

Deneysel Akut Pankreatitte Hidrojen Peroksitin Tripsinojen Aktivasyonu ve Apoptozis Üzerindeki Etkisi

THE EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON
TRYPSINOGEN ACTIVATION AND APOPTOSIS IN
EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS

Dr. Fikret BAŞTIMAR*, Dr. Yavuz KAYA*, Dr. Teoman COŞKUN*
Dr. Seda VATANSEVER**, Dr. Sevinç İNAN**, Dr. Zeki ARI***, Dr. Turan GÜNDÜZ****

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi (*)Genel Cerrahi Anabilim Dalı, (**)Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, (***)Biyokimya Anabilim Dalı, (****)Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MANİSA

ÖZET

Amaç: İntraduktal hidrojen peroksit perfüzyonu ile oluşturulan akut pankreatit modelinde, hidrojen peroksitin tripsinojen aktivasyonu üzerindeki etkisini ve pankreasta oluşan hücre hasarının apoptozis ile ilişkisini araştırmak.

Durum Değerlendirmesi: Serbest oksijen radikallerinin akut pankreatit patogenezindeki rolü tam olarak açıklanamamıştır. Pankreastaki bütün hasarın, sadece oksijen radikallerinin hücre duvarı üzerine olan direkt toksik etkilerinden kaynaklanabileceği şüphelidir. İnaktif proteolitik enzimlerin serbest oksijen radikalleri tarafından aktivasyonu pankreastaki gerçek hasardan sorumlu olabilir.

Yöntem: Çalışmada 20 rat randomize olarak 2 gruba ayrıldı. Tüm ratlarda ana safra-pankreas kanalı karaciğer hilusu düzeyinde kateterize edildi. Pankreas kanalı karaciğer hilusundan duodenuma doğru, grup 1'de serum fizyolojik (%0.09 NaCl), grup 2'de 250 µM konsantrasyonda hidrojen peroksit ile 0.5 ml/saat hızında üç saat perfüze edildi. Deney sonunda tüm ratlarda pankreatit tanısı için serum amilaz ve lipaz ölçümleri, tripsinojenin tripsine dönüşümünü göstermek amacıyla serum ve idrar tripsinojen aktive edici peptid ölçümleri yapıldı. Histopatolojik inceleme ve immünohistokimyasal olarak apoptozisin değerlendirilmesi için pankreastan doku örneği alındı. Gruplar arası farklar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Çıkarımlar: Serum fizyolojik ile perfüze edilen ratlarda akut pankreatit bulguları saptanmadı. Hidrojen peroksit grubunda yüksek serum amilaz ve lipaz seviyeleri ve morfolojik bulgular ile belirlenen akut ödematöz pankreatit gelişti. Serum ve idrar tripsinojen aktive edici peptid konsantrasyonlarında istatistiksel bir artış saptanmadı. Serum fizyolojik ve hidrojen peroksit grubunda apoptozis görülmedi.

Sonuçlar: Çalışmamızda hidrojen peroksitin intraduktal perfüzyonu ratlarda akut pankreatit oluşturdu. Bu akut pankreatit modelinde 3. saatte serum ve idrarda tripsinojen aktivasyonu saptanmadı. Çalışmada kullanılan hidrojen peroksit konsantrasyonu ile pankreas dokusunda apoptozis gözlenmedi.

Anahtar kelimeler: Akut pankreatit, Serbest oksijen radikalleri, Hidrojen peroksit, Tripsinojen aktive edici peptid, Apoptozis

SUMMARY

Role of free oxygen radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis has not been studied thoroughly in the literature. In addition to the direct toxic effect of free oxygen radicals on acinar cells, these agents may activate pancreatic enzymes and, in turn, add to the parenchymal injury. In this study we aimed

to study the effect of intraductal perfusion of hydrogen peroxide, a member of free oxygen radical family, on the activation of trypsinogen and induction of apoptosis in pancreatic parenchyma. Twenty Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups. Bile-pancreatic duct was cannulated close to the liver in all animals and perfused through the duodenum with %0.9 NaCl solution in group 1 and 250 µM hydrogen peroxide in group 2 at 0.5 ml/h for 3 hours. Serum amylase and lipase levels were measured for the diagnosis of acute pancreatitis; serum and urine trypsinogen activation peptide levels measured for the determination of trypsinogen activation. Tissue samples were obtained for the evaluation of apoptosis. Mann Whitney U test was used for statistical analysis. Hydrogen peroxide perfusion induced acute pancreatitis with high serum amylase and lipase levels. There were no statistical differences in serum and urine trypsinogen activation peptide levels between the two groups. Apoptosis has not been detected in both groups. We concluded that hydrogen peroxide induced acute pancreatitis in our study. In this model, trypsinogen activation has not been detected in serum and urine after 3 hours of hydrogen peroxide perfusion. No increase in apoptosis has been found in hydrogen peroxide group when compared with control group.

Keywords: Acute pancreatitis, Free oxygen radicals, hydrogen peroxide, Trypsinogen activation peptide, Apoptosis

Akut pankreatitin erken döneminde henüz histopatolojik değişiklikler ortaya çıkmadan önce, serbest oksijen radikallerinin (SOR) ortaya çıkması (1,2,3,4), akut pankreatitte görülen parenkim hasarından SOR'nin sorumlu olabileceği hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur. Deneysel olarak, SOR ailesinin bir üyesi hidrojen peroksit (H_2O_2) ile in vivo koşullarda akut pankreatit oluşturulması bu hipotezi kuvvetle desteklemektedir (5,6,7). Ancak, SOR'nin pankreatitte hangi mekanizmalar ile parenkim hasarı oluşturduğu henüz net olarak açıklanamamıştır. Serbest oksijen radikalleri parenkim hasarını direkt toksik etkileri ya da harekete geçirdikleri bir başka mekanizma ile yapıyor olabilirler. Hidrojen peroksit ile oluşturulan deneysel akut pankreatitteki parenkim hasarının, bir H_2O_2 temizleyicisi olan katalaz ile tam olarak önlenememesi, SOR'nin direkt toksik etkileri yanında başka bir mekanizmayı da harekete geçirebileceğini düşündürmektedir (6). Bu mekanizma, SOR'nin pankreas hücresindeki tripsinojeni aktif tripsin haline dönüştürmesi olabilir.

Apoptozis genetik olarak programlanmış hücre ölümüdür. Hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda görülebilmektedir. Akut pankreatitte apoptozisin indüksiyonunun pankreatit şiddetini azaltıcı bir rolü olduğu gösterilmiştir (8,9). İn vitro çalışmalara göre, SOR apoptozis için bir mediatör görevi görmektedir (10). Ancak, akut pankreatitte SOR'nin in vivo koşullarda apoptozis üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı; intraduktal H_2O_2 perfüzyonu ile oluşturulan deneysel akut

pankreatitte (a) H_2O_2 'in tripsinojen aktivasyonu üzerindeki etkisini, (b) SOR'nin pankreasta oluşan hücre hasarı ve fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile ilişkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, ağırlıkları 230-330 gram arasında değişen erkek cinsi 20 adet Sprague-Dawley tipi rat kullanıldı. Anestezi 60 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorürün (Rhompun %2, Bayer-Almanya) intramusküler enjeksiyonu ile sağlandı. Bölge temizliğinden sonra orta hat insizyonu ile laparotomi yapıldı. Mesane boşaltıldı. Ortak safra-pankreas kanalı bulundu. Kanal, sağ ve sol ana hepatik kanalların birleşim yerinden bağlandı ve bağlamanın hemen distalinden kateterize edildi (Introcan-WW 22G, Braun-Almanya). Kateterin dışardaki ucu bir infüzyon pompasına bağlandı (Perfusor, Compact OPS, Braun-Almanya). Böylece, safra-pankreas kanalının karaciğer hilusundan duodenuma doğru serbest perfüzyon imkanı sağlandı. Sonra ratlar randomize olarak iki gruba ayrıldı.

Grup 1. Kontrol grubu (n = 10): Safra-pankreas kanalı serum fizyolojik (%0.9 NaCl, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 0.5 ml/saat hızında, üç saat süre ile perfüze edildi.

Grup 2. Hidrojen peroksit grubu (n = 10): Safra-pankreas kanalı 250 µM H_2O_2 (H_2O_2 , %3 w/w, KİM-YA Tic. Lit. Şti, Türkiye) ile 0.5 ml/saat hızında, üç saat süre ile perfüze edildi.

Perfüzyonun sonunda tüm hayvanlardan se-

TABLO 1: SERUM FİZYOLOJİK VE HİDROJEN PEROKSİT GRUPLARINDA MORFOLOJİK SKOR, AMİLAZ, LİPAZ, PLAZMA TAP VE İDRAR TAP DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI

	Gruplar		p*
	Serum Fizyolojik	Hidrojen Peroksit	
Morfolojik Skor	0.9 ± 0.23	5.9 ± 0.23	< 0.01
Amilaz (U/L)	871 ± 67	1849 ± 188	< 0.01
Lipaz (U/L)	71 ± 7	305 ± 38	< 0.001
Plazma TAP (nM)	1.04 ± 0.85	1.90 ± 0.77	> 0.05
İdrar TAP (nM)	1.78 ± 0.59	2.11 ± 0.71	> 0.05

rum amilaz, lipaz ve tripsinojen aktive edici peptid (TAP) ölçümleri için vena kava inferiordan kan örneği ve idrarda TAP ölçümü için idrar örneği alındı. Histopatolojik inceleme için pankreastan doku örneği alındı. Pankreas doku örneği %10 formalin solüsyonu içinde tespit edildikten sonra parafin bloklar içine gömüldü. Bloklardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitlerin bir örneği hematoksilen-eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Kalan kesitlerde indirekt immünohistokimyasal yöntemle apopitozisin varlığı araştırıldı. Her iki grupta aşağıdaki parametreler çalışıldı:

1. Serum amilaz ve lipaz aktivitesi otoanalizör ile standart klinik bir metodla ölçüldü. 2. Serum ve idrar TAP düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü (TAP EIA, Biotrin International Co. Dublin, İrlanda). 3. Pankreas dokusunda morfolojik skorlama yapıldı. Bu skorlamada; 1. makroskopik olarak ödem (0 = yok, 1 = minimal-orta, 2 = şiddetli), 2. mikroskopik olarak duktal epitel hasarı, (0 = yok, 1 = epitel ayrılması, 2 = epitelin dökülmesi), 3. polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu (0 = yok, 1 = periduktal, 2 = parenkimal), 4. intraparenkimal kanama (0 = yok, 1 = fokal, 2 = diffüz), 5. parenkimal nekroz (0 = yok, 1 = fokal, 2 = diffüz) kriterleri 0-2 arasında puanlandı. 4. Apopitozis varlığı, p53 ve bcl-2 (apopitozis inhibitörü, Oncogene Research Products, ASK06, Boston) immün boyamaları yapılarak indirekt immünohistokimyasal yöntem ile araştırıldı. Bunun için, dokular 24 saat süre ile %4 paraformaldehid solüsyonu içinde fikse edildikten sonra parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan beş mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler depara-

finizasyondan sonra 18 saat süre ile rabbit-anti-bcl-2 (1/100 dilüsyon) ve rabbit-anti-p53 (1/100 dilüsyon) primer antikoları ile inkübe edildi. Fosfatlı tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra anti-rabbit horse hidrojen peroksidaz sekonder antikoru (Zymed Histostain kit) ile boyandı. İmmünohistokimyasal reaksiyonun görülebilmesi için aminoetilkarbazol ve hematoksilen-eozin boyamaları yapıldıktan sonra, kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama ve ortalamanın standart hatası şeklinde verildi.

BULGULAR

Makroskopik-mikroskopik inceleme ve morfolojik skorlama: Safra-pankreas kanalının serum fizyolojik ile perfüze edildiği grupta, pankreasta makroskopik ve mikroskopik değişiklik saptanmadı. Hidrojen peroksit grubunda, makroskopik olarak pankreasta belirgin ödem ve özellikle perfüzyonun yapıldığı safra-pankreas kanalı boyunca ve çevresindeki parenkimde belirgin mat bir görünüm ortaya çıktı. Hidrojen peroksit grubunda mikroskopik değişiklikler fokal alanlarda idi. Ana kanal epitelinin döküldüğü görüldü ve kanal çevresinde minimal polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu saptandı. Pankreas parenkiminde hemoraji gözlenmedi. Safra-pankreas kanalı çevresinde asiner hücrelerde hidropik dejenerasyon saptandı. Morfolojik skor, H_2O_2 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p < 0.01$; Tablo 1).

Apoptozis değerlendirmesi: p53 ve bcl-2 immün boyamalarında her iki grupta da boyanma saptanmadı.

Biyokimyasal değerlendirme: H_2O_2 grubunda serum amilaz ve lipaz düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.001$; Tablo 1). Plazma ve idrar TAP ölçümlerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$; Tablo 1).

TARTIŞMA

Akut pankreatitin patofizyolojisinde rol aldığı düşünülen serbest oksijen radikallerinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu gibi direkt toksik etkileri yanı sıra farklı bir mekanizmayı da tetikleyerek pankreasta görülen patolojik değişikliklerden sorumlu olabilirler. Bu mekanizmalardan birisi, serbest oksijen radikalleri'nin (SOR) pankreas hücresindeki tripsinojeni aktif tripsine dönüştürmesi olabilir. Literatürde, bu teoriyi araştıran tek bir çalışma bulunmaktadır. İn vitro koşullarda yapılmış bu çalışmada, SOR olarak bilinen hipoklorit, süperoksit ve hidroksil anyonlarının pankreatik enzim aktivasyonu yapmadıkları bulunmuştur (11). Biz de SOR'nin proteolitik enzim aktivasyonu üzerindeki etkisini in vivo koşullarda, oksijen radikalleri grubunun bir üyesi olan hidrojen peroksit ile araştırmayı amaçladık.

Daha önce SOR'nin pankreas üzerindeki direkt toksik etkilerini araştırdığımız çalışmalarımızda, safra-pankreas kanalını pankreas kuyruğundan duodenuma doğru çok düşük hızlarda SOR ile perfüze ederek akut pankreatit oluştuğunu saptadık (5,6,7). Bu çalışmamızda serum fizyolojik perfüzyonu yaptığımız kontrol grubunda biyokimyasal ve morfolojik incelemede patolojik bulguya rastlamadık. Hidrojen peroksit grubunda ise serum amilaz ve lipaz düzeyleri ile morfolojik skor kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu. Bu bulgular H_2O_2 grubunda akut ödematöz pankreatit geliştiğini gösterdi.

Fizyolojik olarak, pankreas sıvısında bulunan tripsinojenin 5-8 aminoasitlik bir parçası ince barsakta enterokinaz enzimi tarafından ayrılarak, inaktif formdaki tripsinojen aktif tripsine dönüştürülür (12). Tripsinojenin bu dönüşümü sırasında serbest kalan aminoasit bölümüne (tripsinojen aktive edici peptit) TAP adı verilir. Tripsinojen aktive edici peptit ince barsaktaki

mukozal peptidazlar tarafından hızla metabolize edilir. Bu nedenle serum ve idrarda çok az miktarda bulunur. Patolojik olarak, tripsinojen barsak lümeni dışında aktive olduğunda, aktive olan tripsinojen miktarına bağlı bir oranda TAP sistemik dolaşıma geçer. Serum, idrar ve peritoneal sıvıda tespit edilebilir. Bu sıvılarda ölçülen TAP, tripsinojen aktivasyonunun kantitatif bir göstergesi olarak kabul edilir (13,14,15). Biz de, tripsinojen aktivasyonunu gösterebilmek için serum ve idrar örneklerinde TAP konsantrasyonlarını ölçtük. Her iki grubun serum ve idrar TAP konsantrasyonları arasında istatistiksel fark bulamadık ve bu durumu iki şekilde açıklamaya çalıştık. 1. Bu konudaki tek in vitro çalışmada, hipoklorit, süperoksit ve hidroksil anyonu gibi SOR'nin enzim aktivasyonu yapmadığı bildirilmektedir (11). Aynı şekilde, intraduktal H_2O_2 perfüzyonu da tripsinojen aktivasyonu yapmamıştır. 2. Hidrojen peroksit perfüzyonu tripsinojen aktivasyonu yapıyor olabilir. Ancak, TAP'ın istatistiksel olarak farklı bulunabileceği pik değerine ulaşma zamanı bizim ölçüm yaptığımız zamandan farklı olabilir. Mithofer (16) iskemik pankreatitte, Foitzik (17) ise pankreatik arteriyel perfüzyonun bozulduğu nekrotizan pankreatit modellerinde pankreas dokusundaki TAP konsantrasyonu belirgin olarak artmasına rağmen, serum TAP konsantrasyonunun değişmediğini bulmuşlardır. Bu yazarlar, akut pankreatitin neden olduğu mikrovasküler değişiklikler nedeni ile pankreas dokusunun perfüzyonunun bozulması sonucunda TAP'ın sistemik dolaşıma geçemediğini öne sürmektedirler. Her ne kadar çalışmamızda, pankreastaki mikrovasküler değişiklikler ile ilgili bir araştırma yapılmamış olsa da, bu mekanizma bizim modelimizde de rol oynamış olabilir. Ayrıca pankreatit indüksiyonu ile serum ve idrar TAP ölçümleri arasında geçen sürenin TAP seviyeleri ile ilgili olabileceğine dair çalışmalar da bulunmaktadır. Castillo (14), subkutan serulein ve intraduktal deoksikolik asit enjeksiyonu ile oluşturduğu pankreatit modelinde, serum TAP konsantrasyonunu 6. saatte, idrar TAP konsantrasyonunu ise 4. saatten sonra kontrol grubuna göre yüksek bulduğunu bildirmektedir. Merriam kanal ligasyonu ile oluşturduğu akut pankreatit modelinde ise serum ve pankreas dokusundaki TAP konsantrasyonlarını, 6, 12 ve 24. saatlerde ölçmüş, ve 24 ile 48. saatte kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuştur (18). Bu sonuçlar pankreatit modeli ve ölçüm zamanı ile TAP seviyeleri arasında yakın bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Öte

yandan pankreatitin şiddeti ile TAP konsantrasyonları arasında da bir ilişki olabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Banks, ERCP sonrası oluşan ılımlı pankreatitlerde idrar TAP konsantrasyonunun artmadığını tespit etmiştir (19). Bütün bu bilgiler ışığında; bu çalışmada kullandığımız deneysel akut pankreatit modelimizin akut ödematöz pankreatit oluşturması, literatürdeki akut pankreatit modellerinden farklı olması ve pankreatitin indüksiyonu ile TAP ölçümü arasında geçen sürenin kısa olması serum ve idrar TAP konsantrasyonlarının kontrol grubundan farklı bulunmamasına neden olmuş olabilir.

Apoptozis, genetik olarak programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (20,21). Morfolojik olarak hücrede kromatin kümeleşmesi, hücrenin küçülmesi ve diğer hücrelerle ilişkisinin ortadan kalkması ile nekrozdan kesin olarak farklılık gösterir. Apoptoziste hücre çevresine zarar vermeden ölür. Organizmadaki bütün hücreler genetik olarak apoptozis yeteneği taşır. Ancak, bu yeteneğin kullanılmasına neden olan mekanizmaların ne olduğu, apoptozisin nasıl ve hangi koşullarda başladığı bilinmemektedir. Genetik çalışmalara göre, p53 geni apoptozisi uyarırken, bcl-2 geni inhibe etmektedir (20, 21,22). Apoptozis, normal dokuların hücre sel siklusunda fizyolojik olarak görülürken, patolojik durumlarda da görülebilmektedir. Değişik akut pankreatit modellerinde, pankreasın asiner hücrelerinde apoptozis saptanmıştır (23,24,25). Ek olarak deneysel pankreatit modelleri ile yapılan çalışmalarda apoptozisin stimülasyonunun pankreatit şiddetini azaltıcı bir rol oynadığı saptanmıştır (26,27,28). Akut pankreatitte SOR'nin in vivo koşullarda asiner hücre apoptozisi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda, H₂O₂ ile oluşturduğumuz akut pankreatit modelinde asiner hücre hasarının apoptozis ile ilişkisini araştırdık. Ancak, p53 ve bcl-2 ile yapılan immün boyamalarda her iki grupta da boyanma saptamadık. Ortiz, in vitro çalışmasında, 10-1000 µM arasında değişen konsantrasyonlarda H₂O₂'e tabii tuttuğu izole rat asinüslerinde, apo-pitozisi, H₂O₂'i sadece 100 µM'a kadar konsan-trasyonlarda kullandığında tespit etmiş ve bunun üzerindeki konsantrasyonlarda nekroz geliştiğini bildirmiştir (29). Bizim çalışmamızda, apoptozis görülmesi, deneyin in vivo olarak yapılmasına ve kullanılan 250 µM H₂O₂ konsantrasyonunun yüksek olmasına bağlı olabilir. Akut pankreatit oluşturduğumuz bu modeli içeren yeni yapılacak çalışmalar konunun açıklığı kavuşmasını sağlayabilir.

Sonuç olarak; bu çalışmada, 250 µM H₂O₂'in intraduktal perfüzyonu biyokimyasal ve morfolojik bulgularla belirlenen akut ödematöz pankreatit oluşturdu. Bu akut pankreatit modelinde 3. saatte, serum ve idrarda tripsinojen aktivasyonu saptanmadı. H₂O₂'in kullanılan bu konsantrasyonu ile pankreas dokusunda apoptozis gözlenmedi. Bu model ile oluşturulacak akut pankreatitin, daha geç dönemlerinde yapılacak ölçümler ile H₂O₂ ve tripsinojen aktivasyonu, daha düşük konsantrasyonlarda kullanılacak H₂O₂ ile SOR ve apoptozis arasındaki ilişkinin net olarak ortaya konması mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

1. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL: The role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1984; 200: 405-413.
2. Dabrowski A, Gabryelewicz A, Wereszczynska U, Chyczewski L: Oxygen derived free radicals in cerulein induced acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 1245-1249.
3. Schoenberg MH, Büchler M, Gasper M, Bültmann B, Beger HG: Involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis. *Gut* 1990; 31: 1138-1143.
4. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T: Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein induced acute pancreatitis. *Digestion* 1990; 47: 130-137.
5. Coşkun T, Bozoklu S, Özenç A, Özdemir A. Effect of hydrogen peroxide on permeability of main pancreatic duct and morphology of the pancreas. *Am J Surg*. 1998; 176: 53-58.
6. Coşkun T, Aker Y, Korkusuz P, Örs Ü, Kılınc K. Hidrojen peroksit ile oluşturulan deneysel akut pankreatit modelinde intraduktal ve sistemik katalaz tedavisinin koruyucu etkisi. *Çağdaş Cerrahi Dergisi* 1999; 13:147-153.
7. Coskun T, Korkusuz P, Kaya Y, Örs Ü, Kılınc K. Free oxygen radical-induced acute pancreatitis. A light and electron microscopic study. *Hepatogastroenterology* 2002; (Basımda).
8. Saluja A, Hofbauer B, Yamaguchi Y, Yamanaka K, Steer M. Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; 220; 875-878.
9. Bhatia M, Hofbauer B, Walling MA, Lee HS, Frossard JL, Steer ML, Saluja AK. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 246: 476-483.
10. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10.

11. Schultz HU, Niedereau C. Oxidative stress-induced changes in pancreatic acinar cells; *Insight from in vitro studies. Hepatogastroenterol* 1994; 41: 309-312.
12. Hurley PR, Cook A, Jehanli A, Austen BM, Taylor JH. Development of radioimmunoassay for free tetra-L-aspartyl-L-lysine trypsinogen activation peptides (TAP). *J Immunol Methods* 1988; 111: 195-203.
13. Schmidt J, Castillo CF, Ratnner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Warshaw AL. Trypsinogen activation peptides in experimental rat pancreatitis: prognostic implications and histopathologic correlates. *Gastroenterol* 1992; 103: 1009-1016.
14. Castillo CF, Schmidt J, Ratnner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Jehanli A, Patel G, Taylor HJ, Warshaw AL. Generation and possible significance of trypsinogen activation peptides in experimental acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 1992; 7: 263-270.
15. Foitzik T, Lewandrowski KB, Castillo CF, Ratnner DW, Warshaw AL. Evidence for extraluminal trypsinogen activation in three different models of acute pancreatitis. *Surgery* 1994; 115: 698-702
16. Mithöfer K, Castillo CF, Frick TW, Foitzik T, Bassi DC, Lewandrowski KB. Increased intrapancreatic trypsinogen activation in ischemia-induced experimental pancreatitis. *Ann Surg* 1995; 221: 364-371.
17. Foitzik T, Hotz HG, Schmidt J, Klar E, Warshaw AL, Buhr HJ. Effect of microcirculatory perfusion on distribution of trypsinogen activation peptides in acute experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2184-2188.
18. Merriam LT, Wilcockson D, Samuel I, Joehl RJ. Ligation-induced acute pancreatitis increases pancreatic circulating trypsinogen activation peptides. *J Surg Res* 1996; 60: 417-421.
19. Banks PA, Carr-Locke DL, Slivka A, Van Dam J, Lichtenstein DR, Hughes M. Urinary trypsinogen activation peptides (TAP) are not increased in mild ERCP-induced pancreatitis. *Pancreas* 1996; 12: 294-297.
20. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *J Clin Pathol* 2000; 53: 55-63.
21. Türker A. Apoptosis. *Hacettepe Tıp Dergisi* 1997; 28: 58-62.
22. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (eds). *Cell injury and adaptation. In; Basic Pathology WB Saunders Philadelphia Fifth Edition* 1994: 1-34.
23. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshiba T, Miyamoto Y, Doi r, Imamura M. Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis. *J Surg Res* 1997; 71: 127-136.
24. Walker NI. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol* 1987; 126: 439
25. Walker NI, Winterford CM, Williamson RM, Kerr FR. Ethionine-induced atrophy of rat pancreas involves apoptosis of acinar cells. *Pancreas* 1993; 8: 443.
26. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: C1295-C1304.
27. Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Steer ML. Effect of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis and severity of acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1996; 271: C982-C993.
28. Bhatia M, Wallig MA, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML, Saluja AK. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 476-483.
29. Ortiz EM, Dusetti NJ, Vasseur S, Malka D, Bödeker H, Dagorn JC, Iovanna JL. The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology* 1998; 114: 808-816.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr. Teoman COŞKUN
Posta Kutusu 90, MANİSA