve COX-2 izoformları birbirleri ile % 60 homoloji gösterirler (32,64).

COX-1 izoformunun, epidermal growth faktör like domain, membran binding domain ve enzimatik domain olmak üzere 3 domaini vardır. Araşidonik asid enzimin aktif bölgesine bağlanır ve prostaglandin sentezi gerçekleşir. NSAI ilaçlar araşidonik asidle enzimin aktif bölgesine bağlanmak için yarışır. Aspirin enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsünü selektif olarak asetiller. Bu asetilasyon sonucu enzim geri dönüşümsüz olarak inhibe olur. Aspirinin COX-1'e olan ilgisi, COX-2'den 100-150 kat fazladır. Bu durum aspirinin düşük dozlarda antitrombosit, yüksek dozlarda antiinflamatuvar etki göstermesini açıklamaktadır (32,79,80).

Aspirin antiinflamatuvar, antipiretik ve antitrombotik etkilerini COX enzimini inhibe ederek gösterir. Deneysel olarak oluşturulan iltihap modellerinde aspirin, prostaglandin, prostasiklin ve tromboksan sentezini inhibe eder. İn vitro deneylerde aspirinin COX-1'i inhibe etme gücü salisilatunkinden yaklaşık 10 kat fazla iken, COX-2'yi inhibe etme gücü ancak 3 kat fazladır. Bu durum, salisilatın aspirine göre oldukça düşük antitrombositik etki yaptığı halde ona yakın derecede analjezik ve antiinflamatuvar etki göstermesini açıklayabilir (32,64,79,80).

2.1.2.2. Prostaglandinlerin Vücuttaki Görevleri

Prostaglandinlerin vücuttaki görevleri şunlardır (64,74,79,80,83).

A. Gastrointestinal sistemde PGE2 ve sitoprotektif etkisiyle gastrik ve duodenal erozyon ve ülserasyonlara karşı koruyucudur.

B. PGF_{2α}, PGD₂, TXA₂ ve PGI₂ akciğerlerde bronkokonstrüktif etkiye sahipken, PGE₂ bronkodilatatör etkiye sahiptir. PGI₂ akciğerlerde potent vazodilatatördür.

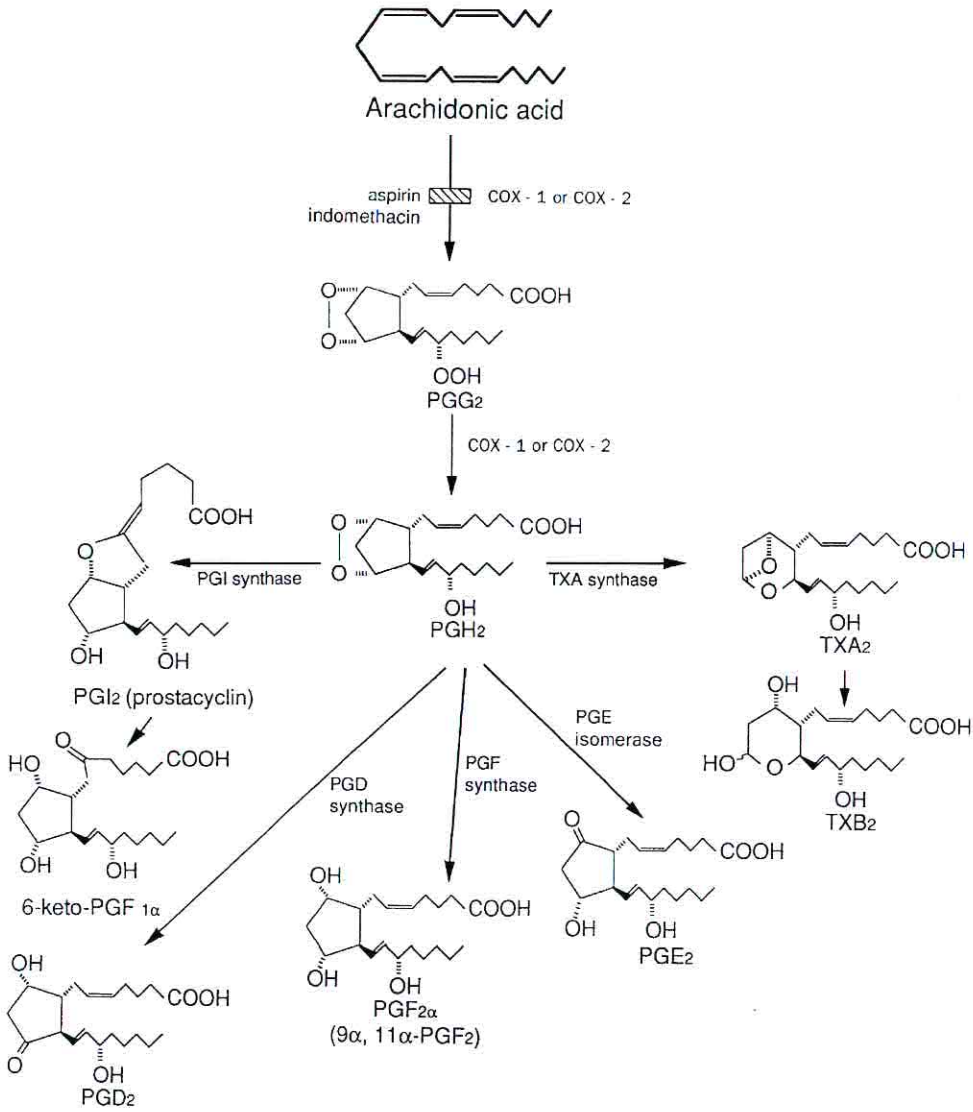
C. Endotel hücreleri tarafından üretilen PGI₂'nin damarlarda vazodilatasyon yapıcı ve trombosit agregasyonunu önleyici özellikleri mevcuttur.

D. PGE₂ ve PGI₂ böbrek damarlarında vazodilatasyon yaparak, böbrek kan akımını artırır. Renal fonksiyonların sürdürülmesi için PG üretimi gereklidir. NSAI ilaçlar ve

aspirin prostaglandin sentezini azalttığından, konjestif kalp yetmezliği, siroz ve renal yetmezlikli hastalarda renal kan akımını azaltarak renal iskemi riski oluşturmaktadırlar.

E. IL-1 ve lipopolisakkaritlere cevap olarak uyarılan, hipotalamus damar endotel hücrelerinde bulunan, COX-2 izoenzimi tarafından oluşturulan, PGE2 vücuttaki ısı artışından sorumludur.

F. PGF_{2α}, uterin kontraksiyonlara yol açmaktadır. PG'ler ovulasyon sırasında da önemli görevlere sahiptirler.



Şekil: 2. Prostaglandinlerin Sentezi (83)

2.1.3. Aspirin Kullanım Alanları ve Dozu

Aspirin, NSAİ'lar içinde en sık kullanılanı ve en ucuz olanıdır. Yüzyıldır kullanılmakta ve analjezik ve antiinflamatuvar değerini korumaktadır. Aspirin genelde oral yoldan tablet şeklinde kullanılır. Analjezik olarak 0,5-0,75 g mutad dozda kullanılır. Gerekliğinde 4-6 saatte bir tekrarlanabilir, ancak günlük total doz 4 g'ı geçmemelidir. Romatizmal ateşli olgularda, ağır kardit durumu yoksa, kan salisilat düzeyi 25-35 mg/dl arasında tutulacak şekilde ilacın dozu ayarlanır. Çocuklarda tedaviye 100-125 mg/kg dozuyla başlanır ve bu doz bir haftayı aşmamak üzere verilir. Doz daha sonra giderek 60 mg/kg'a kadar düşürülür. Bu dozda yeterli bir süre verilir. Antitrombotik etkisinden dolayı kardiovasküler hastalıkların profilaksisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Dozu günlük 75 mg ile 325 mg arasında değişmektedir (1,32,75,79,80).

2.1.4. Farmakokinetiği

Aspirin zayıf asit yapısındadır. Asidik olan mide suyunda non iyonize formda olduğundan mideden kolayca absorbe edilir. İlaç alındıktan 20 dakika sonra kandaki düzeyi minimum etkin düzeyin üzerine çıkar ve analjezik etki başlar. Absorpsiyon ince bağırsakta da devam eder. Sodyum salisilat aspirinden daha hızlı absorbe olur ve eşit dozdaki aspirine göre kanda daha yüksek bir düzey oluşturur. Aspirin karaciğer ve kanda salisilata hidroliz edilir. İlacın alınışından 1-2 saat sonra % 25 hidroliz edilmeden kalır. Salisilat aspirine oranla çok daha yüksek bir miktarda (%80) plazma proteinlerine bağlanır. İlaç ekstraselüler sıvı kompartmanlarında homojen olarak dağılır ve birikim göstermez (32,35,77,79,80). Aspirinden vücutta oluşan veya sodyum salisilat şeklinde dışarıdan verilen salisilatın eliminasyonu doza bağlı kinetik gösterir. Düşük dozlarda verildiğinde karaciğerde %80 oranında glisin ile birleşir ve böbreklerden bu şekilde atılır. Az bir kısmı da glukuronat konjugatı olarak atılır. Yüksek dozda aspirin veya salisilat verildiğinde enzimatik mekanizmalar doyurulmuş olduğu için, sıfırıncı derece kinetiğine göre sabit hızda metabolize edilir. Bu nedenle salisilatın büyük kısmı idrarda salisilat şeklinde atılır (32).

2.1.5. Yan etkileri

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçlar başta mide olmak üzere gastrointestinal sistem mukozasını tahriş ederler ve çeşitli lezyonlara sebep olurlar. Mide mukozasında epitelyum dökülmesi ve peteşial lezyonlardan, mide kanaması ve perforasyona kadar

giden hasar oluştururlar. Akut mukoza zedelenmesi tedavinin 1. veya 2. haftasında ortaya çıkabilir. Bu hasar analjezik gastroenteropatisi olarak isimlendirilir (32).

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların yaptığı ülser sıklıkla midede olur ve olguların ancak az bir kısmında duodenumda meydana gelir. Aspirin ile oluşan gastrointestinal lezyonlar tüm formülasyonlar ve tüm dozajlarda olabilmektedir (77). Göreceli olarak düşük dozda kanama riski daha az olmasına karşın, yine de anlamlı düzeyde yüksektir. Weisman ve Graham'ın meta-analizinde düşük doz aspirinde (<325 mg/gün) gastrointestinal kanama riskinin 2.5 kat arttığı gösterilmiştir (87). Yine 325 mg'ın altında 3 değişik aspirin formülasyonu (normal, enterik kaplı ve tamponlanmış) ile yapılan çalışmalarda, mide ve duodenal kanama risklerinde formülasyonlar arası anlamlı fark saptanmamıştır (1,13,35,72,77,87). Daha önceden peptik ülser öyküsü olanlarda, dozun artması, kullanım sresinin uzaması, aynı zamanda diğer ülserojenik ilaçların kullanılması, sigara kullanılması gibi durumlarda ülser insidansı artar. Bu olguların bir kısmında ülser semptomu olmadan kanama veya perforasyon görülebilmektedir (72,77,87).

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların mide mukozasını bozması ve bu arada PGI₂ ve PGE₂ sentezini inhibe ederek bu koruyucu faktörlerin düzeyini ve mide mukozasında kan akımını azaltmaları mukoza ile direkt temasları halinde daha fazla olmaktadır. Aspirin düşük dozlarda alındığında trombosit agregasyonunu inhibe eder ve kanama zamanını uzatır. Heparin ve oral antikoagülanların etkisini artırır. Yüksek dozda verildiğinde karaciğerde sentezlenen pıhtılaşma faktörlerinin sentezini doza bağımlı azaltır. Aspirin ile seyrek olarak alerjik reaksiyon gelişir. Aspirine duyarlı astma olarak isimlendirilir. Aspirin ve benzeri ilaçların, prostaglandin sentezini inhibe etmesine bağlı olarak böbreklerden tuz tutucu etki ve vazokonstrüksiyona eğilim sebebiyle hipertansiyonlu hastalarda kan basıncını yükseltme olasılıkları artar (32,39,40,41,82,83,84).

2.2.Aspirin ve Gastrointestinal Hasar Patogenezi

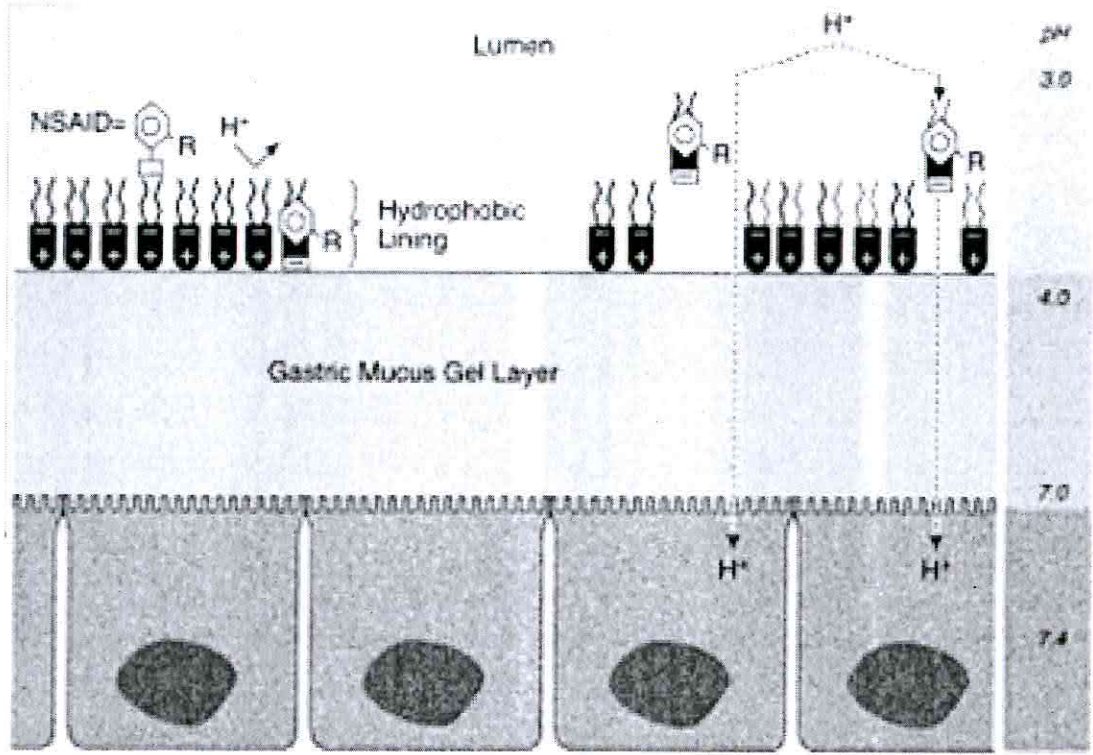
2.2.1. Gastrik Mukozanın Özellikleri

Mide mukozası endojen ve ekzojen bir çok saldırgan faktörlere karşı koruyucu özellikte çok özel bir yapıdır (Şekil 3). Mide mukozası koruyucu faktörler ve saldırgan faktörler arasındaki denge mukozal bütünlüğün korunmasını sağlar. Bu saldırgan faktörler, gastrik asit sekresyonunun fazlalığı, pepsin, alkol, ROS, NSAİ ilaçlar, aşırı stres, H. Pylori enfeksiyonu olarak özetlenebilir (39,79,80,82). Gastrik mukozal koruyucu faktörler, luminal faktörler ve nörohormonal faktörler olarak incelenebilir (29,30,39,45). Mukozal koruyucu faktörler:

- a) Mukus bikarbonat bariyer
- b) Epitelial bariyer
- c) Endotelial bariyer
- d) Hücre yenilenme kapasitesi
- e) Prostaglandin ve nitrik oksit oluşması
- f) Mukozal kan akımı ve mikrosirkülasyon
- g) Nöral uyarı
- h) Sitokinler ve büyüme faktörleri
- ı) Proteolitik enzimler
- j) Poliaminler

Mukoza üzerine yapışmış olan ve çalkalanmadan etkilenmeyen mukus tabakası ve gastrik epitel hücrelerinin salgıladığı bikarbonat iyonu (HCO_3^-) mukus tabakasının üzerinde nötralize edici bir tabaka oluşturur (39,40). Mukus tabaka mukozal defansda ilk savunma hattını oluşturur. Yapısında bulunan fosfolipidlerden ve mukustan dolayı mide yüzeyinde hidrofobik bir tabaka oluşturur. Mukus tabakanın mide içine bakan kısmın pH'sı düşüktür. Ancak epitel hücresine bakan kısmın pH'sı bikarbonat sekresyonundan dolayı fizyolojik pH'ya yakındır (40). Ülserojenik maddeler örneğin aspirin bu mukus jel ve fosfolipid tabakayı bozarak mukoza içine asid difüzyonuna sebep olur (40,41). Mide yüzeyel epitelyum hücreleri mukozal mukus bariyerin hemen altında savunma hattını oluştururlar. Epitelyum hücreleri 2-4 günde bir yenilenir. Ayrıca epitelyum hücrelerinin oluşturduğu bikarbonat salgısı, prostaglandinler, heat shock

proteinler hücrenin sitotoksik ajanlara karşı korunmasında önemlidir. Yüzeyel epitelyum hücreleri mide içi asit sıvısının hücre içine difüzyonunu engeller (39,40).



Şekil: 3 Mide Mukus Bariyer Yapısı (40)

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların yaptığı gastrointestinal hasarın patogenezi topikal ve sistemik olarak iki kısımda incelenir (45).

2.2.2. Topikal Etkiler

Topikal etkiler; aspirinde diğer NSAİ ilaçlar gibi zayıf organik asit yapısındadır. Kimyasal yapılarından dolayı suda ve lipide çözünme özelliğine sahiptirler. Bundan dolayı gastrik epitelyum hücrelerin yüzeyindeki fosfolipidlerle kolayca etkileşirler. Bu etkileşim ilacın hücre içine girişi artırır ve iyon tuzağı oluşması ve bunu elektron transport zincir inhibisyonu ve mitokondrial oksidatif fosforilasyonun ayrılması (uncoupling) izler. Hücre içi ATP azalmasının bir sonucu olarak, hücre içi Ca toksisitesi ve reaktif oksijen ürünleri (süperoksid radikali, hidroksil radikali) oluşur. Oluşan bu ROS hücresel proteinler, lipidler, nükleik asitleri okside eder ve hücre

nekrozu ve apoptozu ile ilgili sinyal yollarını içeren birçok sinyal yolu aktive olur. Oksidatif fosforilasyonun ayrılması sonucu mitokondrial transmembran potansiyelini değiştirir ve sitokrom c salınır. Sitokrom c aracılı apoptozis oluşur. Ayrıca NSAİ ilaçlar membran fosfolipidleri ile etkileşerek membran yapısını bozar ve asit geri (back) difüzyonuna sebep olur. Hücre apoptozu veya nekrozu sonucu gastrik ülser gelişir (29,30,40,41,45).

2.2.3. Sistemik Etkiler

2.2.3.1. COX İnhibisyonu

Gastrik mukozanın bütünlüğü, PGE₂ ve PGI₂'nin sürekli sentezlenmesine bağlıdır. PGE₂ ve PGI₂ potent vazodilatatörlerdir ve mide mukoza bütünlüğünün korunmasını ve yara iyileşmesini kontrol ederler. Selektif COX-2 inhibitörlerinin ülser oluşturma insidansı düşük olması görüşüne karşın, COX-1 ve COX-2 inhibisyonunun ülser patogenezi farklı mekanizmayla oluşturduğu gösterilmiştir (84). Ratlarda yapılan çalışmalarda COX-1 inhibisyonu aracılı PGE₂ azalmasının gastrik mukozal kan akımını azalttığı, COX-2 inhibisyonu yoluyla da lökosit adezyonunun arttığı gösterilmiştir (84). COX-1 ve COX-2 izoenzimlerinin aynı anda bloke edilmesiyle şiddetli gastrik ülserler geliştiği gösterilmiştir (84). Gastrik mukozal yapının çeşitli nedenlerle bozulduğu durumlarda, asit etkisiyle ya da nitrik oksit sentezinin inhibisyonu gibi durumlarda COX-1 ve COX-2'nin izole inhibisyonunun ülserojenik olduğu gösterilmiştir (74,84).

COX-1 izoenzimi gastrik mukoza bütünlüğü bozulmamış gastrik mukozada bol bulunurken, COX-2 izoformunun mukozal incinmeyi takiben ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. COX-2 yoluyla oluşan prostaglandinlerin ülser iyileşmesinde anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir (5,8,40,84).

2.2.3.2. Hipermotilitenin Rolü

COX-1 inhibisyonu sonucunda gastrik hipermotilite oluşması, doku hipoksisi, nötrofil endotelial adezyonuna yol açar. Bunun sonucunda mukozal mikrovasküler hasar oluşur. Mukozal geçirgenlik ve nötrofil miyeloperoksidaz aktivitesi artar (74,40,84). Gastrik hipermotilite ve mikrovasküler hasar nötrofil adezyonunu artırır. ROS artar ve gastrik mukozal hasar oluşur (8,40,74,84).

2.2.3.3. Asidin Rolü

Asit geri (back) difüzyonuna bağlı oluşan gastrik hasar, yüzeysel gastrik lezyonların, derin mukozal ülserlere kadar değişir. NSAI ilaçların, COX-1 inhibisyonunun bir sonucu olan prostaglandin azalması sonrasında gastritli ratlarda bazal asit sekresyonunun arttığı ancak gastrik mukozası sağlam olanlarda artış olmadığı gösterilmiştir (5,8). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, NSAI ilaçların sebep olduğu gastrik zedelenme mide pH'sı düşük olanlarda daha fazla olduğu gösterilmiştir (8). Naproksen kullanımına bağlı mide sıvı volümünün azaldığı, ancak asit konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (84). NSAI ilaçların gastrik asiditenin artmış olduğu durumda verildiğinde, gastrik mukozal kan akımını azalttığı gösterilmiştir (84).

2.2.3.4. Aspirinin Tetiklediği Lipoksinin (ATL) Rolü

Aspirin COX enziminin aktif bölgesindeki serin rezidüsünü kovalent modifikasyonla asetillenerek enzim aktivitesini inhibe eder. COX-1 enziminin serin 530. rezidüsünün asetillenmesi enzimin konformasyonel yapısını değiştirir ve araşidonik asidin metabolize edilmesi engellenmiş olur. COX-2 enziminin serin 516. rezidüsünün asetillenmesi durumunda araşidonik asidin 15-R-HETE'e metabolizasyonuna izin verilir. Bu metabolit lipooksijenaz yoluyla 15 epi-LXA4'e metabolize olur ve aynı zamanda aspirin triggered lipoksin (ATL) olarak adlandırılır. ATL potent nötrofil inhibitörü ve antiinflamatuvar etkilere sahip bir moleküldür. Ayrıca ATL doz bağımlı olarak hem oksijenaz-1'in ekspresyonunu indükler. HO-1 antiinflamatuvar, antioksidan ve vazodilatatör özelliklere sahiptir (45,85). Aspirinin serumda ve idrarda ATL seviyesini artırdığı gösterilmiştir (45,85). Aspirinle beraber COX-2 inhibitörü kullanılması durumunda, ATL seviyesi düşmekte ve koruyucu etki azalmaktadır. Gastrik ülser oluşması kolaylaşmaktadır. Aspirinin ve ATL'nin nitrik okside benzer şekilde lökositlerin endotele yapışmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (45,85).

2.2.3.5. Mukozal Kan Akımı, Sitokin ve Nötrofiller

NSAI ilaçların neden olduğu gastrik ülserde, mikrovasküler hasar kritik role sahiptir. Gastrik antrumda kan akımı az olduğundan dolayı sıklıkla ülser gelişir. Asit

geri (back) difüzyonunun sebep olduğu lokal iskemi gastrik ülserle sebep olur (45). Gastrik aside hiperemik yanıt olarak salınan CGRP ve substans P, VEGF'yi artırarak ülser iyileşmesini ve anjiyogenezisi artırır (45). CGRP'nin koruyucu etkisi cinse spesifiktir. Dişi cinste ve östrojenden sonra ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (45).

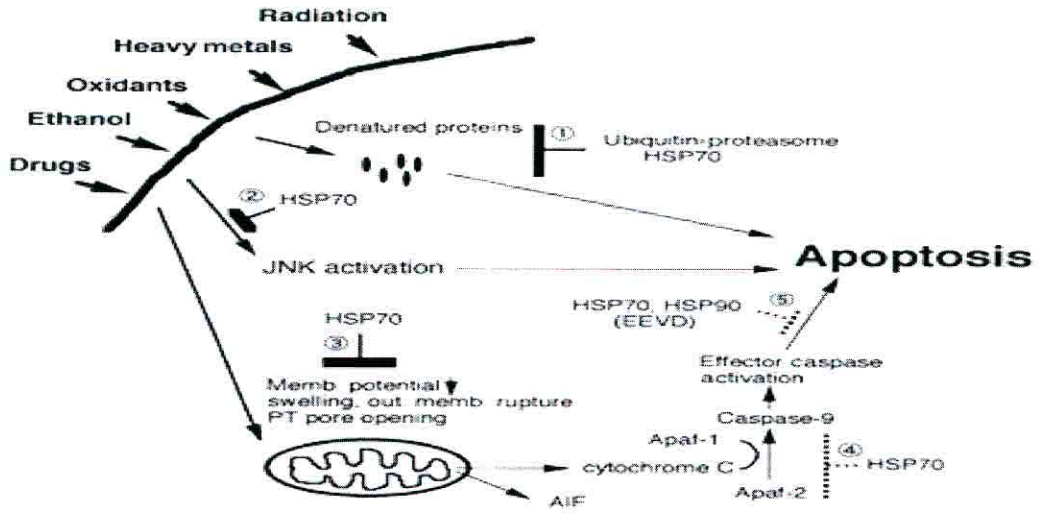
TNF- α , IL-1 β , IL-8, PAF NSAİ ilaçların neden olduğu ülserin oluşması ve iyileşme döneminde artmıştır. IL-8 ve PAF nötrofil adezyon moleküllerinin indükleyerek nötrofillerin inflamasyon bölgesine gelmesine yardımcı olurlar. Aktive olan nötrofiller kılcal damarları tıkayarak ve ROS üreterek ülserle sebep olurlar (22,45).

2.2.3.6. Büyüme Faktörlerinin Rolü

Ülser alanlarında growth faktörler, sitokinler artmış olarak bulunmuştur. Growth faktörlerin gastroduodenal koruyucu etkilerinin yanında, anjiogenezi artırıcı, granülasyon dokusu oluşturucu, epitel oluşumunu artırıcı özellikleri ülser iyileşmesini hızlandırıcı yöndedir (45). EGF, TGF- α , HGF, FGF, PDGF, VEGF, IGF-1 iyileşmeyi hızlandıran büyüme faktörleridir (45).

2.2.3.7. Stres Proteinleri

Hsp70 (heat shock protein), yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması, misfolding proteinlerin yeniden katlanması veya yıkımı ve proteinlerin biyolojik membranlardan translokasyonu görevleri vardır. Hsp70, hücre içi sinyal iletimi, hücre siklusu ve apoptozda regülatuar fonksiyonlara sahiptir (Şekil 4). ROS'un sebep olduğu lipid peroksidasyonu ve DNA hasarında hücreyi koruduğu gösterilmiştir. Hsp, egzersiz, iskemi-reperfüzyon, inflamasyon, hipertermi durumlarında artar (10,12).



Şekil 4 : Hsp70'in Antiapoptoz Mekanizması (59)

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda NSAI ilaçların çeşitli stres proteinlerinin düzeyini artırdığı gösterilmiştir. Stres proteinleri, NSAI ilaçların gastrik mukozal yan etkilerinden ve apoptozdan gastrik mukozayı koruyucu özelliklere sahiptir (10,12,59,70).

2.2.3.8.Poliaminler

Putresin, spermin ve spermidin ökaryotik hücrelerde bol bulunan ve hücre büyümesi ve çoğalmasında esansiyel olan poliaminlerdir. NSAI ilaçların neden olduğu ülserin iyileşme sürecinde önemli role sahiptir (45). Hücre içi poliamin seviyeleri ornitin dekarboksilaz ve spermin/spermidin asetilaz enzimleri ile düzenlenir. Yüksek poliamin seviyeleri hücre proliferasyonunu hızlandırırken, düşük seviyeleri apoptozu iletir. Yapılan çalışmalarda NSAI ilaçların ornitin dekarboksilaz enzimini inhibe ederek hücre içi poliamin seviyesini azalttığı gösterilmiştir. NSAI ilaçların yaptığı hücre hasarın temelinde poliamin azalmasının rolü düşünülmüştür (45). Ratlarda yapılan çalışmalarda ekzojen spermin alımının, indometazin kullanımına bağlı oluşan gastrik ülseri önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (45). Ayrıca spermin, gastrik mukus içeriğini artırmakta, nötrofil infiltrasyonunu azaltmakta ve serum nitrik oksit seviyesini artırmaktadır (45).

2.2.3.9. Melatonin

Melatonin gastrik koruyucu özelliği ve ülser iyileştirici etkisinden dolayı önemli role sahiptir. Epifiz bezinde triptofandan sentezlenir ve vücuttaki etkisini melatonin reseptörleri ile gösterir. Melatonin gastrik koruyucu etkilerini, MMP-2 aktivitesini artırarak ve MMP-9 aktivitesini azaltarak yapar. Reaktif oksijen radikallerini temizlemesine ilave olarak gastrik koruyucu özelliklere sahiptir. Bu koruyucu özellikler, gastrik asit sekresyonu inhibisyonu, nötrofil infiltrasyonunu azaltması, ülser dokuda kan akımını artması, duodenal bikarbonat sekresyonunun stimüle etmesi ve nitrik oksit sistemini aktive etmesidir (33,36).

Ratlarda yapılan çalışmalarda, indometazin kullanımına bağlı oluşan gastrik lezyonları doza bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Melatonin ya da triptofanın alınması ile aspirinin sebep olduğu gastrik lezyonların azaldığı gösterilmiştir (33,36).

2.2.3.10. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Matriks metalloproteinazlar (MMP) yaklaşık 28 enzimden oluşan, fizyolojik ve patolojik doku yıkımında önemli rol oynayan ekstrasellüler proteazlardır. MMP çinko bağımlı endopeptidazlardır. Matriks metalloproteinazlar, lökositler, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler. Doku gelişimi ve farklılaşmasında, ovulasyon, hücre göçü gibi bir çok olayda MMP'ler önemli rol oynamaktadır. Matriks metalloproteinazları ekstrasellüler matriksin yapılıması ve ülser iyileşmesinde önemli role sahiptir. MMP çinko bağımlı endopeptidazlardır (45).

2.2.3.11. Genetik Durumlar

COX-1 geni ile ilgili 9 tip farklı single nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin 2'sinde, COX-1 enziminin aspirine karşı afinitesi artmış ve bu hastalarda düşük doz aspirin kullanımında gastrik ülser ve kanamalar gelişmiştir. Single nükleotid polimorfizminin yaygınlığı batı toplumlarında %10,5-8,6 arasında değişmektedir (61).

Aspirin karaciğerde hidroksilasyon ve glukuronidasyon işlemleri ile metabolize edilerek atılır. Bu enzimlerle ilgili polimorfizm aspirinin metabolize olmasını etkiler. CYP2C9 ve UGT1A6 enzimlerindeki aminoasit değişikliği sonucu enzim aktivitesinin

önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Aspirinin metabolize edilemediği durumda yan etkileri önemli ölçüde artmıştır (45,61).

2.2.3.12. Nitrik Oksidin Rolü

Nitrik oksid hem fizyolojik, hem de patofizyolojik süreçlerde önemli role sahip endojen mediatördür. HO-1 ekspresyonunu indükleyerek antiapoptotik ve antinekrotik etki gösterir. NO rat fibroblastlarında COX-2 ekspresyonunu artırarak PGE2 düzeyini artırdığı gösterilmiştir. NO sentetaz enzimi ile argininden sentezlenir. NO sentetaz enziminin, eNOS, nNOS ve iNOS olarak 3 izoformu vardır. eNOS ve nNOS tarafından düşük miktarda NO üretilir ve ülser iyileşmesinde, mukozal tamir, anjiogeneziste görevlidir. iNOS tarafından fazla miktarda NO üretilir. Ülser iyileşmesinde görevli olan NO miktarı çok artınca doku oksidan stresini artırmaktadır (2,45,85).

2.3. Oksidanlar ve Antioksidanlar

2.3.1. Serbest Radikaller

En dış orbitalinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran, stabil olmayan, kısa ömürlü molekül ya da atomlara radikal adı verilir. Bu tür moleküller ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktifdirler. Molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta ile gösterilir (R[•]). Serbest radikaller elektriksel olarak nötral, pozitif veya negatif yüklü olabilirler (2,57,69,78).

Serbest radikaller, kovalent bağların homolitik kırılması, nötral bir atomdan bir elektron kaybı ve nötral bir atoma bir elektron eklenmesi mekanizmaları ile oluşur (2).

1. Kovalent bağların homolitik kırılması; yüksek enerjili elektromagnetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kovalent bağların kırılmasına sebep olur. Bağ kırılması sırasında, bağı oluşturan elektronlar 2 atom üzerinde eşit paylaşılmazsa radikal oluşur.

2. Nötral bir atomdan bir elektron kaybında, atomun dış elektron yörüngesinde paylaşılmamış elektron kalması durumunda radikal formu oluşur.

3. Nötral bir atoma bir elektron eklenmesinde, atomun dış yörüngesinde paylaşılmamış elektron oluşursa radikal formu oluşur. Biyolojik sistemlerde en sık bu reaksiyona rastlanılmaktadır.

İki serbest radikalın birbiri ile reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar ve her iki serbest radikal ortadan kalkar. Bir serbest radikal, radikal

olmayan bir yapıyla reaksiyona girince başka bir serbest radikal oluşturur. Bu özellik serbest radikallerin zincir reaksiyonları oluşturabilmelerini sağlar (2,24).

Serbest radikaller organizmada nötrofil, makrofaj gibi hücrel bağışıklık sisteminin fonksiyonları için gereklidir. Ancak fazla üretilmeleri doku hasarı ve hücre ölümüne neden olur (2).

2.3.2. Oksijen Radikalleri

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir elementtir. Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati öneme sahiptir. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^{+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin en önemlileri oksijen radikalleridir (Tablo I,II). Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir (57,69,78).

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), peroksit radikalleri (ROO^{\cdot}), alkoksi radikalleri (RO^{\cdot}), tiyil radikalleri (RS^{\cdot}), sülfenil radikalleri (RSO^{\cdot}), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2^{\cdot}) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (57,78).

Tablo I. Hücrelerde Serbest Radikal Kaynakları (26)

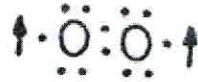
Endojen kaynaklar	Ekzojen kaynaklar
Mitokondrial elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Mikrozomal elektron transport zinciri	Güneş ışığı
Oksidant enzimler	Sigara
Fagositik hücreler	İlaçlar (parasetamol)
Otooksidasyon reaksiyonları	Isı şoku

Tablo II. Oksijen türevi bileşikler (25)

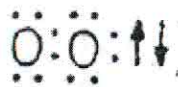
Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit (O_2^{\bullet})	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($\bullet OH$)	Hipoklorik Asit ($HOCl$)
Peroksil (RO_2^{\bullet})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\bullet})	Singlet oksijen (1O_2)
Hidroperoksil (HO_2^{\bullet})	

2.3.2.1. Singlet Oksijen

Moleküler oksijen (O_2) son yörüngesinde, paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahip ve atom numarası 8 olan ve doğada O_2 şeklinde bulunan bir elementtir.



Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerjisi alarak aynı orbitalde kendi spininin ters yönünde döndüğünde veya başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (2,24,26,57,78).



Delta O_2



Sigma O_2

Singlet oksijenin reaktivitesi çok yüksek olduğundan, doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturmaktadır. Böylece lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir (57,78).

2.3.2.2. Süperoksid Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Zedeleyici özelliği fazla olmayan bir serbest radikal türevi olup bir hidrojen peroksid kaynağıdır. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksid radikali meydana getirebilir. Süperoksidin NO ile birleşmesi sonucu reaktif oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Hücre zarı yüzeyi hücreye göre daha asidik olduğundan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) burada daha kolay protonlanır ve H_2O_2 'e dönüşür. Hidrojen peroksid hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilmekte ve antioksidanları oksitleyebilmektedir (2,24,57,78).

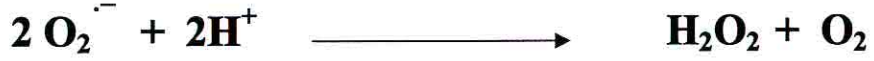
2.3.2.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)

Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur (2,57,78).

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin (ROS) en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir H atomu kopararak tiyil radikalleri (RS^{\cdot}), karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), organik peroksitler ($RCOO^{\cdot}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur (2,24,57,69).

2.3.2.4. Hidrojen Peroksid (H_2O_2)

Hidrojen peroksid (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron ve 2 proton alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron ve 2 proton alması sonucu meydana gelir (2,26,51).



Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının ($\text{O}_2^{\cdot-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^\cdot) oluşturur (2,57).

2.3.3.Reaktif Nitrojen Ürünleri

2.3.3.1. Nitrik Oksit ve Peroksinitrit

Hücrenin fizyolojik metabolizmasında reaktif oksijen ürünleri oluşmasına rağmen az da olsa reaktif nitrojen ürünleri oluşmaktadır. Nitrik oksit (NO), vasküler endotel hücreleri, fagositler ve beyindeki bazı hücreler tarafından L- argininden sentezlenir. Nitrik oksit hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçlerde önemli role sahip bir serbest radikaldir. Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır (2,57,78).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin düzeyini kontrol etmek ve oluşturacağı hasarı engellemek için birçok savunma sistemleri mevcuttur. Serbest radikallerin oluşumunu engelleyen,

serbest radikalleri metabolize eden ve serbest radikallerin temizlenmesini artıran bu maddelere antioksidanlar denir (2,89).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler. **1)** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler. **2)** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler. **3)** Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler. **4)** Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir. Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler (2,89):

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: **1) Süperoksid dismutaz (SOD) 2) Katalaz 3) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) 4) Glutatyon S-Transferazlar (GST)**

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: **1) Glutatyon 2) Seruloplazmin 3) Transferin 4) Miyogloblin 5) Hemogloblin 6) Ferritin 7) Bilirubin 8) Melatonin 9) Sistein 10) Metiyonin 11) Ürat 12) Albumin 13) Flavonoidler**

Eksojen antioksidanlar, **vitaminler C, E, A, ilaçlar, bitkisel ve gıda antioksidanları** olmak üzere sınıflandırılabilirler (2,89).

2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.1.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

Süperoksid dismutaz süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksid (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Süperoksid dismutaz enziminin memeli dokularında üç formu vardır ve farklı doku dağılımı gösterir (2,89).

Cu-Zn SOD bütün memeli hücrelerinin sitoplazma ve organellerinde bulunur. Her biri Cu ve Zn içeren, katalitik olarak aktif dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. Yaklaşık 32 000 kDa ağırlığında moleküler kütleyle sahiptir (89).

Mn SOD mitokondride bulunur, tetramerik yapıdadır ve her biri Mn içerir. Aminoasit sekansı Cu-Zn SOD'dan tamamen farklıdır ve siyanidle inhibe olmaz. Yaklaşık 40 000 kDa ağırlığında moleküler kütle sahiptir. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır (89).

Ekstraselüler SOD (EC-SOD), Cu-Zn içeren bir enzimdir. Fibroblast ve endotel hücreleri tarafından sentezlenir. Heparan sülfatlara bağlanan hücre yüzeyinden eksprese edilir ve ekstraselüler sıvıda en bol bulunan SOD'dır. Heparin enjeksiyonunu takiben damar endotelinin yüzeyinden dolaşıma salınır (2,89).

SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının ($O_2^{\cdot -}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışıyla artar. SOD'ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (89).

Cu-Zn SOD'ın spesifik aktivitesi Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek, prematürelerin ve yaşlıların eritrositlerinde ve psöriyazisli hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur (2).

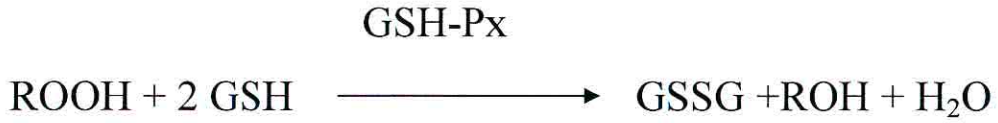
2.4.1.2.Katalaz

Katalaz, yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve oksijene parçalar. Granulomatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi (H_2O_2) hidroksil serbest radikali (OH^{\cdot}) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır (2,89).

2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), selenoproteinler grubundan ve 80 kDa ağırlığında bir proteindir. Hemen hemen bütün dokularda bulunur ve hücre içi, en çok stoplazma ve mitokondride bulunur. Hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitleri redükte glutasyonu kullanarak indirgeyen bir enzimdir. Klasik hücresel enzim tetramerik yapıdadır ve her bir subünitte selenosistein rezidüsü içerir. Selenyum eksikliği durumlarında enzimin aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (17,58).

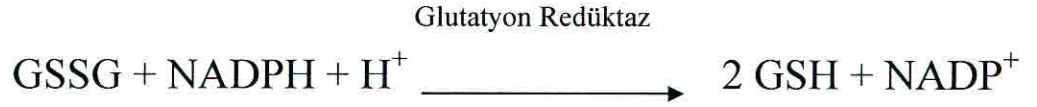
Hidroperoksitlerin indirgenmesi sırasında selenosistein kalıntısındaki selenyum anyonu seleneik aside yükseltgenir. Selenosistein rezidüsündeki selenyum güçlü bir nükleofildir (17,58,88). Memelilerde doku dağılımı farklı olan 4 farklı GSH –Px izoenzimi tariflenmiştir (Tablo III).



Tablo III : GSH –Px izoenzimlerinin doku dağılımı (9)

İzoenzim	En çok bulunduğu doku	Substratı
c-GPx	Her yerde bol bulunur	Hidrojen peroksit, organik hidroperoksitler
p-GPx	Ekstraselüler sıvılar, plasenta, böbrek	Hidrojen peroksit, kompleks lipid hidroperoksitler
PH-GPx	Testis, beyin, kalp	Hidrojen peroksit, kompleks lipid hidroperoksitler
GI-GPx	Gastrointestinal sistem	Hidrojen peroksit

Glutasyon redüktaz (GR), okside glutasyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyonda NADPH'a ihtiyaç duyar. Dimer yapısında olan enzim, flavoprotein disülfid oksido redüktaz ailesindedir (89).



2.4.1.4. Glutasyon S-Transferazlar (GST)

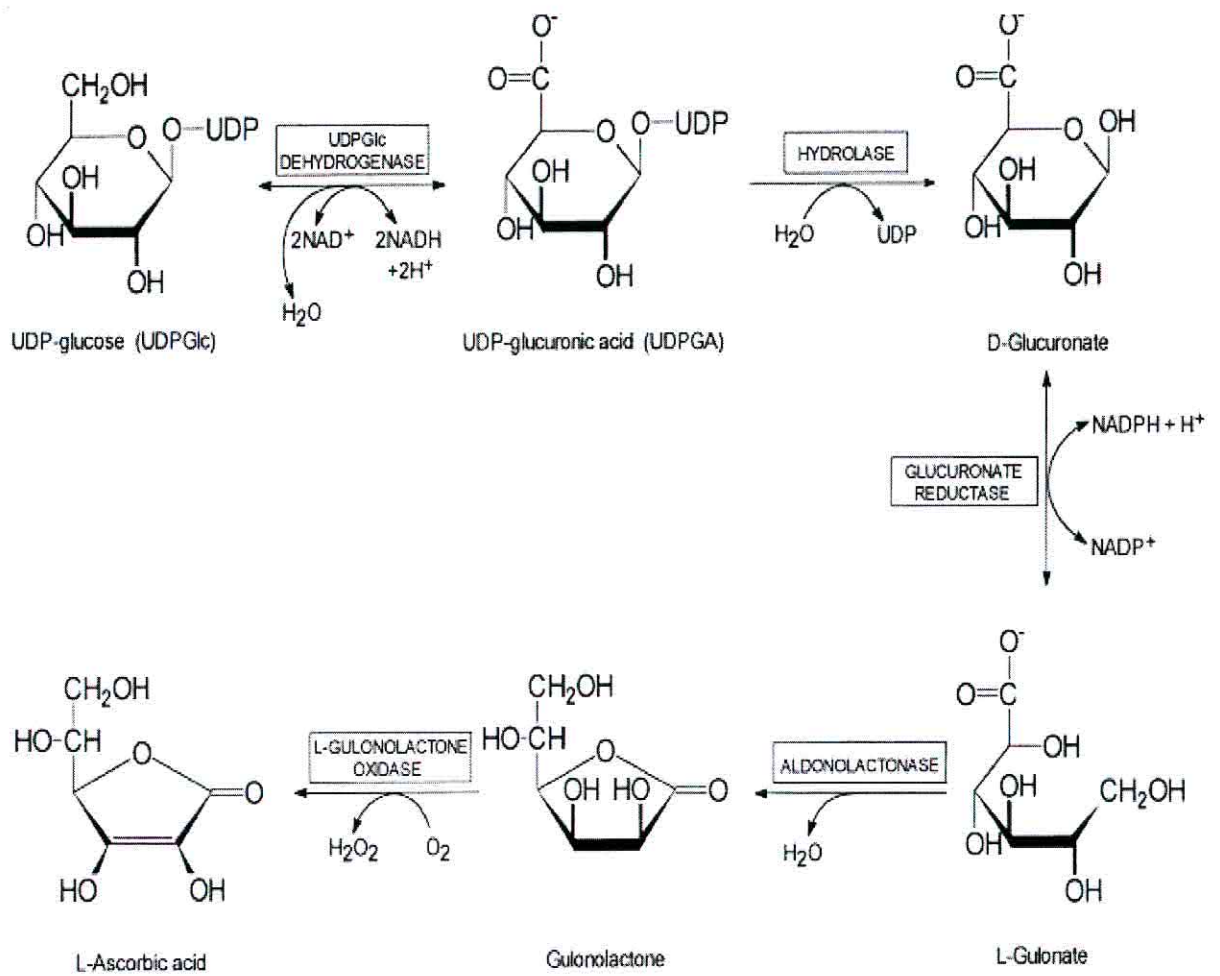
Glutasyon S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar (2).

2.4.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

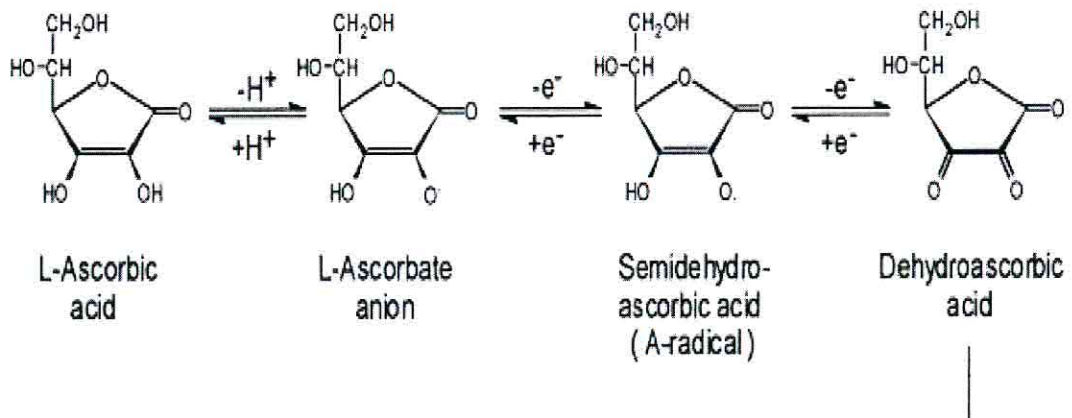
2.4.2.1. Vitamin C (Askorbik Asid)

C vitamini, bir dizi enzimatik tepkimenin sonucunda UDP-glukozdan sentezlen 6 karbonlu bir laktondur (Şekil 5). Sentezde kullanılan, glukanolakton oksidaz enzimi insanlarda olmadığı için insanlar askorbik asidi sentezleyemezler. Askorbik asid, dışarıdan alınmadığı durumlarda eksikliği oluşur (28).

Askorbik asid, memelilerde çeşitli reaksiyonlara elektron verici olarak katılır. Serbest radikallerin temizlenmesinde önemli role sahiptir (4,28). Askorbik asid, 6 karbonlu moleküldeki 2. ve 3. karbonlar arasındaki çift bağın elektronlarını vererek indirgeyici özellik gösterir ve bu özelliğinden dolayı antioksidan olarak adlandırılır (28). Askorbik asid bir elektronu verince askorbil radikali oluşur. Bu askorbil radikali, diğer zararlı serbest radikallerle karşılaştırınca daha stabildir. Askorbil radikali ikinci elektronu kaybedince dihidro askorbik aside dönüşür. Dihidroaskorbik asid, glutasyon varlığında, askorbik aside indirgenebilir ancak insanlarda bu yol kısmi olarak çalışır. Dihidroaskorbik asid, askorbik aside indirgenememişse irrevesibl olarak 2,3 – diketogulonik aside hidroliz edilir (52). Daha sonra başka metabolitlere (treonik asid, oksalik asid, laktik asid) dönüştürülerek atılır (4).



Şekil 5: Askorbik Asid Sentezi (4)



Şekil 6: Askorbik Asid Metabolizması (4)

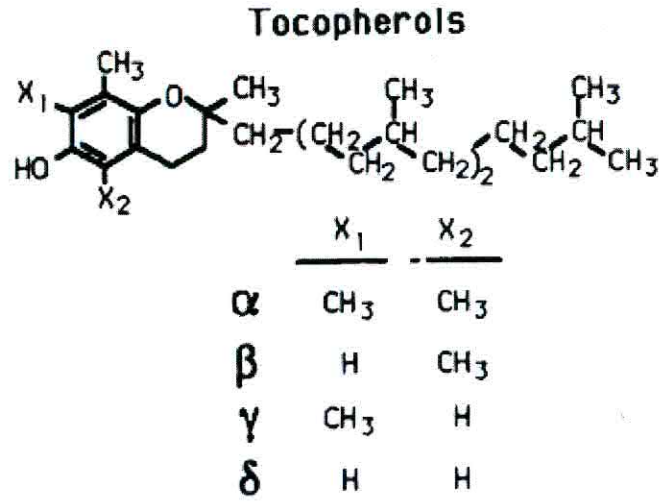
Askorbik asidin vücuttaki görevlerini indirgeyici güç (redüktan) olarak yapar (28,52).

1. Antioksidan işi: Hidroksil radikali, süperoksit radikali, reaktif nitrojen radikallerinin indirgenerek temizlenmesi, nitroamin, nitrozatif bileşikler, ozon gibi bileşiklerin indirgenmesi ve temizlenmesi, ve tokoperoksil radikallerinin, α -tokoferole indirgenmesi.
2. Kollogen sentezinde, elektron verici olarak
3. Karnitin sentezinde elektron verici
4. Norepinefrin sentezinde
5. Tirozin yıkımında
6. Demir emilimi ve depolanması

Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında minimal düzeyde oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşerek hidroksil radikali (OH \cdot) oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir (4,28,52).

2.4.2.2. Vitamin E (α -Tokoferol)

E vitamini terimi, yapısal olarak birbiriyle ilişkili bir grup bileşiği kapsar ve yağda çözünen ve zincir kırıcı antioksidandır. Yapısal analizinde tokoferoller, α , β , γ , δ olarak sınıflanır (Şekil 7). Tokoferol yapısal olarak fenol içeren halkasal yapı ve apolar kuyruktan oluşur. Halkasal yapı üzerindeki metil gruplarının yeri ve sayısı molekülün formunu belirler. Apolar kuyruk çift bağ içeriyorsa tokotrienoller oluşur (63).



Şekil 7: Tokoferoller (63)

E vitamini bağırsaklardan önce şilomikronların içinde lenf sistemine sonra da kan yoluyla karaciğere gelir. Karacigerde α tokoferol, spesik tokoferol transfer proteine bağlanır. Diğer tokoferol formları dışkı ya da idrarla atılır. γ tokoferol diyetle bol olmasına rağmen, plazmada α tokoferol bol miktarda bulunur. α -tokoferol plazmadaki E vitamininin % 80-90'ını oluşturmaktadır ve dokudaki major E vitamini formudur. Bunun sebebi γ -tokoferolün karaciğerde çabuk yıkılmasına bağlıdır. Bu yüzden α -tokoferol üstüne daha çok odaklanılmıştır ve E vitamini suplemantasyonun major formudur (9,50,63,64,89). E vitamini yağda çözünen bir antioksidan olduğundan hücre membranları ve lipoproteinlerle yakın ilişkide olabilir. Hücre membranlarını, peroksil radikallerinin saldırılarına karşı koruyarak lipid peroksidasyonunu önler. Benzer şekilde LDL partiküllerini de oksidasyona karşı koruyarak aterosklerozda koruyucu role sahiptir (64,65). E vitamini serbest radikallere hidrojen atomu transfer ederek antioksidan rolünü gerçekleştirir (50).

α -tokoferol, serbest radikallere elektronunu verince, kendisi tokoferol radikaline dönüşür. Oluşan bu tokoferol radikali askorbatla tekrar α -tokoferol'e dönüştürülebilir veya kinon ve hidrokinonlara oksitlenerek atılır (9,50).

2.4.2.3. Redükte Glutatyon

Glutatyon (GSH) yapısında glutamat, sistein ve glisin bulunan ve suda çözünen bir tripeptiddir (42). Bitki ve hayvan hücrelerinde, düşük moleküler ağırlıklı, bol bulunan, non protein tiyoldür. Hücre içi GSH'ın çoğu (%90) sitoplazmada bulunur. Geri kalan %10' u ise mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksizom gibi organellerde bulunur

0,15 mmol/l'dir. Bu Km değerleri glutamat ve sisteinin intraselüler konsantrasyonlarına benzerdir (42,88,76).

GSH sentezinin ikinci basamağı GSH sentetaz enzimi (GS, EC 6.3.2.3) ile devam eder. Moleküler kütlesi yaklaşık 118 000 daltondur. Birbiri ile hemen hemen aynı olan iki alt birimden oluşur (42).

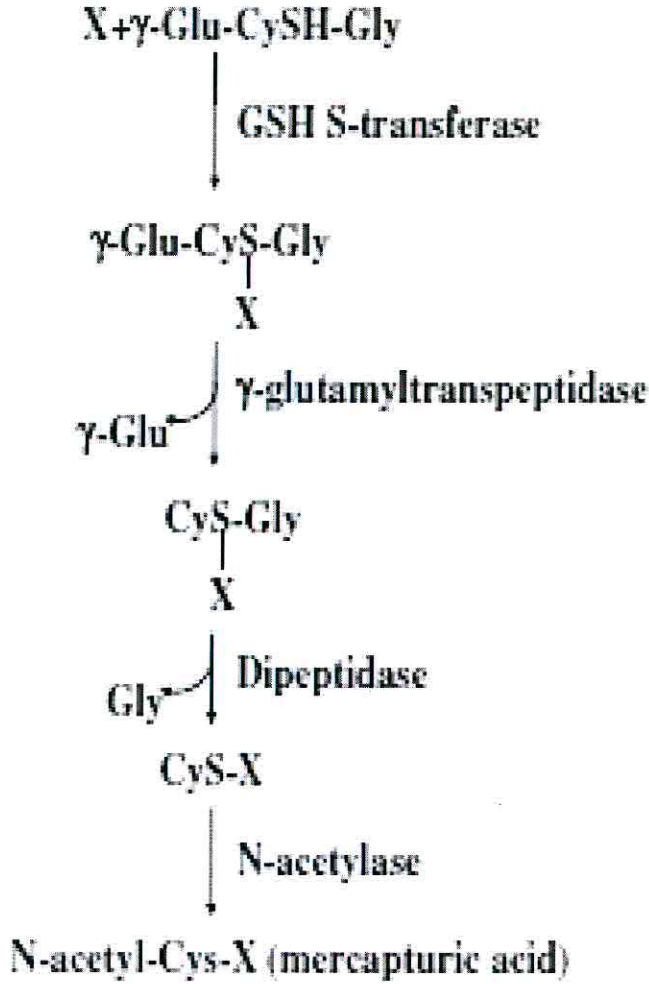
2.4.2.3.1. Sentezinin Düzenlenmesi ve Fonksiyonları

GSH sentezinde glutamat-sistein ligaz (GCL) enzimi hız kısıtlayıcı enzimdir. GCL transkripsiyonu ve aktivitesini artıran durumlar GSH seviyesini artırır. Bu durumlar, oksidatif stres, nitrozatif stres, kanser, kemoterapi, ısı şoku, insülin, antioksidanlar, inflamatuvar sitokinler ve GSH azalmasıdır. Protein eksikliği, deksametazon, hiperglisemi, eritropoetin GCL transkripsiyonu veya aktivitesini azaltan durumlar olduğundan hücresel GSH seviyesini artırır (42,44).

Hücredeki sistein aminoasidinin arttığı durumlarda GSH seviyesi artar. Sistein GSH sentezinde hız sınırlayıcı aminoasittir (88). Glutasyonun fonksiyonları şunlardır (42).

1. Detoksifikasyon fonksiyonu

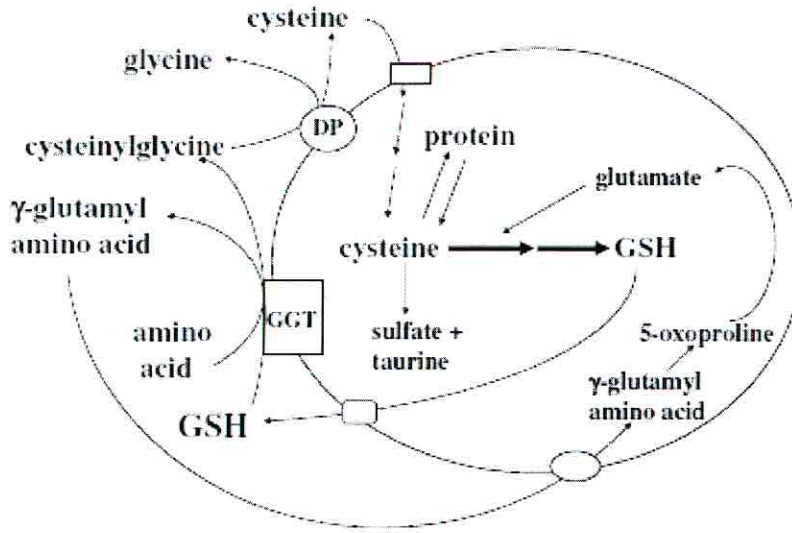
Elektron seven (elektrofil) maddelerin detoksifikasyonunda görevlidir. Bu maddeler GSH ile spontan ya da enzimatik olarak konjuge edilir. Enzimatik reaksiyon GSH-S-transferaz enzimi ile katalizlenir. Konjugatlar hücreden safra içine atılarak uzaklaştırılır.



2. Tiyol kaynağı olması

İntraselüler redoks dengesinin sürdürülmesi ve proteinler için gerekli tiyol'ün (-SH) sağlanmasına önemli rol oynar. GSH tiyol-disülfid değişim reaksiyonlarında kullanılır ve bu reaksiyon tiyol transferaz enzimi ile katalizlenir. Reaksiyon irrevesibl olduğundan dolayı reaksiyonun ilerlemesi hücre içi redoks durumuna bağlıdır. GSH/GSSG oranı hücre içi redoks durumunu belirler. Hücre içi tiyol-disülfid dengesi, enzim aktivitesinin yanında, sinyal yolları ve nükleer transkripsiyon faktörleri (AP-1, NFκB, p53) ile düzenlenir (42,88).

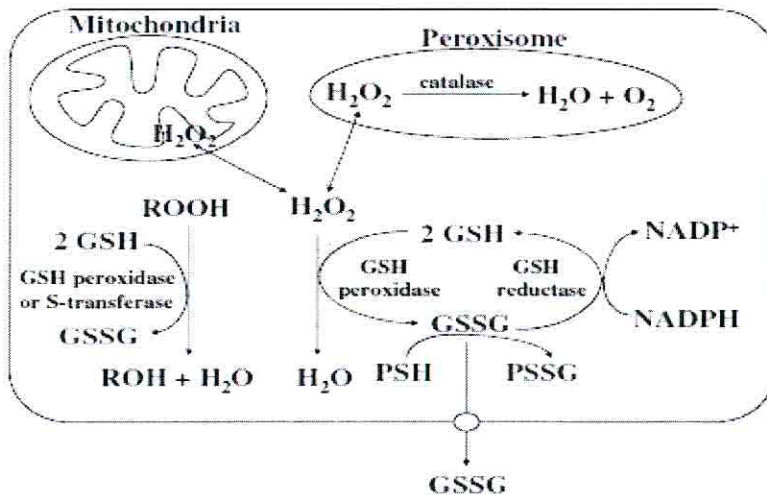
3. Sistein deposu olması



Şekil 9: Sistein Siklusu (42)

4. Antioksidan fonksiyonu

Hücrede endojen olarak üretilmiş olan hidrojen peroksit, redükte glutatyon varlığında glutatyon peroksidaz enzimi ile zararsız hale dönüştürülür (Şekil 10). Mitokondri ve sitoplazmada oluşan hidrojen peroksit GSH tarafından zararsızlaştırılır. Şiddetli oksidatif stres durumunda, GSSG indirgenme kapasitenin üstüne çıkarsa, GSSG hücre dışına atılır ya da proteinlerin sülfidril grupları ile disülfid oluşturur. Bundan dolayı şiddetli oksidan streste hücresel GSH azalır (42,88).



Şekil 10:Redoks Siklusu (42)

5. Düzenleyici fonksiyonu

Hücrelerin proliferasyonunda GSH önemlidir. Fibroblastlarda ve lenfositlerde hücrenin S fazına girebilmesi için GSH gereklidir. Hepatositlerin G₀ fazından G₁ fazına geçmeleri için gerekli olduğu görülmüştür. GSH DNA sentezinde de gerekli bir peptittir. İmmün sistemin fonksiyonları için gereklidir (88).

7. GSH, NO ile konjugatlar oluşturur (88).

2.4.3. Diğer Antioksidanlar

Karotenoidler: A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten, bitki pigmentlerinden olan karotenoid familyasının bir üyesidir. β -karotenin, singlet oksijeni, süperoksid radikalini temizlediği, peroksi radikalleri ile etkileşerek antioksidan görev yaptığı tespit edilmiştir (89).

Melatonin: Melatonin, en zararlı radikal olan hidroksil radikalini (OH^\bullet) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Lipofilik olmasından dolayı, hücrenin hemen bütün organellerine ve nükleusa ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de kolayca geçer. Yüksek dozlarda da kullanımıyla toksik etkisi görülmez (2,33).

Ürat: Normal plazma konsantrasyonunda hidroksil, süperoksid, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Ayrıca C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkisi de bulunmaktadır (2,89).

Seruloplazmin: Ferro demiri, ferri demire yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder (2,89).

Albumin: LOOH ve HOCL toplayıcısıdır (2).

Ferritin: Dokulardaki demiri bağlayarak antioksidan etkisini gösterir (2,89).

Ebselein: Selenyum içeren bir bileşiktir. Glutasyon peroksidaz aktivitesini güçlendirir.

Flavonoidler: Polifenolik antioksidanlardır. 4000'den fazla çeşidi vardır. Flavonoid alımı ile kronik hastalıklar ve koroner arter hastalıkları arasında zıt ilişki vardır (89).

2.5. Protein Oksidasyon

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu oluşur. Organizmada oluşan reaktif stres ürünleri antioksidanlar tarafından yeterince temizlenemezse, biriken oksidan ürünler protein, lipid, nükleik asit gibi makromoleküllere saldırarak reaksiyona girer (68,69). Protein oksidasyonunun birçok biyokimyasal sonuçları ortaya çıkar. Bunlar enzim

zincirindeki α -karbon atomundaki, H atomu OH \cdot radikalinin etkisiyle çıkartılıp ve karbon merkezli radikal oluşarak başlatıldığını göstermişlerdir (7).

Protein oksidasyonuna yol açan reaksiyonlar, peptid bağının ayrılmasına yol açan reaksiyonlar ve yan zincir modifikasyonuna yol açan reaksiyonlar olmak üzere iki grupta sınıflandırmak mümkündür (7,68,69). Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ile başlar ve oksidasyon sürecinde O₂ ile birlikte, süperoksit anyon radikali (O₂⁻) ve süperoksit radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksil (HO₂ \cdot)'in varlığı gerekir (67). Hidroksil radikali, süperoksit radikali, hidroperoksil radikali, protein omurgasının oksidasyonu sonucu protein fragmentasyonuna, aminoasitlerin R gruplarının oksidasyonu sonucu protein çapraz bağlarının oluşumuna sebep olur (7).

2.5.1. Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu (PCO)

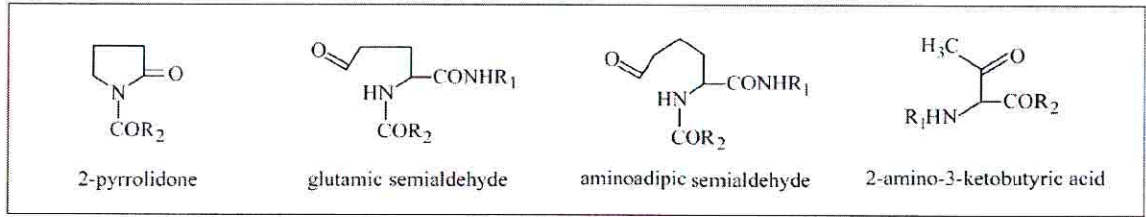
PCO türevlerinin oluşumuna yol açan primer reaksiyonlar aminoasitlerin α - karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen-aracılı peptid ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit rezidüsünde veya proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak PCO ürünleri meydana gelir. PCO düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (15,16,66,68,69).

Polipeptid omurgasındaki α -karbon atomundan OH \cdot radikali ile α -hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda aminoasit rezidüsü karbon merkezli radikal haline gelir (Şekil 11, Reaksiyon c). Bu reaksiyona yol açan OH \cdot radikali suyun radyolizinden (x ve γ ışınlarıyla) veya H₂O₂'in metal katalizli yıkımından açığa çıkar (reaksiyon a ve b). Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek (reaksiyon d) alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Daha sonra da alkilperoksit oluşur (reaksiyon f). Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda Fe⁺⁺ ve Cu⁺ varlığında HO₂ \cdot ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e,g,i). Bu metabolik yolda oluşan alkilperoksil, ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ile, yan reaksiyonlar ile etkileşerek yeni karbon

merkezli radikallerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır. Oksijen yokluğunda (reaksiyon d) gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar. Alkoksil radikalinin oluşması ile peptid bağı diamiit veya α -amidasyon yolları ile ayrılır Böylece peptid fagmentleri oluşur. Peptid bağı yıkımı, ayrıca glutamil yan zincirlerinin ROS aracılı oksidasyonu ile de olur (68). PCO türevlerinin oluşumuna yol açan sekonder reaksiyonlar, proteinlerin karbonhidrat ve lipid oksidasyon ürünleri ile reaksiyonları ile olur (15,66,68,69).

2.5.1.1. Aminoasit Yan Zincir Oksidasyonu ile Karbonil Grupları Oluşumu

Proteinlerin bütün aminoasit rezidüleri hidroksil radikalinin potansiyel hedefidir. Prolin, arginin, lizin ve treonin aminoasitlerinin yan gruplarının oksidasyonu ile karbonil ürünleri (aldehitler ve ketonlar) oluşur. Protein karbonil içeriği protein oksidasyonu göstergesi olarak yaygın olarak kullanılır (15,16).



Şekil 12: Aminoasit Yan Grupların Oksidasyonu (15)

2.5.2. Sülfür İçeren Aminoasitlerin Oksidasyonu

Serbest radikallerin oksidasyonuna proteinlerdeki sistein ve metiyonin rezidülerinin hassas olduğu gösterilmiştir. Sisteinin $-SH$ grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır ve $-SH$ gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiyil radikali ($-S^{\cdot}$) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder. $-SH$ gruplarının disülfidlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir. Başka proteinlerde hasar olmadıkça, SH grubu oksidasyonu redükte glutatyon ya da tiyoredoksin tarafından geri döndürülebilmektedir (15,16,68). Okside metiyonin rezidüleri, $Th(SH)$ bağımlı

metiyonin sülfoksit redüktaz ile indirgenir. Metiyonin ve sistein içeren aminoasitler aynı zamanda antioksidan koruyucu sistemin üyesidirler (68).

2.5.3. Nitrotirozin (NT) Oluşumu

NT oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır. Peroksinitrit (ONOO^-), nitrik oksidin (NO), O_2^- ile in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir. Süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin peroksinitrite göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, peroksinitrit daha reaktif bir türevidir. Normal koşullarda, süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat, süperoksit düzeyleri çok artmışsa ya da fazla miktarda NO radikali meydana gelmişse peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit oluşumu oksidatif protein hasarının hem ortaya çıkışına, hem de ilerlemesine sebep olmaktadır. ONOO^- 'in proteinler üzerine atağının ana ürünü tirozinin *orto* pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da NT oluşumuna yol açar. Tirozin rezidüsünün nitrolanması irrevesibldir (15,68).

NT, ONOO^- 'nin in vivo spesifik bir markıdır. ONOO^- ; DNA'yı, enzimleri, prote-inleri, lipitleri ve tiyol gruplarını okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir. Tirozinin geri dönüşümsüz olarak nitrasyonu, tirozinin fosforillenmiş ve fosforillenmemiş formlarının birbirine dönüşümünü engelleyerek, enzim aktivitesinin düzenlenmesini ve sinyal ileti mekanizmalarının regülasyonunu etkiler (15). NT'nin, ONOO^- oksidasyonunun stabil son ürünü olmasına bağlı olarak, NT konsantrasyonu NO -bağımlı in vivo hasarın tespitinde kullanışlı bir marker'dır (68).

2.5.4. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu

Son zamanlarda protein oksidasyonunun yeni bir marker'ı olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Diğer taraftan AOPP'nin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine benzediği bildirilmektedir (15,16). AOPP protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir marker'dır. Witko Sarsat ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon

gösterdiği, fakat lipid peroksidasyon marker'ı olan tiyobarbütirik asit ile reaksiyonlaşan maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir (68).

2.6. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller, antioksidan savunma kapasitesini aşacak kadar oluştuğu zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açar. Biyomoleküllerin çoğu serbest radikallerden etkilenir ancak en hassas olanı lipidlerdir. Membrandaki fosfolipidlerin yapısında bulunan yağ asidlerinin doymamış (ansatüre) bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asidlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, zincir reaksiyonlarını başlatır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (2).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikal etkisi sonucu, membranda bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri serbest radikal niteliği kazanmış olur. Oluşan lipid radikali dayanıksızdır ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra da lipid radikalinin moleküler oksijenle birleşmesi ile meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, başka membran lipidlerini etkileyip lipid radikali oluşumunu başlatır veya yapısına hidrojen atomu alarak lipid hidroperoksidlerine dönüşür. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek zincirleme reaksiyon tarzında devam eder (2,27).

Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, serbest radikallerle artar ve metallerin varlığında stimüle olur. Bu metaller süperoksit ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizler (27).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksidlerin yıkımı, geçiş metal iyonlarının katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksidleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asidlerinin peroksidasyonunda tiyobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehid meydana gelir. MDA lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Lipid peroksidasyonu direkt ve indirekt olarak hücre ve organellerin membranına zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Böylece membran yapı ve fonksiyonları bozulur (2,27).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

1. Otomatik pipet
2. Spektrofotometre (SHIMADZU, UV- 160 A)
3. Benmari (Kotterman)
4. Etüv (Heraeus, B 5042)
5. Karıştırıcı (NÜVE, SL 350)
6. Hassas terazi (CHYO JL-180)
7. pH metre (METTLER TOLEDO MP 220)
8. Vorteks (Windows VM3)
9. Santrifüj (MSE CENTAUR 2)
10. Santrifüj (Sigma 3K30)
11. Manyetik karıştırıcı (IKAMAG RH Janke ve Kunkel)
12. Derin dondurucu (-40°C, BOSH Automatic)
13. Sıvı azot tankı (International Cryogenics, Inc. IC 20D Storage Dewor)
14. Ultrasound homojenizatör (METU, Elektromekanik)
15. Eliza Cihazı (TECAN)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

1. Dithiobis-2-nitrobenzoik asid (DTNB, $C_4H_8N_2O_8S_2$, MA:396,35 g/mol, D8130, SIGMA)
2. Tris baz ($C_4H_{11}NO_3$, MA:121,14 g/mol, Art:8387, MERCK)
3. Metanol (CH_3OH , MA:32,04 g/mol, Art:6008, 1 lt: 0,79 kg, MERCK)
4. 2-Thiobarbütirik asid ($C_4H_4N_2O_2S$, MA:144,1 g/mol, Art:8180, MERCK)
5. Glasial asetik asid (CH_3COOH , %100, MA:60,05 g/mol, 1lt:1.05 kg, MERCK)
6. Sodyum hidroksid (NaOH, MA: 40 g/mol, B639062 016, MERCK)
7. Malondialdehid ($C_7H_{16}O_4$, MA:164,2 g/mol, T-1642, SIGMA)
8. Trikloroasetikasid, TCA (CCl_3COOH , MA:163,39 g/mol, Art:810, MERCK)
9. Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4 , MA:136,09 g/mol, Art:4871, MERCK)

10. Dipotasiumhidrojenfosfat (K_2HPO_4 , MA:174,18 g/mol, Art:5101, MERCK)
11. Streptomisin sülfat (MA:1457,4 g/mol, S-6501, SIGMA)
12. 2,4-dinitrofenilhidrazin, DNPH ($C_6H_6N_4O_4$, MA:198,14 g/mol, Art:803080, MERCK)
13. Etil asetat ($C_4H_8O_2$, MA:88,10 g/mol, 1lt:0,90 kg, Art: 864, MERCK)
14. Etanol (C_2H_5OH , MA:46,07 g/mol, 1lt:0,79 kg, Art:986, MERCK)
15. Guanidin hidroklorid ($CH_5N_3.HCl$, MA:95,53 g/mol, G-4505, SIGMA)
16. Hidroklorik asid (HCl, %37, MA:36,46 g/mol, 1lt:1,19 kg, Art:314, MERCK)
17. Sodyumbikarbonat (Na_2HCO_3 , MA:84,01 g/mol, Art:6223, MERCK)
18. Bakırsülfat.beşhidrat ($CuSO_4.5H_2O$, MA:249,68 g/mol, Art:2787, MERCK)
19. Folin reagent (2 Normal, F-9252, Lot:013K3692, SIGMA)
20. Bovin albumin (% 99'lük, A9647, SIGMA)
21. Glutasyon ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$, MA:307,3 g/mol, G-6529, SIGMA)
22. Vitamin E (α -tocopherol, % 95, $C_{29}H_{50}O_2$, MA: 430,71, T3251, SIGMA)
23. Diethylenetriamine penta acetic acid (% 99 'lük, $C_{14}H_{23}N_3O_{10}$, MA:393,35 g/mol, 32318, Bio Chemica)
24. Hsp70 eliza kit, EKS-700 B
25. Vitamin C (Askorbik asid, $C_6H_8O_6$, MA: 176,13 g/mol, MERC)
26. Hidrojen peroksid (%30'lük, H_2O_2 , MA: 34,01, H1009, SIGMA)
27. Histopatolojik inceleme için hematoksilen ve eozin boyası
28. Guaiacol ($C_7H_8O_8$, MA:124,14 g/mol, G 5502, SIGMA)
29. Aspirin tablet (100mg, Bayer)

3.3. Çalışma Popülasyonunun Özellikleri

Çalışmamız, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cerrahi Araştırmalar Laboratuvarında yaşları 5-6 ay arasında değişen, 250-300 gram ağırlığındaki 24 yetişkin Sprague – Dawley erkek rat üzerinde yapıldı.

Her grupta 8 rat olacak şekilde ratlar 3 gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol, ASA düşük doz, ASA düşük doz +antioksidan (vitamin C, E, glutatyon) olarak belirlendi. Düşük doz ASA grubuna aspirin (1.44 mg/kg) günde tek doz sabah 1 ml serum fizyolojik içinde süspansiyon haline getirilerek gavaj ile intragastrik verildi (23). Düşük doz ASA + antioksidan grubuna (1.44 mg/kg) aspirin ve günde tek doz antioksidan karışımı (vitamin C 50 mg/kg, vitamin E 25 mg /kg, redükte glutatyon 25 mg /kg) 1ml intragastrik verildi. Kontrol grubuna sabah günde 1 ml serum fizyolojik intragastrik verildi. Ratlar 40 gün boyunca, düzenli olarak, normal rat diyeti ile beslendi.

3.3.1. Çalışmanın Uygulanması

3.3.1.1. ASA Hazırlanması

0,036 gram aspirin tartılıp, porselen havanda ezildi, 100 ml serum fizyolojik içinde süspansiyon haline getirildi. 37 °C 'ye getirilmiş etüvde 10 dakika bekletildi. Süspansiyon iyice çalkalandı ve homojen dağılması sağlandı ve 1 ml enjektöre çekildi. Oral gavaj yoluyla rata 1 ml verildi.

3.3.1.2. Antioksidan Solusyonunun Hazırlanması

Antioksidan karışımı, 1 ml' de 6,25 mg vit E, 6,25 mg glutatyon ve 12,5 mg vit C olacak şekilde hazırlandı. Vitamin C 1,250 gram tartıldı, redükte glutatyon 0,625 mg tartıldı, E vitamini %96'lık solusyon (d=0,95 gr /ml şeklinde ve 1 ml 'sinde dx% , 0,95x0,96 1 ml'sindeki miktarı 0,912 gr bulunur) 0,629 gram tartıldı ve serum fizyolojik ile 100 ml hazırlandı.

3.3.1.3. Deneyin Yapılışı

Ratlar 40 gün boyunca takip edildi ve 40. günün sonunda çalışma sonlandırıldı.

1. Deney hayvanlarına kapalı fanus içerisinde eter ile inhalasyon anestezisi uygulandı.

2. Hayvanların kalbinden 3-4 ml kan biyokimya tüpüne alındı. Santrifüj edilerek serumuna ayrıldı. Serumlar analiz tarihine kadar – 40 °C'de saklandı.

3. Daha sonra, mide ve duodenum çıkarıldı. Çıkarılan mide ve duodenum serum fizyolojik ile yıkandı ve filtre kâğıdı ile kurulandı. Mide ve duodenum patolojik ve biyokimyasal inceleme için iki kısma ayrıldı. Patolojik inceleme için ayrılan mide ve duodenum kısımları % 10 formaldehit içinde ve oda ısısında saklandı. Biyokimyasal inceleme için ayrılan mide ve duodenum kısımlarının mukozası bistüri yardımıyla kazınarak çıkartıldı. Porselen havanda, sıvı azot içerisinde ezildikten sonra, eppendorf tüpü içerisindeki PBS tampona (pH 7.4, 10 mM) konarak tartıldı. Daha sonra sonikasyon aleti ile homojenizasyonun yapılabilmesi için +4 °C'de, 400 watt, 220 V'da bir dakika boyunca sonikasyona tabi tutuldu. Çalışma yapılana kadar numuneler - 40 °C'de saklandı.

Çalışma gününde, - 40 °C'de saklanan numuneler, oda ısısında çözülene kadar bekletildi. Numunelerin süpernatant kısmını ayırmak için santrifüj edildi ve yeterli miktarda süpernatant çalışma eppendorflara ayrıldı. Süpernatantlardan protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, myeloperoksidaz enzim aktivitesi, total tiyol miktarı ve hsp70 seviyesi belirlendi. Doku örneklerinin protein miktarı Lowry metodu ile tespit edildi. Sonuçlar protein oksidasyon düzeyi için nmol/mg protein, lipid peroksidasyon, total tiyol $\mu\text{mol/mg}$ protein, hsp70 ng/ml ve myeloperoksidaz aktivitesi U /gram protein şeklinde ifade edildi. Ayrıca serumda protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu düzeyleri çalışıldı.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Serum ve Doku Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini

Lipid peroksidasyon düzeyi, Varshney ve Kale tarafından tariflenen tiyobarbitürik asid-reaktif substratları (TBARS) metodu (81) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar mide ve duodenum dokusu için mg protein başına malondialdehid (MDA), serum için ise $\mu\text{mol/l}$ olarak verildi.

Bu metotta, lipid peroksidasyon aldehid ürünlerinden olan malondialdehid ile tiyobarbitürik asid reaktivitesi esas alınmıştır.

Reaktifler;

1. TBA: 52 mM, pH: 2,1

0.187 gram TBA tartılıp, 1 M 15 ml glacial asetikasid içerisinde çözüldü ve NaOH ile pH'sı 2.1'e getirildi. Hacim balon joned 25 ml'ye tamamlandı.

2. Tampon solüsyonu: $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM, pH: 7,4

3,402 gram KH_2PO_4 ve 4,354 gram K_2HPO_4 tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra, NaOH ile pH 7,4'e getirildi ve çözelti miktarı balon jodede 250 ml'ye tamamlandı.

3. Standart (MDA): 10 $\mu\text{mol/L}$

6 molar olan ana stoktan 16,6 μl alınıp, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4. TCA: %30

15 gram TCA tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra çözelti miktarı balon jodede 50 ml'ye tamamlandı.

5. 15 ml, 1 M glacial asetik asit hazırlanması, 0,907 gr glacial asetik asit almamız gerekecek, sıvı olduğu için, 0,907 gr yerine ona tekabül eden 864 μl ana stoktan alıp, distile su ile mezürde 15 ml'ye tamamlandı.

Tablo IV: Serum ve doku için lipid peroksidasyon düzeyi tayininin çalışma prosedürü

	Numune (serum)	Numune (süpernatant)	Standart	Kör
Serum	200 μl			
Süpernatant		200 μl		
Standart			200 μl	
Deiyonize su				200 μl
Tampon	800 μl	800 μl	800 μl	800 μl
TCA	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
TBA	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl

Deney tüpleri vorteks ile karıştırıldı ve 80 °C'lik su banyosunda 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, oda ısısında 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Köre karşı, süpernatant kısım 532 nm'de okundu.

3.4.2. Serum ve Doku Protein Oksidasyon Düzeyinin Tayini

Protein oksidasyonunun tayini, spektrofotometrik yöntemle Levine ve arkadaşlarının kullandığı yöntem (38) modifiye edilerek yapıldı. Hayvan doku ve vücut sıvılarında, oksidatif protein hasarının genel ölçümü olarak karbonil ölçümü geliştirilmiştir. Bu

ölçüm protein karbonil gruplarının, 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girerek kromoforik dinitrofenilhidrazonların oluşması esasına dayanmaktadır.

Reaktifler;

1. Tampon solüsyonu: 100 mM, pH: 7,4

6,804 gram KH_2PO_4 ve 8,708 gram K_2HPO_4 tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra, 0,1 M NaOH ile pH 7,4'e getirildi ve çözelti miktarı balon jodede 500 ml'ye tamamlandı.

2. Streptomisin sülfat: %10

1 gram streptomisin sülfat tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra çözelti miktarı balon jodede 10 ml'ye tamamlandı.

3. DNPH: 10mM

0,1 gram DNPH tartılıp 2 M HCl içerisinde çözüldükten sonra çözelti balon jodede HCl ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. TCA: %20

10 gram TCA tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra çözelti miktarı balon jodede 50 ml'ye tamamlandı.

5. Etil asetat: Etanol (1:1 V/V)

25 ml etil asetat 25 ml etanol ile karıştırıldı.

6. Guanidin hidroklorid: 6M

28,66 gram guanidin hidroklorid tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra çözelti miktarı balon jodede 50 ml'ye tamamlandı.

7. 2 N HCL, 50 ml

% 37'lik HCL' den 8,3 ml aldık balon joje ile 50 ml'ye tamamladık.

Çalışma sırasında, önceden doku homojenatı oda ısısında çözüldükten sonra, 400 µl homojenat ve 400 µl eppendorfa konuldu. DNA ve RNA'daki okside olmuş proteinlerin sonuçları etkilememesi için 20 µl streptomisin sülfat eklendi ve 15 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra oda ısısında, 3000 rpm'de, 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ve serum kısmı ayrıldı. Her numune için iki eppendorf tüp oluşturuldu.

Tablo V: Serum protein oksidasyon tayini çalışma prosedürü

	1. tüp	2.tüp
Serum	100µl	100µl
DNPH	400 µl	
2 M HCL		400 µl

Vortex ile karıştır ve oda ısısında, karanlıkta, şeykırda 1 saat inkübe edildi

TCA	100 µl	100 µl
-----	--------	--------

Vortex ile karıştır ve 15 dakika oda ısısında bekletildi. 3400 g' de santüfjü edildi ve süpernatantı atıldı. Pellet 1,25 ml etil asetat:etanol karışımı ile 3 defa yıkanır ve her seferinde 3000 g'de 10 dakika oda ısısında santrifjü edilir. Süpernatant her seferinde atılır.

Guanidin Hidroklorid	940 µl	940 µl
----------------------	--------	--------

Oda ısısında, karanlıkta, şeykırda 1 saat karıştır. Deney prosedürü tamamlandıktan sonra 1. tüpteki materyal spektrofotometrede 370 nm'de okundu. 2. tüpteki materyal ise hem 370 nm'de hem de 280 nm'de okundu.

Tablo VI: Doku protein oksidasyon tayini çalışma prosedürü

	1. tüp	2.tüp
Süpernatant	200µl	200µl
DNPH	800 µl	
2 M HCL		800 µl

Vortex ile karıştır ve oda ısısında, karanlıkta, şeykırda 1 saat inkübe edildi

TCA	200 µl	200 µl
-----	--------	--------

Vortex ile karıştır ve 15 dakika oda ısısında beklet. 3400 g' de santrifjü edildi ve süpernatantı atıldı. Pellet 1,25 ml etil asetat:etanol karışımı ile 3 defa yıkanır ve her seferinde 3000 g'de 10 dakika oda ısısında santrifjü edildi. Süpernatant her seferinde atıldı.

Guanidin Hidroklorid	940 µl	940 µl
----------------------	--------	--------

Oda ısısında, karanlıkta, şeykırda 1 saat karıştırdı.

Deney prosedürü tamamlandıktan sonra 1. tüpdeki materyal spektrofotometrede 370 nm'de okundu. 2. tüpteki materyal ise hem 370 nm'de hem de 280 nm'de okundu.

Hesaplama:

$$\Delta A_{370} = 370 \text{ nm'de 1.tüp Abs değeri} - 370 \text{ nm'de 2.tüp Abs değeri}$$

$$\text{Karbonil konsantrasyonu (nmol/ml)} = \Delta A_{370} \times 45,45$$

$$\Delta A_{280} (2. \text{ tüp numunenin protein konsantrasyonu, mg/ml}) = 280 \text{ nm'de 2.tüp Abs değeri} \times 1,8$$

$$\text{Karbonil konsantrasyonu (nmol/mg protein)} = \frac{\text{nmol/ml karbonil konsantrasyonu}}{\text{mg/ml protein konsantrasyon}}$$

3.4.3. Doku Myeloperoksidaz Aktivite Tayini

Mide ve duodenum mukozal dokusunda MPO enzim aktivitesi tayini okside guaiacol'ün absorbansının spektrofotometrik ölçülmesi esasına dayanılarak modifiye edilmiştir (97).

Reaktifler:

1. MPO reaktifi 500 ml, 20 mM, pH:7, olan fosfat tamponun içinde olacak şekilde 14 mM guaiacol, 0,25 mM H₂O₂, 200 µM DTPA içerecek şekilde hazırlanır.

2. 1,3624 gr KH₂PO₄ tartılır, bir miktar 200 ml distile suda çözülür ve pH : 7 'ye ayarlanır.

3. 9,1 M olan guaiacol stoğundan 400 µl alınır, tampon çözeltisinin içine konulur.

4. % 30 'luk olan H₂O₂ stoğundan 8,7 µl alınır.

5. DTPA 'dan 0,02 g tartılır, tampon çözeltisinde çözüldükten sonra distile su ile toplam volüm 500 ml 'ye tamamlanır.

Tablo VII : Doku MPO aktivite tayini çalışma prosedürü

	Numune	Kör
Süpernatant	0,2 ml	-
Distile su	-	0,2
MPO reaktifi	0,8 ml	0,8

Reaktif ve süpernatant karıştırınca 0. ve 1. dakikada 470 nm 'de okuma yapıldı.

Deneyin prensibi: 1 ünite enzim aktivitesi; 25 °C, pH=7, dakikada 1µmol substratı (H₂O₂) ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanır.

2 Guaiacol + H₂O₂ → 2 O Guaiacol + 2 H₂O formülünden görüldüğü gibi,

$\Delta A = 26,6 \times 1 \text{ cm} \times \text{konsantrasyon}$

$\Delta A = 1. \text{ dakika absorbans} - 0. \text{ dakika absorbans}$

26,6: Okside diguaiacol ekstinsiyon katsayısı, 470 nm' de (ϵ , mM/cm)

1cm: Işık yolu

Enzim aktivitesi U/ g protein olarak ifade edildi.

3.4.4. Doku Hsp 70 Seviyesi Eliza Yöntemi İle Ölçümü

Doku hsp 70 proteini eliza yöntemi (EKS 700 B elisa Stressgen) ile ölçüldü. Bütün dokular tartıldı ve homojenize edildi. (Sonuçlar 50 mg dokuya göre standardize edilerek, ng/ml cinsinden verilmiştir).

Kullanılacak reaktiflerin ve standartların hazırlanması

1. +4 °C'de sakanan reaktifler oda ısısına getirildi, standartlar ve numuneler buz üstünde hazırlandı..

2. 10µg/ml olan standart stok solusyondan sample dilüentle seri dilüsyon yaparak, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 ng/ml olan standartlar hazırlandı.

3. 20 kat konsantre olan wash buffer 100 ml solüsyon, 1900 ml distile su ile dilüe ederek hazırlandı.

Testin Prosedürü

1. 96'lık well plate buz üstüne konuldu.

2. Standartlar çift çalışıldı, her bir standart 100 µl, numune 100 µl konuldu ve blanke de sample dilüentten 100 µl konuldu. Oda ısısında 2 saat inkübasyon yapıldı.

3. Otomatik mikropate yıkayıcı ile her kuyucuk önce aspire edildi. Sonra her bir kuyucuk 400µl wash buffer ile 4 kez yıkandı ve içeriği aspire edildi. Plate ters çevrildi ve temiz bir peçete ile hafifçe kurulandı.
4. Hsp 70 antikor her bir kuyucuğa 100 µl eklendi ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
5. Hsp 70 konjugat her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
3. adımdaki gibi kuyucukların yıkanması yapıldı.
6. 100 µl TMB substrate kuyucuklara eklenir. Bir dakika içinde renk değişimi gözlenir. Oda ısısında 30 dakika inkübe edilir. 100 µl stop solusyon her kuyucuğa eklenir.
7. 450 nm'de mikropate okuyucuda okundu. Standartların konsantrasyonu x ekseninde, absorbansları y ekseninde olacak şekilde grafik çizilerek numunelerin absorbansları bulundu ve sonuçlar ng/ml olarak verildi.

3.4.5.Total Tiyol Düzeyinin Tayini

Total tiyol miktarı, Sedlak ve Lindsay 'ın metodu kullanılarak belirlendi (60).
Reaktifler;

1. Tampon solüsyonu: 0,2 M Tris baz, 0,02 M EDTA, pH:8,2

6,057 gram Tris baz ve 1,4612 gram EDTA tartılıp bir miktar distile suda çözüldü ve pH 8,2'ye getirildi sonra çözelti miktarı balon jodede 250 ml'ye tamamlandı.

2. DTNB (Ellman's reagent): 0,01 M

0,396 gram DTNB tartılıp bir miktar metanolde çözüldükten sonra çözelti miktarı metanol ile balon jodede 100 ml'ye tamamlandı.

3. Metanol

4. Standart glutatyon: 1000 µmol/L

0,03072 gram glutatyon tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra çözelti miktarı balon jodede 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra seri dilüsyonla standartlar hazırlandı.

Tablo VIII: Doku total tiyol tayini çalışma prosedürü

	Numune	Standart	Kör
Süpernatant	100µl		
Standart		100µl	
Deiyonize su			100µl
Tampon	300 µl	300 µl	300 µl
DTNB	20 µl	20 µl	20 µl
Metanol	1580 µl	1580 µl	1580 µl

Tüpler karıştırıldıktan sonra 20 dakika bekletildi. Daha sonra 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı 412 nm'de okundu.

3.4.6. Protein Miktarının Tayini

Protein miktarının tayini, Lowry ve arakadaşlarının (43) metodu kullanılarak yapıldı. Lowry metodu, alkali ortamlarda peptid nitrojenlerin bakır iyonları ile reaksiyonu ve daha sonra aromatik aminoasitlerin bakır katalizli oksidasyonu aracılığı ile ortama konulan Folin reaktifinin heteropolimolibden mavisine indirgenmesi esasına dayanmaktadır.

Reaktifler;

1. Solüsyon A: Na_2CO_3 , %2 (w/v)

2 gram Na_2CO_3 tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jodede 100 ml'ye tamamlandı.

2. Solüsyon B: $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, %1 (w/v)

0,1 gram $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jodede 10 ml'ye tamamlandı.

3. Solüsyon C: Na-K tartarat, %2 (w/v)

4 sulu Na-K tartarattan 0,26 gram tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jodede 10 ml'ye tamamlandı.

4. Complex Forming Reagent

Solüsyon A, B, C'den sırası ile 100:1:1 oranında, çalışma yapılmadan hemen önce karıştırıldı.

5. NaOH: 2 N

4 gram NaOH tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon jodede 50 ml'ye tamamlandı.

6. Folin Reagent: 1 N

2 N Folin reagent ana stoğundan 50 ml alındı ve distile su ile 100ml' ye tamamlandı.

7. Albumin standartı: 2 mg/ml

0,002 gram albumin tartıp 1ml'ye tamamlayarak çözüldü. Bundan seri dilüsyonla standartlar hazırlandı.

Tablo IX: Protein miktarı tayininin çalışma prosedürü

	Numune	Standart	Kör
Süpernatant	100µl		
Standart		100µl	
Deiyonize su			100µl
NaOH	100µl	100µl	100µl

Örnekler 100 °C su banyosunda 10 dakika bekletildi ve oda ısısına gelene kadar dışarıda tutuldu.

Complex- Forming Reagent	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Folin Reagent	100 µl	100 µl	100 µl

Daha sonra tüpler karıştırıldı ve oda ısısında 30-60 dakika bekletildikten sonra numuneler 550 nm'de okundu.

3.5. Mide ve Duodenum Patolojik Değerlendirme

%10 formaldehit içinde saklanan mide ve duodenum dokularından 3-4 mm'lik kesitler alınarak Hematoksilen&Eozin (HE) boyaması yapıldı. Patolojik değerlendirme Uzman Patolog tarafından Patoloji Bölümünde yapıldı. Mide ve duodenum mukozal hasarlara Tablo X 'daki skorlama sistemine göre derecelendirme yapıldı.

Çalışmamızdaki mide ve duodenum mukozaldokularına verilen skorlar en düşük 0 ve en yüksek 4 olarak derecelendirildi (21).

Tablo X: Mide ve Duodenum Histopatolojik Lezyon Skoru

Skor 0	Lezyon yok
Skor 1	Luminal yüzey ve gastrik pit hasarı
Skor 2	Yüzey gastrik gland hasarı
Skor 3	Derin gastrik gland hasarı
Skor 4	Ülser

3.6. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Veriler excel programına girildi. SPSS (Inc, Chicago, ILL,15.0) istatistik programı kullanılarak istatistiki analiz yapıldı. Gruplardaki rat sayıları 8 tane olduğundan dolayı testlere nonparametrik test uygulandı. Gruplar arasında fark olup olmadığını anlamak için non parametrik test olan Kruskal-Wallis testi uygulandı ve $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Kruskal-Wallis testi ile serum lipid peroksidasyonu, mide mpo, duodenum tiyol, mide hsp 70 düzeyleri gruplar arasında anlamlı ($p<0.05$) bulundu. Farkın hangi gruptan olduğunu anlamak için, Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi yapıldı. Sonuçlar ortanca (Min-Max) olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1.Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamız kapsamında; serum lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyi, mide ve duodenum mukozal dokuda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu, MPO enzim aktivitesi, tiyol seviyesi, hsp70 seviyesi ölçüldü. Mide ve duodenum mukozal lipid peroksidasyonu ve tiyol seviyesi $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, protein oksidasyonu nmol/mg protein, MPO U/g protein, hsp70 (sonuçlar 50 mg dokuya göre standardize edilerek, ng/ml cinsinden verilmiştir) ng/ml olarak verilmiştir.

Serum lipid peroksidasyonu $\mu\text{mol}/\text{L}$ MDA, serum protein oksidasyonu nmol/mg protein olarak verildi. Çalışmada lipid peroksidasyonu, total tiyol, lowry metodu, hsp70 için her birinin ayrı standartları ile eğriler çizilerek hesaplandı.

Tablo XI: Serum protein oksidasyonu ve serum MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı

Parametreler	Kontrol (n=8)	ASA N=8	ASA+Antioksidan N=7	P
Serum protein oksidasyonu (nmol/mg protein)	5,02 (0,0 - 7)	3,3 (2,5 -5)	2,3 (0,74 -5,34)	p>0,05
Serum MDA (μ mol/L)	0,20 (0,14 - 0,4)	0,49(0,19-2,9)	0,35 (0,1 - 3,7)	P<0,05

Değerler ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

Tablo XII: Mide dokusunda çalışılan testlerin gruplara göre dağılımı

Parametreler	Kontrol (n=8)	ASA N=8	ASA+Antioksidan N=7	P
Protein oksidasyonu (nmol/mg protein)	4,1 (2,8 - 6,7)	5,9 (1,9-11,54)	4,34 (2,28 - 9,8)	p>0,05
MDA (μ mol/mg protein)	0,04 (0,02 - 0,09)	0,03 (0,02-09)	0,025 (0,02 - 0,09)	p>0,05
MPO aktivitesi (U/g protein)	0,36 (0,18 - 5,82)	5,6 (0,09-17,5)	0,16 (0,04 - 1,23)	P<0,05
Hsp 70 (ng/ml)	4,8 (2,5 - 9,52)	16,1 (2,37-65,65)	6,6 (2,11 - 10)	P<0,05
Tiyol (μ mol/mg protein)	0,28 (0,09 - 0,77)	0,49 (0,26-1,5)	0,27 (0,02-1,13)	p>0,05

Değerler ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

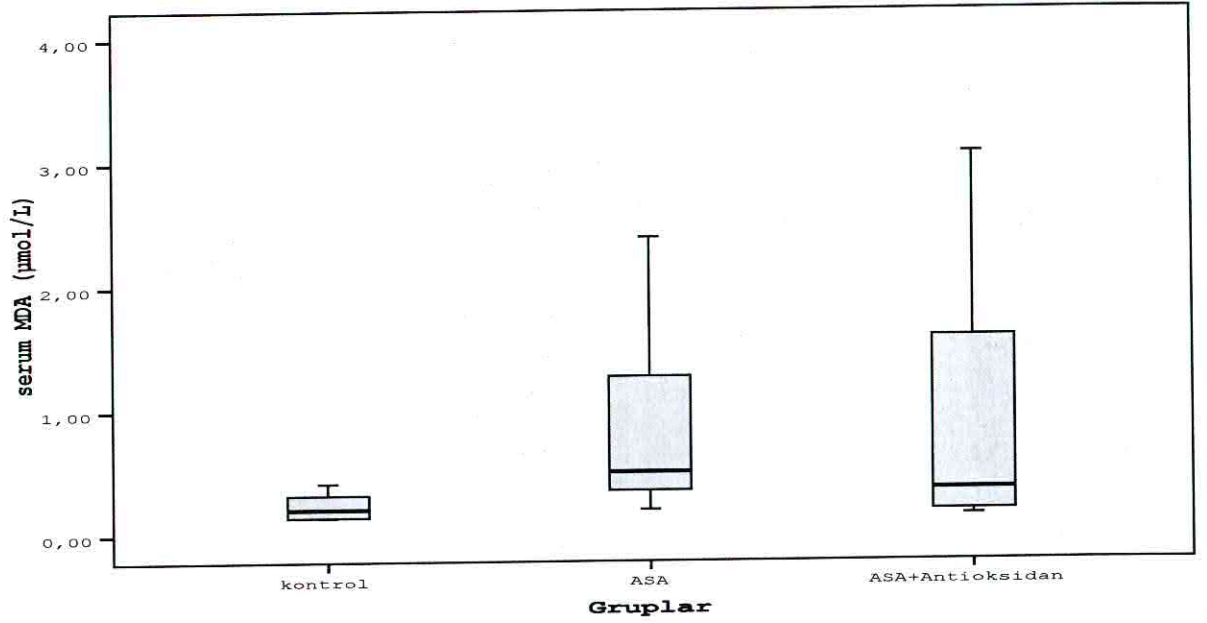
Tablo XIII: Duodenum dokusunda çalışılan testlerin gruplara göre dağılım

Parametreler	Kontrol (n=8)	ASA N=8	ASA+Antioksidan N=7	P
Protein oksidasyonu (nmol/mg protein)	3,02 (1,61-7,19)	5,5 (1,57-1,11)	3,8 (0,0-9,6)	p>0,05
MDA (µmol/mg protein)	0,5 (0,12-1,54)	0,33 (0,03-1,02)	0,28 (0,08-2,02)	p>0,05
MPO aktivitesi (U/g protein)	6,7 (0,04-7,7)	2,86 (0,35-13,9)	2,3 (0,28-11,45)	p>0,05
Hsp70 (ng/ml)	4,6 (1,03-9,4)	4,3 (1,34-10)	3,2 (1,7-13,5)	p>0,05
Duodenum Tiyol (µmol/mg protein)	0,01 (0,0-0,07)	0,07 (0,0-0,45)	0,03 (0,01-0,06)	P<0,05

Değerler ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

Serum, mide ve duodenum protein oksidasyonu düzeyi açısından 3 grup karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır (p>0.05, Tablo XI, XII, XIII).

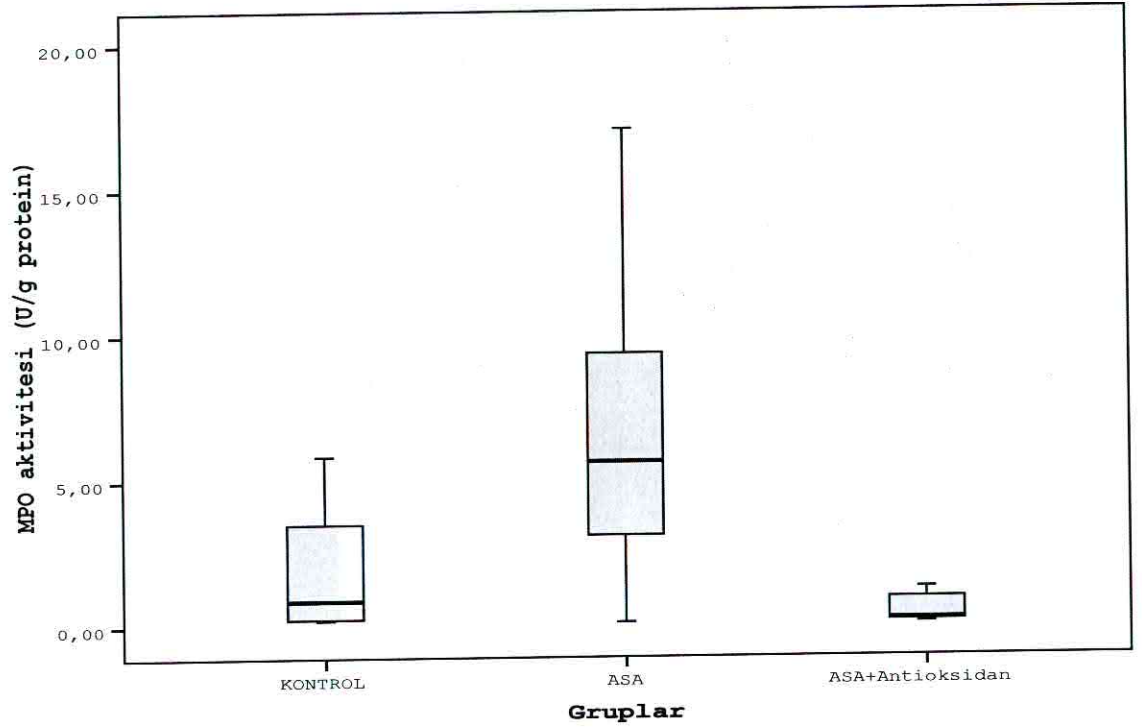
Serum lipid peroksidasyonu düzeyi; kontrol grubunda 5,02 (0,0 - 7), ASA grubunda 3,3 (2,5 -5), ASA+antioksidan grubunda 2,3 (0,74 -5,34) µmol/L olarak bulunmuştur (Tablo XI, şekil13). Kontrol grubu ve ASA grubu karşılaştırıldığında, ASA grubunda serum lipid peroksidasyonu düzeyi yüksek bulunmuştur ve istatistikî olarak bu yükseklik anlamlıdır (p=0.007). Ancak kontrol grubu ile ASA+antioksidan grubu (P=0.072) ve ASA grubu ile ASA+antioksidan grubu, (p=0.536) karşılaştırıldığında, istatistikî olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Mide lipid peroksidasyonu ve duodenum lipid peroksidasyonu düzeyleri açısından gruplar arasında fark olmadığı saptanmıştır (p>0.05).



Şekil 13: Grupların serum MDA düzeylerinin grafiği

Serum MDA düzeyleri, kontrol grubu ve ASA grubu arasında $p=0.007$ bulundu. Kontrol grubu ve ASA+ Antioksidan grubu arasında $p=0.072$, ASA-ASA +Antioksidan grubu arasında $p=0.536$ bulundu.

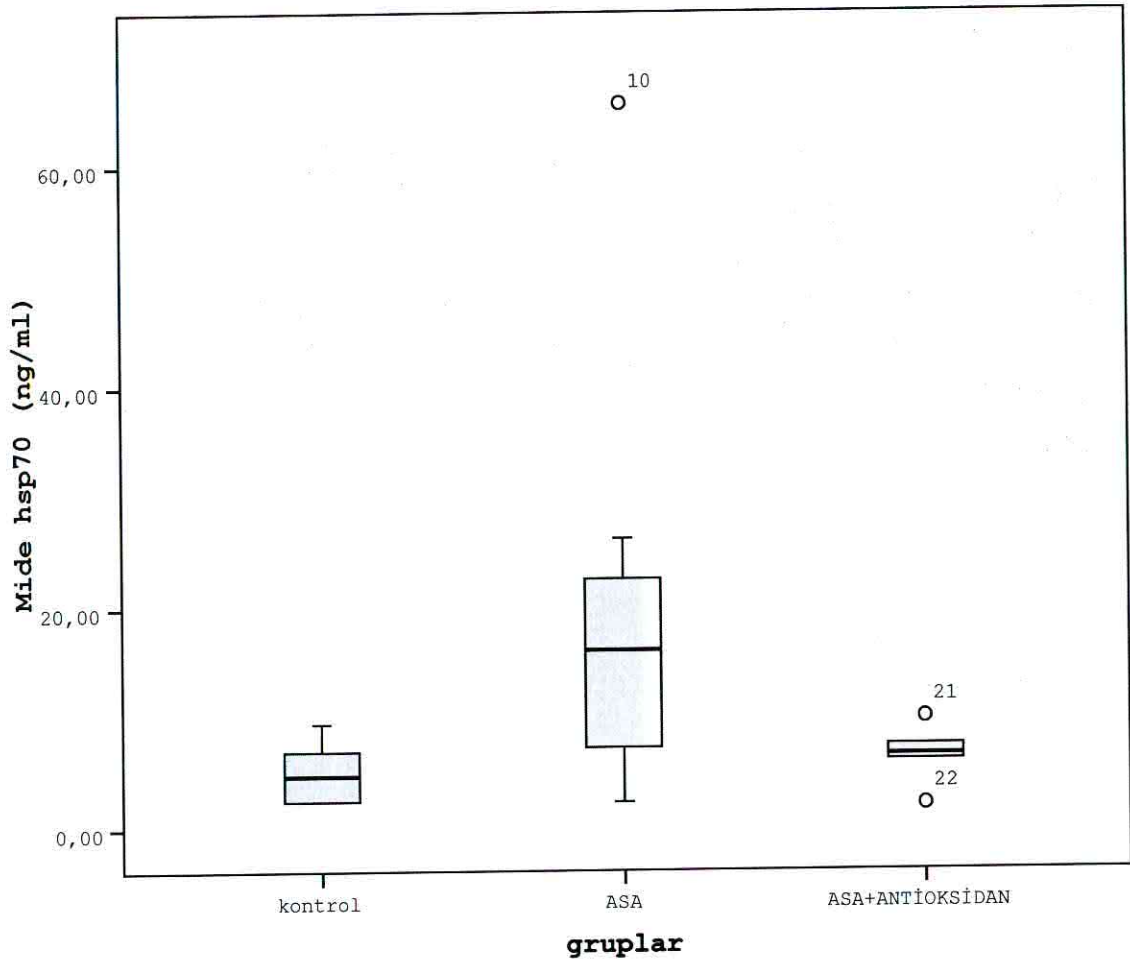
Mide MPO enzim aktivitesi düzeyi, kontrol grubunda 0,86 (0,18-5,82) Ü/gram protein, ASA grubunda 5,6(0,09-17,5) U/gram protein, ASA+antioksidan grubunda 0,16 (0,04-1,23) U/gram protein olarak bulunmuştur (TabloXII,şekil14). Kontrol ile ASA grubu karşılaştırıldığında, ASA grubunda MPO enzim aktivitesi düzeyi, kontrol grubundan yüksek bulunmuştur, ancak bu yükseklik istatistikî olarak anlamlı bulunmamıştır($p=0.065$). Kontrol grubu ile ASA+antioksidan grubu karşılaştırıldığında, ASA+ antioksidan grubunda MPO enzim aktivitesi düzeyi, kontrol grubundan düşük bulunmuştur ancak istatistikî olarak anlamlı değildir ($p=0.072$). ASA grubu ile ASA+ antioksidan grubu arasında MPO enzim aktivitesi düzeyi karşılaştırıldığında, ASA grubunda, MPO enzim aktivitesi düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.009$). Duodenum MPO enzim aktivitesi düzeyi, kontrol grubunda 6,7 (0,04-7,7), ASA grubunda 2,86(0,35-13,9), ASA+antioksidan grubunda 2,3 (0,28-11,45) bulunmuştur (Tablo XIII). Yapılan istatistikî analizde, 3 grup duodenum MPO enzim aktivitesi düzeyi açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 14: Grupların mide MPO aktivitesi düzeylerinin grafiği

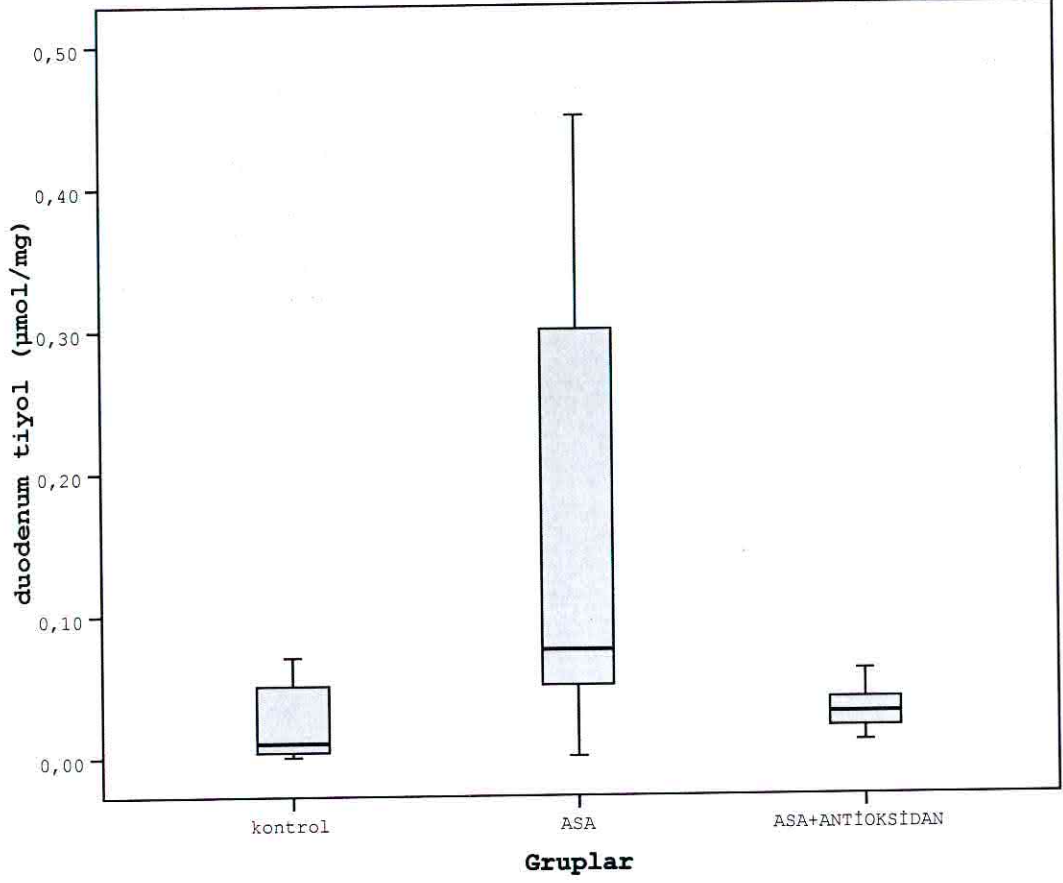
Mide mukozası MPO aktivitesi düzeyleri kontrol-ASA arasında $p=0.065$, Kontrol-ASA+Antioksidan grubu arasında $p=0.072$ bulunmuştur. ASA+Antioksidan grubu arasında istatistikî olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.009$).

Mide Hsp70 seviyesi, kontrol grubunda 4,8 (2,5-9,52), ASA grubunda 16,1 (2,37-65,65), ASA+ antioksidan grubunda 0,16 (0,04-1,23) bulunmuştur (Tablo XII). Yapılan istatistiki analiz sonrası mide hsp70 seviyesi, ASA grubunda, kontrol grubuna ve ASA+antioksidan grubuna göre istatistiki olarak yüksek saptanmıştır ($p<0.05$). Duodenum hsp70 seviyesi açısından 3 grup karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p=0.932$).



Şekil 15: Grupların mide mukozası hsp70 düzeylerinin grafiği

Mide total tiyol seviyesi açısından, 3 grup karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p=0.359$). Duodenum total tiyol seviyesi kontrol grubunda 0,01 (0,0-0,07), ASA grubunda 0,07 (0,0-0,45), ASA+antioksidan grubunda 0,03 (0,01-0,06) bulunmuştur (Tablo XIII) ve yapılan istatistiki analiz sonrası kontrol grubu ile ASA grubu ($p=0.028$) karşılaştırıldığında ASA grubunda duodenum total tiyol seviyesi yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ile ASA+antioksidan grubu ($p=0.414$) arasında ve ASA ile ASA+antioksidan grubu arasında istatistiki olarak fark saptanmamıştır ($p=0.043$).



Şekil 16: Grupların duodenum total tiyol düzeylerinin grafiği

4.2. Patolojik Bulgular

Tablo 1 ve 2 'de görüldüğü gibi, ASA grubunda kontrol grubu karşılaştırıldığında ASA kullanımının gastrik pit ve luminal yüzey hücre hasarı oluşturduğu görülmüştür. Düşük doz aspirin ile birlikte antioksidan alındığında mide ve duodenum total lezyon skoru azalmıştır (Tablo XIV, XV, resim 1,2).

Tablo XIV: Mide Histopatolojik Skorlaması

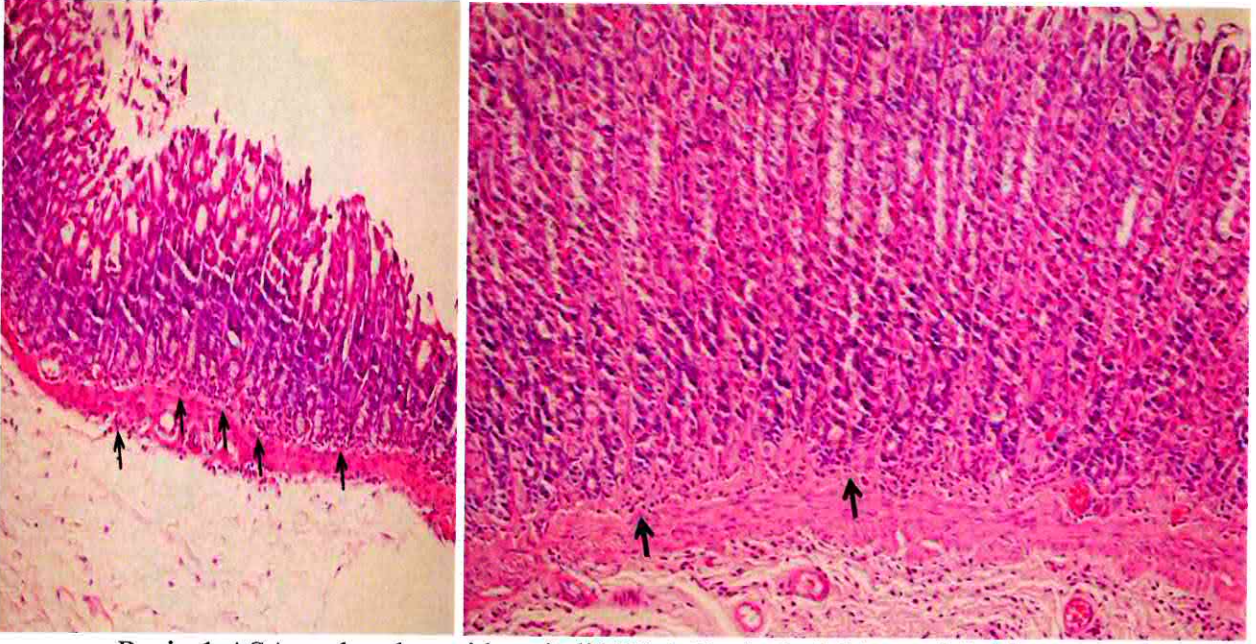
Gruplar	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3	Skor 4	Toplam Skor
Kontrol (n=8)	-	2	-	-	-	2
ASA (n=8)	-	4	3	-	-	7
ASA+Antioksidan (n=7)	-	3	-	-	-	3

(0): lezyon yok, (1): gastrik pit ve luminal yüzey hücre hasarı, (2): yüzeysel gastrik gland hasarı, (3): derin gastrik gland hasarı, (4) ülser

Tablo XV: Duodenum Histopatolojik Skorlaması

Gruplar	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3	Skor 4	Toplam Skor
Kontrol (n=8)	-	2	-	-	-	2
ASA (n=8)	-	7	-	-	-	7
ASA+Antioksidan (n=7)	-	5	-	-	-	5

(0): lezyon yok, (1): gastrik pit ve luminal yüzey hücre hasarı, (2): yüzeysel gastrik gland hasarı, (3): derin gastrik gland hasarı, (4) ülser



Resim1:ASA grubundan mide epiteli(400x) Resim2: ASA+ antioksidan(200x)

Resim 1'de ASA grubunda mide epiteli inceldiği, lüminal bölgede epitel hücrelerde dökülme olduğu ve yoğun lökosit infiltrasyonu görölmektedir.

Resim 2'de ASA + antioksidan grubunda epitel yapı daha kalındır ve lökosit infiltrasyonu daha azdır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Düşük doz aspirin (75-150 mg/gün), iskemik kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklarda, olası trombus ve emboli'nin primer veya sekonder profilaksisinde en yaygın kullanılan nonsteroidal antiinflatuar ilaçlardan biridir (1). Litaratürde mevcut olan insan ve hayvan çalışmalarında, düşük doz aspirin kullanımına bağlı, gastroduodenal ülserasyon, erozyon ve kanamaya yol açabilecek gastrointestinal sistem mukozal hasarı olduğu gösterilmiştir (13,14,72,77,87). Aspirine bağlı gelişen gastrik ve duodenal mukozal hasarın patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, NSAID'in yaptığı gastrik ve duodenal hasarın patogenezinde nötrofil infiltrasyonu ile beraber olan serbest radikal artışının önemli yer tuttuğuna ilişkin kanıtlar vardır (92,95,96). Gastrointestinal sistemin NSAID, alkol, stres ve *H. pylori*, reperfüzyon kaynaklı mukozal hasarda serbest oksijen radikallerinin ve lökosit infiltrasyonunun rolü gösterilmiştir (90,91,92,93,94,95,96).

Aspirinin prostaglandin sentezini inhibe ettiği, buna bağlı olarak mukus ve bikarbonat sekresyonunun, yüzey aktif fosfolipidlerin ve mukozal kan akımının azalmasına neden olduğu ve böylece mide mukozasının koruyucu unsurlarını zayıflattığı bilinmektedir (18,39,40,41,45). Bunun dışında topikal etkisi ile direkt olarak mukozayı hasarlandırıcı etkisi de bulunmaktadır (18,41,45). Topikal etki ve sistemik etki sonucunda, prostaglandin sentezinin azalması, lökotrien sentezinin relatif artışı, mukus sekresyonu, bikarbonat sekresyonu azalması, mukozal kan akımının azalması doku inflamasyonunu başlatır. Lökositlerin inflamasyon alanına göçü artar. Mukozal dokunun antioksidan savunma gücünün yetersiz kalması ve ROS' un aşırı artması, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve sonuçta doku hasarını başlatır (18,39,40,41,45). Daha önceki çalışmalarda, protein oksidasyonu (protein karbonilleri) ve lipid peroksidasyonu oksidatif stres ve doku hasarında biyomarkır olarak kullanılmıştır (3,55,91,95). Bizim çalışmamızda, gastrik mukozal dokuda protein karbonillerinin ortanca değerleri, aspirin kullanımıyla kontrol grubuna göre % 26.4 yüksek bulunmuştur (Tablo XII,XIII,şekil13). Uzun dönem, düşük doz aspirin kullanımıyla gastrik ve mukozal dokuda protein yapıda oksidatif hasar oluşmuştur. Böylece düşük doz aspirin kullanımına bağlı, gastrik ve mukozal hasarda oksidatif stresin varlığı düşünülmüştür. Gastroduodenal hasar ve iyileşmeyi takiben artış gösteren TNF- α , IL-8

ve PAF adezyon moleküllerini uyararak (CD_{11b}/CD₁₈, ICAM-1) başta nötrofiller olmak üzere, lökositlerin aktivasyonu sonucu hasarlı alana göçünü ve inflamasyonu ilerletir (45). Aktive nötrofiller, ROS ve proteazlar üreterek mikrovasküler ve parankimal hasar oluştururlar (45,91,92). Bizim çalışmamızda, nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan gastrik mukozal MPO aktivitesi ASA grubunda kontrole karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur (TabloXI, şekil 14). Bu bulguların sonucu olarak, düşük doz aspirinin sebep olduğu hasarın gelişiminde, nötrofil aktivasyonu ve nörofillerin sebest radikal oluşturması önemli görülmektedir. İlave olarak, vitamin E, vitamin C ve glutasyon alımıyla MPO aktivitesi önemli ölçüde düşürülmüştür (Şekil 14).

Gastrointestinal sistem antioksidanları içinde, vitamin E, vitamin C ve redükte glutasyon oldukça önemlidir (21). Vitamin E, yağda çözünen bir vitamindir ve hücre membranlarının lipid peroksidasyondan korunmasında ilk savunma hattıdır. Lipid peroksi radikallerini, lipid peroksidlere indirgeyerek lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktadır. Ayrıca E vitamini glutasyon ve glutasyon peroksidaz enzimi ile serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler (2,50,63,65). İndometazin kullanımına bağlı ratlarda oluşturulan gastrik ülserlerde gastrik mukozada E vitamini konsantrasyonu düşük bulunmuştur (93). Vitamin C, süperoksid ve hidroksil radikallerinin temizlenmesi sağlar ve E vitaminin radikal formunu indirgeyici özelliğe sahiptir (52,53,63). Redükte glutasyon (GSH), hücre içinin major antioksidanıdır. Hücreler için önemli bir tiyol kaynağıdır (93). Ayrıca gastrik mukozal glutasyon seviyeleri indometazinin yaptığı gastrik hasarda azalmıştır (93). Etanolün sebep olduğu gastrik mukozal hasarda, glutasyonun mukozal hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (46). Gastrik mukozada ROS aşırı üretimi, glutasyonun azalması, glutasyon peroksidaz enziminin inhibisyonu oksidan stres ve doku hasarını başlatmaktadır (93). Daha önceki çalışmalarda vitamin C ve E'nin aspirinin sebep olduğu gastrik hasarda, nötrofil aktivasyonunu ve oksidatif stresi inhibe ettiği gösterilmiştir (21,55). Bizim çalışmamızda, uzun süreli, düşük doz aspirin kullanımının gastrik ve duodenal hasarı azaltması ya da tamamen önlenmesi hipotez edilmiştir.

Bu çalışmada, önceki çalışmalarla farklı olarak düşük doz (1,44 mg/kg) aspirinin 40 gün kullanımıyla gastrik ve duodenal mukozal hasar geliştirilmiştir (1,23). Patolojik hasar, önceki çalışmalarla uyumlu olarak gastrik mukozada duodenal mukozaya göre daha yüksek bulunmuştur (TabloXIV,XV,resim1,2). Aspirinle beraber antioksidan

kullanımı mide ve duodenum mukozal hasarı azaltmıştır (TabloXIV,XV). Ayrıca, literatürdeki diğer rat çalışmalarda, aspirin dozu 200-300 mg/kg dozunda verilmiş ve çalışma saatler içinde sonlandırılmıştır (21,31,55,71,91).

Isı şok proteinleri (heat shock protein) protein oksidasyonu ve NSAID'lara bağlı gelişen çeşitli hücrel streslerle indüklenirler. Bu proteinlerden olan hsp 70'in NSAID'ların neden olduğu gastrik mukozal hasarda mukozal koruyucu olduğu ve gastrik mukozal dokuda hsp70 seviyesinin arttığı önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (10,12,45). Bizim çalışmamızda aspirin tedavisi ile mide hsp70 seviyeleri kontrole göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca gastrik protein karbonilleri, kontrole göre %26,4 yüksek bulunmuştur. Düşük doz aspirin kullanımının sebep olduğu protein oksidasyonu ve oksidatif stres durumunda, gastrik mukozada hsp70 seviyesi artmıştır. Ancak hsp70 seviyesi aspirinle beraber antioksidan alan grupta, aspirin alan gruba göre istatistiki olarak düşüktür (Şekil 15). Bu durum, antioksidan kullanımının gastrik dokuda oksidan stresi azaltmasının bir sonucu olarak görülmektedir.

Mide total tiyol seviyesi açısından, 3 grup karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır. ASA grubunda, kontrol grubuna göre duodenum total tiyol seviyesi yüksek bulunmuştur ancak, istatistiki analiz sonrası anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo XIII, şekil 16).

Aspirin ve diğer NSAI ilaçların yaptığı gastrik ve duodenal hasarın patogenezinde nötrofil infiltrasyonu, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu artışı ve MPO aktivite artışı olduğunu gösteren bir çok çalışma literatürde mevcuttur (21,47,48,49,55,71,73,84,91,93). Bu çalışmalarda aspirinin gastrik ve duodenal mukozal yan etkilerini azaltmak için aspirin veya NSAID tedavisi ile birlikte, vitamin C, vitamin E, melatonin gibi antioksidanlar verilerek lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, lökosit infiltrasyonunu göstergesi olan doku MPO aktivitesine bakılmış ve mide mukozal hasar değerlendirilmiştir (31,33,36,37,45,55,71,91). Bu çalışmalarda aspirin veya NSAID tedavisine antioksidan eklenmesinin, hem gastrik ve duodenal mukozal hasarı hemde oksidan stres parametrelerini azalttığı gösterilmiştir.

Naohito Sugimoto ve arkadaşlarının 28 Sprague-Dawley erkek rat üzerinde yaptığı çalışmada (71), ratlar diyetteki E vitaminini içeriği açısından 4 gruba ayrılmıştır. Gruplar; Vitamin E deficient grup (0,1 mg α - tokoferol/100 gram diyet), vitamin E sufficient grup (2 mg α - tokoferol/100 gram diyet), vitamin E supplement grup (50 mg

α – tokoferol/100 gram diyet), vitamin E supplement grup (100 mg α – tokoferol/100 gram diyet) şeklinde seçilmiş ve bütün gruplar 20 hafta boyunca bu diyetle beslenmiştir. 20. haftanın sonunda bütün ratlara 200 mg/kg intragastrik aspirin verilmiş ve aspirin verilmesinden 3 saat sonra çalışma sonlandırılmıştır. Mide mukozasında biyokimyasal ve patolojik inceleme yapılmıştır. Mide mukozasında aspirin alımı ile lipid peroksidasyonu, MPO aktivitesi artışı saptanmıştır. E vitamini kullanımı ile lipid peroksidasyonu ve MPO aktivitesi düşük bulunmuştur. Antioksidan kullanımı gastrik mukozada koruyucu etki göstermiş, hasarı, inflamasyon mediatörlerinin salınımını azaltmış, böylece dokuya lökosit göçü azaldığından MPO enzim aktivitesi düşük olarak bulunmuştur.

Mehrafarin Fesharaki ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (21), 96 Wistar erkek rat üzerinde yapılmıştır. Her grupta 8 rat olmak üzere, kontrol grubu, ASA grubu (300mg/kg asa), ASA+ vitamin grubu (ASA 300 mg/kg, vitamin E 75 ünite), vitamin grubu (75 ünite vitamin E) olacak şekilde ayrılmış ve ilaç ve vitamin verildikten sonra üçünü, altıncı, dokuzuncu ve onikinci saatlerde her gruptan 6 rat random olarak seçilmiş ve öldürülmüştür. Gastrik mukoza üzerinde, biyokimyasal ve histopatolojik çalışma yapılmıştır. MPO aktivitesi gastrik mukozada üçünü, altıncı, dokuzuncu saatlerde artmış ve onikinci sattu normale dönmüştür. ASA + vitamin grubunda MPO aktivitesi kontrol grubuna yakın bulunmuştur. Vitamin E tek başına alınınca gastrik MPO aktivitesi, kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur ($p<0.01$).

Yoshida Norisoma ve arkadaşlarının Sprague-Dawley erkek rat üzerinde yaptığı yaptığı çalışmada (91), gastrik hasar oluşturmak için 200 mg/ kg ‘dan aspirin verilmiş ve 3 saat sonra çalışma sonlandırılmıştır. Gastrik mukozal MPO aktivitesi, ASA grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca ASA grubunda kanamalı gastrik ülserler gelişmiştir.

Toshikazu Yoshikawa ve arkadaşlarının (93) Sprague-Dawley toplam 42 erkek rat üzerinde yaptığı toplam 6 grup seçilmiştir. Çalışmada NSAID olan indometazin 5 gruba 20 mg/kg dozunda oral olarak verilmiştir. 1 gruba indometazin dozunda %0,5 karboksimetilselülaz solusyonu verildi (sağlıklı kontrol). Ayrıca indometazin verilen gruplardan bir gruba serum fizyolojik subkutan verilmek üzere (hasta kontrol), 4 gruba indometazin verilmesinden 1 saat ve 3 saat sonra sırasıyla süperoksid dismutaz, katalaz, süperoksid dismutaz+katalaz ve DMSO subkutan uygulanmıştır. Ratlar

indometazin verilmesinin 3. ve 6. saatinde sakrifiye edilmiştir. Gastrik mukoza ve serum örnekleri alınmış ve alınan gastrik mukoza örnekleri homojenize edilmiştir. Serumda ve gastrik mukozada α -tokoferol ve lipid peroksidasyonu, gastrik mukozada ise glutatyon, glutatyon peroksidaz aktivitesi, süperoksid dismutaz aktivitesi bakılmıştır. 20 mg/kg dozunda indometazin kullanımı gastrik hemorajik lezyonlar oluşturmuştur. İndometazin kullanımıyla gastrik mukozal lipid peroksidasyonu 3. ve 6. saatlerde önemli ölçüde artmıştır ($p<0,01$). Serum lipid peroksidasyonu indometazin kullanımıyla değişmemiştir. İndometazinle beraber süperoksid dismutaz, süperoksid dismutaz+katalaz ve DMSO verilmesi ülser lezyonunun büyüklüğünü ve mide mukozal lipid peroksidasyonu düzeyini kontrole göre önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir ($p<0,05$, $p<0,05$). Katalazın, indometazinle beraber kullanımı ülser alanı büyüklüğünü azaltmamıştır. Gastrik mukozal glutatyon peroksidaz aktivitesi, indometazin kullanımının 6. saatinde, 3. saatine göre azalmıştır ($p<0,05$). Gastrik mukoza redükte glutatyon düzeyi kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,01$). Enzimatik antioksidan olan süperoksid dismutaz, süperoksid dismutazla beraber katalaz verilmesi ve serbest radikal temizleyici olan DMSO verilmesi, indometazinin yaptığı gastrik hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.

Toshikazu Yoshikawa ve arkadaşlarının (94) Sprague-Dawley erkek ratlarda yaptığı çalışmada, diyetle vitamin eksikliği olan ve diyetle vitamin E yeterli olan ratlarda, iskemi- reperfüzyon hasarına bağlı oluşan gastrik ülserler oluşturulmuş. Diyetle vitamin E eksikliği olan ratlarda gastrik mukozal ülser alanlarının vitamin E yeterli olan gruptan daha büyük olduğu gösterilmiştir. Vitamin E eksikliği olan ratlarda serumda ve gastrik mukozada α -tokoferol düzeyinin düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca gastrik mukozal lipid peroksidasyonu düzeyinin, vitamin E eksikliği olan grupta yüksek olduğu gösterilmiştir. Vitamin E'nin iskemi-reperfüzyon sırasında oluşan serbest oksijen radikallerinin yaptığı gastrik mukozal hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.

Kamsiah Jaarin ve arkadaşlarının Sprague-Dawley erkek ratlarda yaptığı çalışmada (31), toplam 6 grup (her grupta 8 rat olacak şekilde) rat E vitamininin ile çeşitli dozlarıyla zenginleştirilmiş diyetle 4 hafta beslenmiştir. Kontrol grubu rat sadece normal rat diyeti almıştır. Dört haftanın sonunda ratlara 400 mg/kg aspirin verilmiştir. E vitamini ile zenginleştirilmiş diyet alan ratlarda aspirin kullanımına bağlı oluşan gastrik mukozal

ülser indeksi, gastrik asidite, gastrik lipid peroksidasyonu düzeyi kontrole göre azalmış, gastrik mukus miktarı kontrole göre artmıştır ($p<0.05$).

Lastra ve arkadaşlarının Sprague-Dawley erkek ve dişi ratlarda yaptığı çalışmada (36), melatonin kullanımıyla indometazinin yaptığı gastrik mukozal hasarın önlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 6 grup (her grupta 8 rat) oluşturulmuştur. Gruplara kontrol 1, % 5 bikarbonat solusyonu, intragastrik verilmiş, melatonin gruplarına 0,25, 0,5,1 mg/kg melatonin subkutan uygulanmıştır. Kontrol 2 grubuna %10 etanol v/v subkutan verilmiştir. İndometazin grubuna ise 20 mg/kg intragastrik indometazin verilmiştir. Melatonin uygulanan gruba da 20 mg/kg indometazin intragastrik verilmiştir. İndometazin uygulamasından 4 saat sonra ratlar sakrifiye edilmiştir. Gastrik mukozal ülser indeksi indometazin grubunda diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur. Subkutan melatonin uygulamasıyla ülser indeksi azalmıştır. Gastrik mukozal MPO aktivitesi ve lipid peroksidasyonu indometazin grubunda önemli ölçüde artmıştır. Gastrik mukozal MPO aktivitesi ve lipid peroksidasyonu indometazin ile beraberinde subkutan melatonin uygulanan grupta önemli ölçüde azalmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma; uzun dönem düşük doz aspirin kullanımının üst gastrointestinal yan etkilerini araştırmada, ilk deneysel çalışmadır. Uzun süreli düşük doz aspirin kullanımında gastrik mukozada oksidatif stresin artışı, nötrofil aktivasyonu ve MPO enzim aktivitesi artışı ile ilişkilidir. Ayrıca, düşük doz aspirinin yaptığı mukozal hasarın nedeni, gastrik mukozada glutatyon, vitamin C, E gibi önemli antioksidanların azalması olabilir. Vitamin C, vitamin E, glutatyon'un aspirinle kombinasyonu, düşük doz aspirin kullanımında gastrik mukozal hasara karşı koruyucu olabilirler.

6. KAYNAKLAR

1. ACCF/ACG/AHA 2008 Expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use.
2. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. Mimoza Yayınları, Konya.1995; 1-132.
3. Amanvermez R, Tunçel Ö. K, Demir Ş, Kefeli M, Bek Y, Çelik C. Protective effects of cysteine, methionine and vitamin C on the stomach in chronically alcohol treated rats. *J Appl Toxicol* 2008;28: 591-98.
4. Banhegyı G, Braun L. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radical Biology Medicine*. 1997; 23:793-803.
5. Barnett K, Bell CJ, McKnight W, Dicay M, Sharkey KA, Wallace JL. Role of cyclooxygenase-2 in modulating gastric acid secretion in the normal and inflamed rat stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G1292–7.
6. Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, et al. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine* 2006; 13: 584-90.
7. Berlett B.S.,Stadtman E. R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J.Biological Chemistry*. 1997; 272:20313-20316.
8. Bhandari P, Bateman AC, Mehta RL, Patel P. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. *Histopathology* 2005; 46: 280-286
9. Brigelius R, Traber M. Vitamin E: function and metabolism. *FABES J*. 1999; 13: 1145-1155.
10. Bukau B, Horwich A.L. The hsp 70 and hsp 60 chaperone machines. *Cell*. 1998; 92:351-366.
11. Cadenas E, Davies K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stres and aging. *Free Rad. Biology Medicine*. 2000; 29: 222-230.
12. Choi S.R, Lee S.A., Kim Y.J. Role of heat shock proteins in gastric inflammation and ulcer healing. *J.Physiology and Pharmacology*. 2009; 60: 5-17.
13. Cryer B, Bhatt D.L, Lanza F.L, Dong J, Lichtenberger L.M, Marathi U.K. Low-dose aspirin-induced ulceration is attenuated by aspirin-phosphatidylcholine: A

- randomized clinical trial. *Am J Gastroenterol* 2010;.2010.436.
14. Cryer B, Feldman M. Effects of very low dose daily, long-term aspirin therapy on gastric, duodenal, and rectal prostaglandin levels and on mucosal injury in healthy humans. *Gastroenterology* 1999; 117 (1): 17-25.
 15. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*.2004; 35: 83-89
 16. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*.2004; 35: 140-149.
 17. Day B.J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochemical Pharmacology*. 2009 ; 77: 285-296.
 18. Dong M.H. Kaunitz J.D. Gastroduodenal mucosal defence. *Current Opinion in Gastroenterology* . 2006;22:599-606.
 19. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol* 1999; 300: 145-56.
 20. Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18:872-879.
 21. Fesharaki M, Nasimi A, Mokhtari S, Mokhtari R, Moradian R, Amirpoor N. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: Gastroprotection by vitamin E. *Pathophysiology* 2006; 13: 237-43.
 22. Grisham M.B.,Granger D.N. Neutrophil-mediated mucosal injury role of reactive oxygen metabolites. *Digestive Diseases and Sciences* 1988,vol:33, 6S-15S
 23. Gonzalez Correa J.A. Antioxidant and antiplatelet affects of the alpha-tocopherol-aspirin combination in type 1-like diabeticroats. *Life Sciences*, 2006; 79:1405-1412.
 24. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 1994; 344: 721-724.
 25. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991; 91(3C): 14-22.
 26. Halliwell B. Oxygen radicals and human disease. *Ann.Intern Med.*,1987;107:526-45
 27. Halliwell B.and Chirico S. Lipid peroxidation, it's mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin.Nutr*, 1993;57:715-25
 28. Halliwell B.Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research*. 2001; 475:29-35.
 29. Ham M.,Kaunitz J.D. Gastroduodenal mucosal defence. *Current Opinion in*

- Gastroenterology .2008; 24:665-673
30. Hasemi H.N. Kaunitz J.D. Gastroduodenal mucosal defence. *Current Opinion in Gastroenterology* .2009;25:537-543
 31. Jaarin K., Gapor M.T. Effect of various doses of palm vitamin E and tocopherol on aspirin – induced gastric lesions in rats. *Int. J. Exp. Path.* (2002) 83, 295-301
 32. Kayaalp SO. (Editör). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Hacettepe-Tas Kitabevi; 2002: p.1529-45.
 33. Konturek PC, Celinski K, Slomka M . Melatonin and its precursor L-tryptophan prevent acute gastric mucosal damage induced by aspirin in humans. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(Suppl 2):67–75.
 34. Konturek PC, Konturek SJ, Burnat G, Brzozowski T, Brzozowska I, Reiter RJ. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. *J Pineal Res* 2008; 45:180–90.
 35. Laine L. Gastrointestinal bleeding with low-dose aspirin-what is the risk? *Aliment Pharmacol Ther.*2006; 24:897-908.
 36. Lastra A.C., Motivella V. Protective effect of melatonin on indomethacin-induced gastric injury in rats.*J.Pineal Res.*1999; 26:101-107
 37. Lee M, Aldred K, Lee E, Feldman M. Aspirin-induced acute gastric mucosal injury is a neutrophil-dependent process in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992; 263: G920-6.
 38. Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A. G., Ahn B. W., Shaltiel S., Stadtman E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186: 464-78.
 39. Lichtenberger LM. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15:463–72
 40. Lichtenberger LM. Where is the evidence that cyclooxygenase inhibition is the primary cause of NSAID- induced gastrointestinal injury? *Biochemical Pharmacology*, 2001;61:631-637
 41. Lichtenberger LM. NSAID injury to the gastrointestinal tract:evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes.*J.Pharmacy and Pharmacology* 2006; 58:1-8

42. Lu S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspect Med.* 2009; 30:42-59
43. Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
44. Martensson J, Jain A, Meister A. Glutathione is required for intestinal function. *Proc. Biochemistry.* 1990; 87: 1715-1719.
45. Musumba C, Pritchard D.M, Pirmohamed M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30:517-31.
46. Mutoh H, Hiraishi H, Ota S, Yoshida H. Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1990; 98: 1452-9.
47. Nagano Y, Matsui H, Muramatsu M *et al.* Rebamipide significantly inhibits indomethacin-induced mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in gastric epithelial RGM-1 cells. *Dig Dis Sci* 2005; 50: S76–S83.
48. Naito Y, Yoshikawa T. Oxidative stress involvement and gene expression in indomethacin – induced gastropathy. *Redox Report*, vol:11, 2006
49. Naito Y, Yoshikawa T, Kaneko T *et al.* Role of oxygen radicals in indomethacin-induced gastric mucosal microvascular injury in rats. *J Clin Gastroenterol* 1993; 17: S99–S103.
50. Niki E, Noguchi N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc. Chem. Res.* 2004; 37: 45-51.
51. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria mediated cell death. *Drug Metabolism Reviews.* 2007; 39: 443-455.
52. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of American College of Nutrition*, 2003; 22:18-35.
53. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(2):227-50.
54. Paolicchi A, Dominici S. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochemical Pharmacology.* 2002; 64:1027-1035.
55. Pohle T, Brzozowski T, Becker J.C, Van Der Voort I.R, Markmann A, Konturek S.J, et al. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in

- humans: Gastroprotection by vitamin C. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 677-87.
56. Podhaisky HP, Abate A, Polte T, Oberle S, Schroder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress: possible synergism with vitamin E. *FEBS Lett* 1997; 417 (3): 349-51.
 57. Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S. Free radical biology and medicine. *Am. J. Physiol Regul. Integr Comp Physiol.* 2006; 291: 491-511.
 58. Ren B, Huang W. The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2,9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1997; 268: 869-885.
 59. Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2000; 15:D12-D19
 60. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968; 25: 192-205.
 61. Shiotani A, Sakakibara T, Noruma M. Aspirin –induced peptic ulcer and genetic polymorphism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2010;25: S31-S34
 62. Sies, H. Glutathione and its cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27:916-921.
 63. Sies, H. Antioxidant Functions of Vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciencea.* 1992;669: 7-20.
 64. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989;259:315– 24.
 65. Singh U, Deravaj S. Vitamin E, oxidative stress and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.* 2005; 25: 151-74.
 66. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews.* 2000; 32: 307-326.
 67. Sorensen H.T., Mellekjaer L. Risk of upper gastrointestinal bleeding associated with use of low dose aspirin. *The American Journal of Gastroenterology.* 2000; vol 95
 68. Stadtman E. R., Levine R.L. Protein oxidation *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 899:191-208.
 69. Stadtman E. R. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Rad. Biology Medicine.* 2002; 33: 597-604.
 70. Suemasu S, Tanaka K, Namba T. A role for HSP 70 in protecting against

- indomethacin –induced gastric lesions. *J.Biological Chemistry*, 2009;284:29:19705-15.
71. Sugimoto N., Yoshida N. Effect of vitamin E on aspirin-induced gastric mucosal injury in rats. . *Digestive Diseases and Sciences*, 2000; 45:599-605.
72. Tamura I.,Fujita T, Tsumura H. Low dose aspirin-induced gastroduodenal mucosal injury in Japanese patients with arteriosclerotic disease. *Internal Medicine*,2010;49:2537-2545.
73. Tanaka J, Yuda Y. Lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rat. *Biol Pharm Bull* 1996; **19**:716–720.
74. Tanaka A, Araki H, Komoike Y, Hase S,Takeuchi K. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Physiol Paris* 2001; 95: 21–7.
75. Tunaoglu F.S. Aspirin ve çocukluk çağı romatizmal hastalıklarında kullanımı. *Klinik Pediatri*, 2002; 1:26-34.
76. Townsend D. M., Tew K. D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and pharmacotherapy* 2003; 57: 145-155.
77. Törüner M. Aspirin and gastrointestinal toxicity. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*,2007; 2:27-30.
78. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. 2007; *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*. 2007; 39: 44-84.
79. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of aspirin. *Trombosis Research*,110 (2003) ; 255-258.
80. Vane JR. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax* 2000 55:S3-S9.
81. Varshney R., Kale R. K. Effects of calmodulin antagonists on radiation induced lipid peroxidation in microsomes. *Int. J. Rad. Biol.* 1990; 58: 733-743.
82. Wallance J.L.Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy and cytoprotection:Pathogenesis and mechanisms re-examined. *Scand J Gastroenterol* 1992;27;192:3-8.
83. Wallace JL. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15:5 :691–703.
84. Wallace JL, McKnight W, Reuter BK Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage

- in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2 *Gastroenterology* 2000; 119: 706–14.
85. Wallace JL. Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5: 133–7.
86. Wernerman J, Luo JL, Hammarqvist F. Glutathione status in critically-ill patients: possibility of modulation by antioxidants. *Proceedings of the Nutrition Society* 1999; 58: 677-680.
87. Weisman S.M.,Graham D.Y. Evaluation of the benefits and risks of low-dose aspirin in the secondary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events. *Arch Intern Med.*2002,162:2197-2202.
88. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004 Mar;134(3):489-92.
89. Young I. S., Woodside J. V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54: 176-186.
90. Yoshida N, Sugimoto N, Hirayama F *et al.* *Helicobacter pylori* infection potentiates aspirin induced gastric mucosal injury in Mongolian gerbils. *Gut* 2002; **50**: 594–598.
91. Yoshida N., Yoshikawa T. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*,1995,vol 40:2300-2304
92. Yoshikawa T, Naito Y. The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radical Research* 2000; 33 (6): 785-94
93. Yoshikawa T, Naito Y., Kishi A., Role of active oxygen, lipid peroxidation and antioxidants in pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 1993; 34 (6): 732-737.
94. Yoshikawa T, Yasuda M, Ueda S, Naito Y, Tanigawa T, Oyamada H, et al. Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion. *AmJ Clin Nutr* 1991; 53: 210-214.
95. Yoshikawa T, Yoshida N, Miyagawa H. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by burn shock in rats. *J Clin Biochem Nutr* 1987; 2: 163-70.
96. Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y *et al.* Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res*

Commun 1989; 7:285–291.

97. Zhang R, Brennan M.L. Association between Myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*, 2001; 286(17):2154-2156.

