

# İskemili ve İskemisiz Peptik Ülser Modellerinde Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Alfa Mikroemülsiyon Formunun Yara İyileşmesine Etkisi ve Malondialdehit, Glutasyon, Nitrik Oksit Düzeyleri İle İlişkisinin Araştırılması

EFFECT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-ALPHA MICROEMULSION FORM ON WOUND HEALING IN PEPTIC ULCER MODELS WITH AND WITHOUT ISCHEMIA AND RELATIONSHIP BETWEEN TRANSFORMING GROWTH FACTOR-ALPHA AND MALONDIALDEHYDE, GLUTATHIONE AND NITRIC OXIDE LEVELS

Dr.Çiğdem ÖZER,<sup>a</sup> Dr.Kazime Gonca AKBULUT,<sup>a</sup> Dr.Bilge GÖNÜL,<sup>a</sup> Gülay YETKİN,<sup>b</sup> Dr.Nevin ÇELEBİ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Fizyoloji AD, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

<sup>b</sup>Farmasötik Teknoloji AD, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, ANKARA

## Özet

**Amaç:** Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Alfa (TGF- $\alpha$ ) mide pH'sından etkilenir. Bu faktörün ilaç formu ülser iyileşmesine etkinliğini artırabilir. Bu çalışma: 1) TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formunun iskemi ve/veya asetil salisilik asit (aspirin, ASA) ile oluşturulan peptik ülser iyileşme hızına etkisinin saptanması, 2) Ülser, TGF- $\alpha$  ve oksidatif olaylar arasındaki ilişkinin gözlenmesi amacıyla planlandı.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada 85 adet  $200 \pm 25$  gr'lık erkek Wistar türü sıçan kullanıldı. ASA ile oluşturulan + iskemili veya iskemisiz peptik ülser modellerinde TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formunun etkileri kontrolleri ile 10 grup içinde takip edildi. Bunun için hayvanların midelerinde ülser alanı planimetri ile  $\text{mm}^2$  olarak, mide mukus miktarı, malondialdehit ve glutasyon düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle, total nitrik oksit düzeyi VCI<sub>3</sub> + Griess reaktifleri ile ELİSA okuyucuda saptandı. Sonuçlar ANOVA ve Mann Whitney U testleri ile karşılaştırıldı.  $p < 0.05$  önemli kabul edildi.

**Bulgular:** TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formu uygulananlarda tedavisiz gruplara göre ülser alanında küçülme, mukusta artma, malondialdehit de azalma, total nitrik oksit de artma ve glutatyonda normal düzeye dönüş saptandı ( $p < 0.05$ ). İskemili gruplarda, ülser alanı, malondialdehit ve total nitrik oksit düzeyi diğer gruplardan yüksek iken glutasyon düşük bulundu ( $p < 0.05$ ).

**Sonuç:** TGF- $\alpha$  mikroemülsiyon formunun ASA ve ASA + iskemi ile oluşturulan ülser iyileşmesinin hızlanmasında yararlı olduğu ve bu uygulama ile oksidatif olaylar arasında ilişki olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler :** Peptik ülser, iskemi, aspirin, lipid peroksidasyon, dönüştürücü büyüme faktörü-alfa

Turkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:461-468

## Abstract

**Objective:** Transforming Growth Factor-Alpha (TGF- $\alpha$ ) is affected by gastric pH. Drug formulae incorporating this factor may serve to increase its effects on ulcer healing. This study was planned to investigate the effects of microemulsion forms of TGF- $\alpha$  on healing rates of peptic ulcer formed by ischemia and/or aspirin (ASA), as well as to review the relationship between ulcer, TGF- $\alpha$  and oxidative processes.

**Material and Methods:** Eighty-five male Wistar albino rats ( $200 \pm 25$  g) were used in this study. Animals were divided into 10 groups. After ulcer induction by ASA and/or ischemia in the treatment and control groups, ulcer areas were detected by planimetry as  $\text{mm}^2$ . Determinations of gastric mucus amounts, malondialdehyde and glutathione levels were measured by spectrophotometry. Total nitric oxide levels were detected by VCI<sub>3</sub> + Griess reactants and ELISA reader. Results were evaluated with ANOVA and Mann Whitney U Tests, and a criterion significance level of  $p < 0.05$  was used.

**Results:** Our results showed that TGF- $\alpha$  microemulsion treatment decreased ulcer areas and malondialdehyde levels, and increased mucus and total nitric oxide levels compared to non-treatment groups ( $p < 0.05$ ). Glutathione levels were not changed. Ulcer areas, malondialdehyde and total nitric oxide levels in the ischemic groups were higher than the other groups, whereas glutathione levels were not ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The microemulsion form of TGF- $\alpha$  is effective in increasing the healing rate of ulcers formed by ASA and ASA + ischemia. There appears to be a relationship between the TGF- $\alpha$  microemulsion treatment and oxidative processes.

**Key Words:** Peptic ulcer, ischemia, aspirin, lipid peroxidation, transforming growth factor-alpha

Geliş Tarihi/Received: 28.10.2003

Kabul Tarihi/Accepted: 29.04.2004

Bu çalışma, Tübitak SBAG-AYD 342 nolu proje ile kısmen desteklenmiştir.

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 29. Ulusal Fizyoloji Kongresi (1-5 Eylül 2003, GATA-Ankara)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur. Bildiri Özetleri Kitabı, S.42.

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr.Çiğdem ÖZER

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

06500 Beşevler, ANKARA

ozercigdem@yahoo.co.uk

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

Turkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24

**G**astrointestinal sistem (GİS)'in ülser yaralarının oluşumunda stres, indometazin, aspirin gibi nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAID), etanol, HCl, gibi kimyasallarla etkileşim, ayrıca serbest radikaller, safra asitleri, proteazlar gibi iç kaynaklı faktörler rol oynar.<sup>1</sup> Yine mide iskemisi ve/veya iskemi reperfüzyonun

(I/R) ülser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller, özellikle antioksidanlarla dengelenmediği durumlarda organizma için zararlı olabilmektedir. Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri membranlardaki lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu membranlarda yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı oluşur. Malondialdehit (MDA), dien konjugatları gibi ürünlerin ölçümü lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Mide mukozası hasarında lipid peroksidasyonu önemli rol oynar.<sup>2</sup> Serbest radikallerin zarar verici etkilerine karşı hücreler çeşitli antioksidan sistemlere sahiptir. Glutasyon (GSH) bağımlı sistem hücre içindeki hidroperoksitleri indirgeyen temel mekanizmadır. Strese bağlı peptik ülserde stres sonrasında doku GSH düzeyleri genellikle düşük bulunmuştur.<sup>3,4</sup>

Nitrik oksit (NO), mukozal bütünlüğün korunmasında çok yönlü bir rol oynamaktadır. Nitrik oksit sentaz (NOS)'lardan doku koruyucu formunun konstitif NOS (eNOS + nNOS) olduğu, iNOS aktivitesinin ise artmış lökosit-endotel ilişkisi, trombosit göçü ve mukozal mikrosirkülasyonun artmasıyla ilişkili olduğu ifade edilmektedir. NO gastrik mukozanın bütünlüğünün devamında nöropeptit ve prostaglandinler ile ilişkilidir. NO sentezinin tek başına inhibisyonu ülser oluşumuna neden olmamakla birlikte indometazin gibi ajanların ülser yapmayan dozlarının bile NO inhibisyonu ile birlikte kombine edilmesi gastrik hasara neden olabilir. NO serbest radikal süpürücü olarak rol oynar. Ancak yüksek miktarda NO'in vasküler sistemde sitotoksik etki gösterebileceği ve hemorajik olaylara neden olabileceği ifade edilmektedir.<sup>5</sup>

Gastrik ülser iyileşmesinde epitel yapıların yeniden oluşumu, alttaki bağ dokusunun tamiri gerekir. Bu konuda etkili olan çeşitli büyüme faktörleri vardır. Bu faktörlerden Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) epitel yapıların yenilenmesinde etkilidir.<sup>6</sup> TGF- $\alpha$  sitokin yapılı bir protein olup EGF ailesinin bir üyesidir ve EGF reseptörü (EGF-R)'ne bağlanır.<sup>7</sup> TGF- $\alpha$  büyük ölçüde GİS mukoza hücrelerinde eksprese edilir.<sup>6</sup> TGF- $\alpha$ 'nın biyolojik etkinliği

EGF'ye benzer. Kan akımının düzenlenmesinde, yeni damar ve yumuşak doku oluşumunda GİS'in mide asit sekresyonunu inhibe etmede, mukus sekresyonunu arttırarak mide mukoza bütünlüğünü korumada, epitel hücrelerinin çoğalmasını arttırarak hücre üretimini dolayısıyla yara iyileşmesini hızlandırmada önemli rol oynar.<sup>8-10</sup> TGF- $\alpha$  asit/pepsin etkisiyle aktivite kaybına uğradığı için bu çalışmada mikroemülsiyon (ME) formunda kullanılmıştır.

Aspirin kolay temini ve antikoagülan etkisi ile de ileri yaşlarda çok kullanılan bir antienflamatuvar analjeziktir. Ancak ülser nedeni olduğu da bilinmektedir.<sup>11,12</sup> Bu arada GİS'e ait dolaşımın engellenmesi ile ilgili bazı patolojiler midede iskemiye neden olabilir. İki olayın üst üste bindiği durumlarda da büyüme faktörlerinin etkisi öngörülelebileceğinden bu çalışma planlanmıştır.

**Amaç:** Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda;

1. TGF- $\alpha$  ME formunun iskemi ve/veya ASA ile oluşturulan peptik ülser iyileşme hızına etkisinin saptanması
2. Değişik ülser biçimlerinde TGF- $\alpha$  ve oksidan olaylar arasındaki ilişkinin gözlenmesi amaçlandı.

### Gereç ve Yöntemler

Çalışmada 85 adet 200  $\pm$  25 gr'lık erkek Wistar türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık-karanlık periyodunda, normal ısı-nem ortamında tutularak, serbest yem ve su ile beslendiler. Çalışmaya başlamadan 18 saat öncesinden aç bırakılan denekler 10 gruba ayrıldı: **1. grup;** uygulama yapılmayan kontrolleri (KONT). **2. grup** 0,2 N HCl içinde çözünen 150 mg/kg dozda ASA'nın i.g. uygulaması ile ülser yapıp, 90 dk sonra feda edilen, akut ülser. **3. grup** ülser yapıp, 2 gün süreyle tedavi yapılmayan, kronik ülser. **4. grup** ülser yapıldığı gün 1.5 mL/gün boş-ME uygulamasına başlanan (ME). **5. grup** ülser yapıldığı gün 10  $\mu$ g/kg/gün 1.5 mL TGF- $\alpha$  ME uygulamasına başlanan (TGF- $\alpha$  ME).<sup>13</sup> **6. grup** sadece iskemi yapılan (feda edilmeden önce pentotal anestezisi altın-

da midede sol gastrik arter bağlanarak 30 dk'lık lokal mide iskemisi yaratıldı). 7. 8. 9. 10. gruplardaki deneklere ise sırasıyla 2. 3. 4. 5. gruplardaki uygulamalara ilave olarak son 30 dk için lokal mide iskemisi yapıldı. Reperfüzyon yapılmadan denekler feda edildi. Kontrol ve akut gruplar hariç diğer gruplardaki TGF- $\alpha$  ME uygulamaları 2 gün devam ettirildi. TGF- $\alpha$  ME formülasyonu Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD'da hazırlanmıştır. Deneyin bitiminde hayvanlar pentotal anestezisi altında kalplerinden kan alınarak feda edildiler. Total mide hemen çıkarılarak diseksiyon mikroskobu altında akut ülser planimetri ile mm<sup>2</sup> olarak ölçüldü, 5 peteşi 1 mm<sup>2</sup> olarak hesaplandı. Daha sonra mide dokusu tayinler yapıncaya kadar -30°C'lik derin dondurucuda saklandı. Mide dokusunda mukus miktarı, MDA ve redükte GSH düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle çalışıldı.<sup>2,14,15</sup>

NO ürünleri olan nitrit ve nitratın toplamının göstergesi olan NO<sub>x</sub> düzeyi VCl<sub>3</sub> + Griess reaktifleri ile ELİSA okuyucuda saptandı.<sup>16,17</sup> İstatistiksel değerlendirmede SPSS 10.0 programı ile iskemili ve iskemisiz deney grupları içindeki parametrelerin karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapıldı. Karşılaştırmalarda fark çıkanlarda (p< 0.05), farkın hangi ikiliden kaynaklandığını bulmak amacıyla Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann Whitney U testi kullanıldı, p< 0.01 önemli kabul edildi. Veriler Ort  $\pm$  SD olarak ifade edildi.

### ***Dokuda MDA tayin yöntemi***

Dokuda MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) oluşumu yöntemi ile çalışıldı. Mide doku örnekleri tartılarak soğuk trikloroasetik asit (TCA) içinde (1 gr doku + 9 mL %10'luk TCA) buzlu ortamda homojenize edildi. Homojenat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatandan 750  $\mu$ L alınarak üzerine eşit hacimde %67'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ve 10 ml %1'lik butilhidroksitoluen (BHT, %95 alkol içinde) eklendi. Vorteksle karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi. Banyodan çıkartılan ve soğutulan numunelerin optik

dansitesi spektrofotometrede 535 nm'de köre karşı okundu. Doku MDA düzeyleri nmol olarak gr doku başına hesaplandı.

### ***Dokuda GSH tayin yöntemi***

Dokuda GSH tayini için modifiye Elman yöntemi kullanıldı. Mide doku örnekleri tartılarak soğuk TCA içinde (1 gr doku + 9 mL %10'luk TCA) buzlu ortamda homojenize edildi. Homojenat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4°C'de santrifüj edildi. 0.5 mL süpernatant alınarak üstüne 2 mL 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O ve 0.2 mL dithiobisnitrobenzoik asit (DTNB, 0.4 mg/mL %1 sodyum sitrat) ilave edildi. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı okundu. Doku GSH düzeyleri  $\mu$ mol olarak gr doku başına hesaplandı.

### **Bulgular**

Asidifiye ASA ile ülser oluşturulan gruplara ait ülser alanı, mukus düzeyi, MDA, GSH ve NO<sub>x</sub> değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaların anlamlılık dereceleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı gibi ASA'nın i.g. uygulaması akut ülser grubunda büyük ölçüde ülser alanına neden olmuştur. TGF- $\alpha$  ME uygulaması ise ülser alanını akut ülser, kronik ülser, ME gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak küçültmüştür. Mukus düzeyleri TGF- $\alpha$  ME grubunda diğer gruplardan anlamlı olarak yüksektir. TGF- $\alpha$  ME grubunda mide dokusu MDA düzeyleri kontrol, kronik ülser ve ME grubuna göre düşüktür. TGF- $\alpha$  ME grubunda doku GSH düzeylerinin kontrol değerlerine yaklaştığı, akut ülser, kronik ülser ve ME grubuna göre ise daha yüksek olduğu görülmektedir. Yine TGF- $\alpha$  ME uygulaması NO<sub>x</sub> düzeylerini kontrol, kronik ülser ve ME grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır.

Asidifiye ASA + iskemii yapılan gruplara ait sonuçlar ve istatistiksel karşılaştırmaların anlamlılık dereceleri Tablo 2'de gösterilmiştir. TGF- $\alpha$  ME uygulaması akut ülser, kronik ülser ve ME grubuna göre ülser alanını küçültmüştür. TGF- $\alpha$  ME bu gruplarda da mukus düzeyini diğer grup-

**Tablo 1.** ASA ile oluşturulan mide ülseri iyileşmesinde TGF- $\alpha$  ME formunun etkileri ve MDA, GSH, NO ile ilişkisi (ortalama  $\pm$  SD).

Gruplar	Ülser alanı (mm <sup>2</sup> )	Mukus düzeyi ( $\mu$ g/g)	MDA (nmol/g)	GSH ( $\mu$ mol/g)	NO <sub>x</sub> (nmol/g)	
Kontrol (1)	0.00	24.8 $\pm$ 10.9	13.3 $\pm$ 2.	7.2 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 2.5	
Akut ülser (2)	40.3 $\pm$ 25.2	24.1 $\pm$ 7.7	12.4 $\pm$ 3.3	4.9 $\pm$ 1.4	15.4 $\pm$ 7.8	
Kronik ülser (3)	25.5 $\pm$ 5.6	36.7 $\pm$ 6.9	15.8 $\pm$ 4.5	5.4 $\pm$ 1.1	11.2 $\pm$ 6.9	
ME (4)	17.8 $\pm$ 2.2	34.9 $\pm$ 8.2	17.3 $\pm$ 1.6	5.8 $\pm$ 0.7	9.3 $\pm$ 5.5	
TGF-ME (5)	6.2 $\pm$ 3.1	71.3 $\pm$ 16.7	10.2 $\pm$ 1.9	7.0 $\pm$ 0.5	20 $\pm$ 7	
Kruskal-Wallis X2 değerleri	30.514	26.215	23.284	23.591	16.530	
Mann-Whitney U test						
Ülser alanı	1-2, (p= 0.0001),	1-3, (p= 0.0001),	1-4, (p= 0.0001),	1-5, (p= 0.0004),	2-5, (p= 0.0001),	3-5, (p= 0.0008),
Mukus düzeyi	1-5, (p= 0.001),	2-3, (p= 0.004),	2-5, (p= 0.0003),	3-5, (p= 0.0008),	4-5 (p= 0.002)	4-5 (p= 0.002)
MDA	1-4, (p= 0.009),	1-5, (p= 0.009),	2-4, (p= 0.009),	3-5, (p= 0.001),	4-5 (p= 0.0003)	
GSH	1-2, (p= 0.002),	1-3, (p= 0.007),	1-4, (p= 0.006),	2-5, (p= 0.0004),	3-5, (p= 0.003),	4-5 (p= 0.001)
NO <sub>x</sub>	1-2, (p= 0.009),	1-5, (p= 0.0006),	4-5 (p= 0.005)			

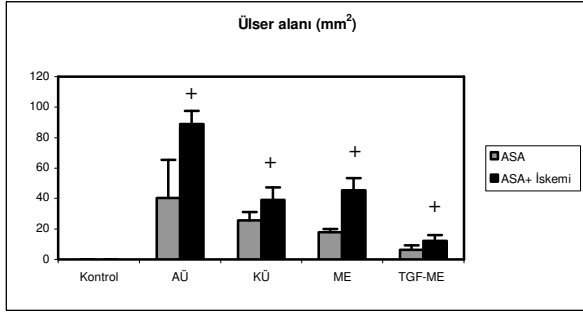
**Tablo 2.** ASA+ iskemisi ile oluşturulan mide ülseri iyileşmesinde TGF- $\alpha$  ME formunun etkileri ve MDA, GSH, NO ile ilişkisi (ortalama  $\pm$  SD).

Gruplar (İskemi)	Ülser alanı (mm <sup>2</sup> )	Mukus düzeyi ( $\mu$ g/g)	MDA (nmol/g)	GSH ( $\mu$ mol/g)	NO <sub>x</sub> (nmol/g)	
Kontrol (6)	0.00	24.8 $\pm$ 4.1	19.7 $\pm$ 1.2	5.2 $\pm$ 0.6	11.2 $\pm$ 1.8	
Akut ülser (7)	89.0 $\pm$ 8.5	15.0 $\pm$ 2.7	30.8 $\pm$ 4.4	2.1 $\pm$ 0.5	22.6 $\pm$ 7.2	
Kronik ülser (8)	39.0 $\pm$ 8.3	32.5 $\pm$ 4.5	37.2 $\pm$ 6.0	3.2 $\pm$ 0.3	22.2 $\pm$ 5.4	
ME (9)	45.3 $\pm$ 8.0	23.6 $\pm$ 9.4	25.4 $\pm$ 1.7	3.3 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 3.1	
TGF-ME (10)	12.2 $\pm$ 3.8	63.4 $\pm$ 18.4	20.1 $\pm$ 2.4	5.0 $\pm$ 0.5	21.1 $\pm$ 7.4	
Kruskal-Wallis X2 değerleri	32.255	23.716	33.892	31.200	21.845	
Mann-Whitney U test						
Ülser alanı	6-7, (p= 0.001),	6-8, (p= 0.001),	6-9, (p= 0.001),	6-10, (p= 0.0004),	7-8, (p= 0.009),	7-9, (p= 0.003),
Mukus düzeyi	6-10, (p= 0.002),	7-8, (p= 0.009),	7-10, (p= 0.003),	8-10 (p= 0.003)	7-10, (p= 0.002),	8-10, (p= 0.002),
MDA	6-9, (p= 0.001),	7-10, (p= 0.001),	7-9, (p= 0.001),	8-10, (p= 0.001),	9-10 (p= 0.0002)	

lara göre anlamlı olarak yükseltmiştir. TGF- $\alpha$  ME uygulamasının iskemili gruplarda doku MDA düzeylerini akut ülser, kronik ülser ve ME grubuna göre azalttığı, GSH düzeylerini ise artırarak kontrol değerlerine yaklaştırdığı görülmektedir.

ASA + iskemisi yapılan gruplarda, iskemisiz gruplarla karşılaştırıldığında iskemisi uygulamasının bütün grupların ülser alanları, MDA ve NO<sub>x</sub>

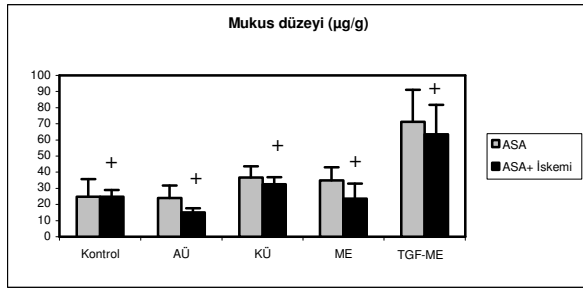
düzeylerinde genel olarak artışa, GSH ve mukus düzeylerinde ise azalmaya neden olduğu görülmektedir (Şekil 1,2,3,4,5). TGF- $\alpha$  ME uygulanan ASA + iskemili gruplarda ASA grubuna göre ülser alanı daha büyük (p= 0.002, Şekil 1), MDA daha yüksek (p= 0.0001, Şekil 3), GSH düzeyinin ise daha düşük (p= 0.0001, Şekil 4), olduğu görülmektedir.



**Şekil 1.** ASA, ASA + iskemi ile oluşturulan mide ülseri iyileşmesinde TGF- $\alpha$  ME formunun ülser alanı üzerine etkileri (Ortalama  $\pm$  SD).

ASA grubu ile karşılaştırıldığında;

AÜ: p= 0.002, KÜ: p= 0.01, ME: p= 0.001, TGF-ME: p= 0.002  
Kontrol: Ülser yapılmayan gruplar, AÜ: Akut ülser, KÜ: Kronik ülser,  
ME: Mikroemülsiyon, TGF-ME: TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formu.



**Şekil 2.** ASA, ASA + iskemi ile oluşturulan mide ülseri iyileşmesinde TGF- $\alpha$  ME formunun mide mukus düzeyi üzerine etkileri (Ortalama  $\pm$  SD).

ASA grubu ile karşılaştırıldığında;

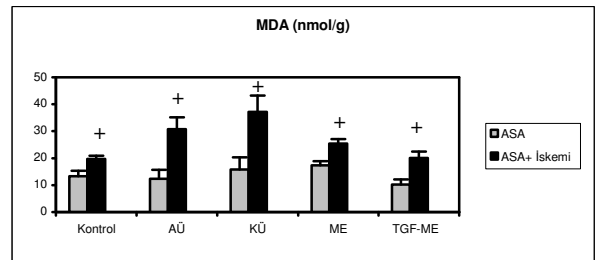
AÜ: p= 0.02, ME : p= 0.02  
Kontrol: Ülser yapılmayan gruplar, AÜ: Akut ülser, KÜ: Kronik ülser,  
ME: Mikroemülsiyon, TGF-ME: TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formu.

## Tartışma

ASA uygulaması ile mide mukoza lezyonları oluşturulması sıkça başvurulan deneysel modellerden biridir. NSAID'lar prostaglandin sentezini bozarak, mide motilitesini ve nötrofil aktivasyonunu artırarak, lokal iritan etki göstererek ülser oluşumuna neden olurlar. Ülser oluşumunun başlıca nedeni mukus tabakasının koruyucu özelliğinin ortadan kalkması ve yüzey epitel bütünlüğünün bozulması sonucunda mukozanın bariyer özelliğinin kaybolmasıdır.<sup>18</sup> Prostaglandinler mukus hü-

relerinden müsin salınımını düzenlerler. Dolayısıyla siklooksijenaz enziminin inhibisyonu mukusun bariyer işlevini azaltır. NSAID'lar mide ve duodenal mukozasından HCO<sub>3</sub> salınımını da engellerler.<sup>19</sup>

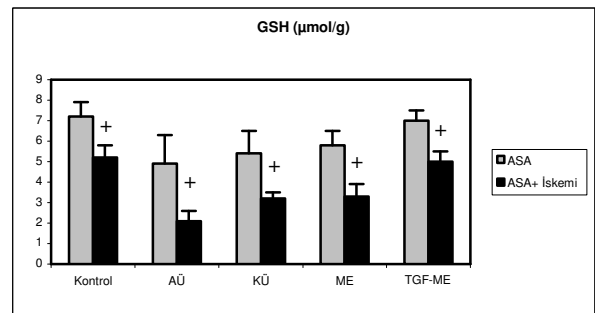
Literatürde çöliak arter veya sol gastrik arterin bağlanmasıyla oluşturulan ülser modelleri bulunmaktadır. Mide iskemisi ve I/R'nun lokal kan akımını azaltarak mukoza hasarına neden olduğu bildirilmiştir.<sup>20</sup> Çalışmamızda literatürle uyumlu ola-



**Şekil 3.** ASA, ASA + iskemi ile oluşturulan mide ülseri iyileşmesinde TGF- $\alpha$  ME formunun MDA düzeyi üzerine etkileri (Ortalama  $\pm$  SD).

ASA grubu ile karşılaştırıldığında ;

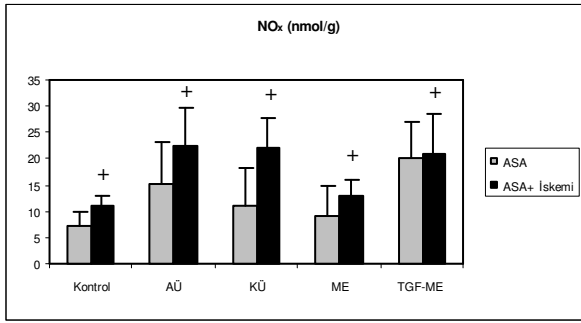
Kontrol: p= 0.0012, AÜ: p= 0.0001, KÜ: p= 0.0002, ME: p= 0.0001, TGF-ME: p= 0.0001  
Kontrol: Ülser yapılmayan gruplar, AÜ: Akut ülser, KÜ: Kronik ülser,  
ME: Mikroemülsiyon, TGF-ME: TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formu.



**Şekil 4.** ASA, ASA + iskemi ile oluşturulan mide ülseri iyileşmesinde TGF- $\alpha$  ME formunun GSH düzeyi üzerine etkileri (Ortalama  $\pm$  SD).

ASA grubu ile karşılaştırıldığında ;

Kontrol: p= 0.002, AÜ: p= 0.0003, KÜ: p= 0.0002, ME: p= 0.0001, TGF-ME: p= 0.0001  
Kontrol: Ülser yapılmayan gruplar, AÜ: Akut ülser, KÜ: Kronik ülser,  
ME: Mikroemülsiyon, TGF-ME: TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formu.



**Şekil 5.** ASA, ASA + iskemi ile oluşturulan mide ülseri iyileşmesinde TGF- $\alpha$  ME formunun NO<sub>x</sub> düzeyi üzerine etkileri (Ortalama  $\pm$  SD).

ASA grubu ile karşılaştırıldığında ;

Kontrol: p= 0.02, KÜ: p= 0.04

Kontrol: Ülser yapılmayan gruplar, AÜ: Akut ülser, KÜ: Kronik ülser, ME: Mikroemülsiyon, TGF-ME: TGF- $\alpha$ 'nın mikroemülsiyon formu.

rak iskemili gruplarda daha büyük değerlerde olmak üzere her iki uygulamada da peptik ülser alanlarının diğer gruplardan yüksek olduğunu gördük.

Son yıllarda büyüme faktörlerinin ülser yaralarının iyileşmesinde etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır.<sup>3,4,18</sup> Bu çalışmalarda çoğunlukla büyüme faktörleri parenteral veya oral yoldan uygulanmıştır. Ancak GİS'in enzimatik aktivitesi protein/peptit yapılı faktörlerin oral yoldan kullanımını sınırlayan en önemli etkidir. Bu nedenle bu tip yapıların oral yoldan uygulanması, enzimatik aktiviteye karşı koruyucu etki gösterebilecek uygun bir formülasyon içinde verilmesiyle mümkün olabilir. ME, iç fazına ilave edilen protein/peptit yapılı etkin maddeyi kimus içeriği, safra salgısı ve pH gibi fizyolojik koşullarda koruyabilmelerinden dolayı en çok kullanılan ideal taşıyıcı sistemlerden biridir.<sup>21</sup> Dolayısıyla protein yapılı bir faktör olan TGF- $\alpha$ 'da asit pepsin etkisiyle aktivite kaybına uğradığı için çalışmada ME formunda kullanılmıştır.

Çalışmamızda gerek iskemili, gerekse iskemisiz grupların her ikisinde de ülser alanı TGF- $\alpha$  ME grubunda diğer gruplardan anlamlı olarak düşüktür. İki günlük TGF- $\alpha$  ME uygulaması ile görülen iyileşme mide mukoza hücre kültüründe TGF- $\alpha$ 'nın 36 saat içinde yara iyileşmesini sağladığı yolundaki bulgular ile uyumludur.<sup>22</sup> Mukus

düzeyi ise diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar TGF- $\alpha$ 'nın mukus üretimini uyarıcı etkisi ve mukus tabakasının endojen ve eksojen faktörlere karşı mide epitelini koruyucu fonksiyonu ile uyumludur.<sup>10</sup>

Kimyasalların neden olduğu akut gastrik mukozal hasarın patogenezinde serbest radikallerin rol oynayabileceği ifade edilmektedir.<sup>23</sup> Her iki ülser modelinde TGF- $\alpha$  ME uygulamasının doku MDA düzeyini azaltarak, GSH düzeyini yükseltip kontrol değerlerine yaklaştırdığı görülmektedir. İskemisiz ülser modelindeki kronik ülser ve ME gruplarındaki MDA düzeyleri kontrol grubundan yüksektir. Ancak akut ülser grubundaki MDA düzeyinin kontrolden farklı olmaması gastrik mukozada ASA ile oluşan lipid peroksidasyon reaksiyonlarının i.g. uygulama ile hayvanların feda edilmesi arasında geçen 90 dk'lık süre içinde oluşmadığını düşündürmektedir. ASA + iskemi modelinde ise değerlerin yüksek ve kontrolden farklı olması yapılan iskeminin sonucu olarak düşünülmektedir. Nitekim Wada ve arkadaşları mide iskemisi ve İ/R'un lokal kan akımını azaltarak mukoza hasarına neden olduğu, NO düzeyinin ise kan akımındaki değişiklikler ile uyumlu olduğunu ifade etmektedirler.<sup>20</sup>

Son çalışmalardan sülfidril bileşiklerinin mide mukozal bütünlüğünün sürdürülmesinde önemli rol oynadıkları görülmektedir. GSH mide bez hücrelerinde GİS'in diğer bölgelerine ya da diğer organlarına nazaran daha yüksek oranda bulunur. Yüksek konsantrasyondaki GSH'un mukoza direncinin sürdürülmesine yardım ettiği düşünülmektedir.<sup>24</sup> Çalışmamızda her iki ülser modelinde doku GSH düzeyinin akut ülser, kronik ülser ve ME gruplarında kontrollerine göre anlamlı olarak düşük olması, TGF- $\alpha$  ME grubunda ise değerlerin kontrole yaklaşması TGF- $\alpha$ 'nın antioksidanları koruyucu etkisini göstermektedir.

Dokunun akut olaya adaptasyonu koruyucu prostaglandinlerin biyosentezi, NO salınımı, EGF, TGF ve trefoil peptitler gibi büyüme faktörlerinin aracılığı ile mukozal hücre göçü ve çoğalması ile sağlanır.<sup>25</sup> NOS'un 3 izoformu da (eNOS, iNOS, nNOS) GİS'de tanımlanmaktadır.<sup>5</sup> İndüklenebilen tipi (iNOS) iyileşmenin erken fazında inflamatuvar

hücrelerden sentezlenir. iNOS aracılı NO salınımı kollajen formasyonu ve hücre çoğalmasını düzenler.<sup>26</sup>

Çalışmamızda ASA ile oluşturulan peptik ülserde TGF- $\alpha$  ME uygulaması NO<sub>x</sub> düzeyini yükseltmiştir. Bastaki ve arkadaşları çalışmalarında TGF- $\alpha$  ve EGF'nin asidifiye etanol uygulamasından 30 dk önce verilmesinin gastrik mukozada koruyucu etki yaptığı, ancak bu faktörlerden 15 dk önce L-NAME verilmesinin koruyucu etkiyi azalttığını göstermişlerdir. Bu durum EGR ve TGF- $\alpha$ 'nın NO aracılı etki yapabileceği şeklinde yorumlanmaktadır.<sup>13</sup> ASA ile ülser oluşturulan gruplardaki ülser alanındaki azalmaya paralel olarak NO<sub>x</sub> düzeyinin yükselmesi Bastaki ve arkadaşlarının bulgularını destekler nitelikte olup, Konturek ve arkadaşlarının göstermiş olduğu TGF- $\alpha$  ve NO<sub>x</sub> arasındaki ilişki ile uyumludur.<sup>25</sup> NO gastrik bariyerin korunmasında, mukozal bütünlüğün sürdürülmesinde önemli rol oynar. NO donörlerinin ülser öncesi verilmesi ile gastrik lezyon sayısında azalma, kan akımında artma, MDA düzeyinde azalma ve Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde artma olduğu gösterilmiştir.<sup>27</sup> Wada ve arkadaşları ise iskemi esnasında arterlerde kan akımının azaldığı ve NO düzeyinin arttığı, reperfüzyon esnasında ise NO düzeyinin azaldığını göstermişlerdir.<sup>21</sup> Çalışmamızdaki iskemili gruplardaki NO<sub>x</sub> düzeyinin iskemisiz gruplara göre yüksek bulunması iskeminin NO düzeyinin arttırıcı yöndeki etkisi ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, iskemili gruplarda daha ciddi boyutlarda ülser olduğu tüm kriterlerle izlenmektedir. Buna karşılık TGF- $\alpha$ 'nın iyileşme hızını arttırdığı, lipid peroksidasyonu düşürdüğü ve NO aracılı etki yaptığı gözlenmiştir. Sonuçlar formülasyonun ülser tedavisinde başarılı olabileceğini göstermektedir.

#### KAYNAKLAR

- Szabo S. Gastroduodenal mucosal injury-acute and chronic: Pathways, mediators, and mechanism. *J Clin Gastroenterol* 1991;13:1-8.
- Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H. The effects of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985;36:71-6.
- Konturek P, Brzozowski T, Konturek SJ, Dembinski A. Role of epidermal growth factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterology* 1990;99:1607-15.
- Akbulut KG, Gönül B, Türkyılmaz A, Çelebi N. The role of epidermal growth factor formulation on stress ulcer healing of the gastric mucosa. *Surg Today* 2002;32:880-3.
- Calatayud S, Barrachina D, Esplugues J. Nitric oxide: Relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Mic Res Technique* 2001;53:325-35.
- Milani S, Calabro A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc Res Tech* 2001;53:360-71.
- Murphy MS. Growth factors and gastrointestinal tract. *Nutrition* 1998;14(10):771-4.
- Gan BS, Hollenberg MD, Maccannell KL, Lederis K, Winkler ME, Derynck R. Distinct vascular actions of epidermal growth factor-urogastrone and transforming growth factor- $\alpha$ . *J Pharmacol Exp Ther* 1987;242:331-7.
- Schultz GS, White M, Mitchell R, et al. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor- $\alpha$  and vaccinia growth factor. *Science* 1987;235:350-2.
- Abe S, Sasano H, Katoh K, et al. Immunohistochemical studies on EGF family growth factors in normal and ulcerated human gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 1997;42:1199-209.
- Gürbüz E, Gürbüz P. Nonsteroid antienflamatuvar kullanan iki olguda ülser perforasyonu. *Gastroenteroloji* 1996;7(1):45.
- Çetinkaya H, Soykan İ, Beyler ve ark. Üst gastrointestinal kanamada rol oynayan faktörler. *Gastroenteroloji* 1995;6(2):251-2.
- Bastaki SMA, Chandranath SI, Singh J. Comparison of the antisecretory and antiulcer activity of epidermal growth factor, urogastrone and transforming growth factor alpha and its derivative in rodents in vivo. *Mol Cell Bioc* 2002;236(1-2):83-94.
- Blandizzi C, Gherardi G, Marveggio C, et al. Suramin Enhances ethanol-induced injury to gastric mucosa in rats. *Dig Dis Sci* 1997;42:1233-41.
- Casini A, Ferrali M, Pompelam A, Maellaro A, Comborti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol* 1986;123:520-31.
- Taşkıran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pogun S. Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defense in rat brain. *Neuro Report* 1997;8:881-4.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5(1):62-71.
- Konturek SJ. Role of epidermal growth factor in gastroprotection and ulcer healing. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:129-33.
- Dubois RN, Eberhart CE, Williams CS. Introduction to eicosanoids and the gastroenteric tract. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:267-77.
- Wada K, Kamisaki Y, Ohkura T, et al. Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia-reperfusion in rats. *APJ-Gastrointestinal and Liver Physiol* 1998;274(3):465-71.

21. Bagwe RP, Konicky JR, Palla BJ, Patanjali PK, Shah DO. Improved drug delivery using microemulsions; rationale, recent progress and new horizons. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001;18:77-140.
22. Kobayashi O, Watanabe S, Hirose M, Sato N. Effects of transforming growth factors on the wound repair of cultured rabbit gastric mucosal cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11(2):129-36.
23. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987;32(12):1395-401.
24. Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 1981;214:200-2.
25. Konturek PC. Physiological, immunohistochemical and molecular aspects gastric adaptation to stress, aspirin and to *H. pylori*-derived gastrot toxins. *J Physiol Pharmacol* 1997;48(1):3-42.
26. Witte MD, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surgery* 2002;183(4):406-12.
27. Kwincien S, Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 2002;53(4):761-73.