



ACE/NEP Dual İnhibitörü Omapatrilatın İndometazinle İndüklenen Mide Ülserinde Koruyucu Etkileri

Protective Effects of ACE/NEP Dual Inhibitor Omapatrilat for Indomethacin-induced Gastric Ulcer

© Kadir Giray ERKAYMAN¹, © Rüstem Anıl UĞAN², © Zeynep Berna AKSAKALLI MAĞDEN¹, © Eda YILMAZ¹, © Ayşe BOZKURT^{1,3}, © Elif ÇADIRCI^{1,4}

¹Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

³Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Klinik Araştırma, Geliştirme ve Tasarım Uygulama ve Araştırma Merkezi, Erzurum, Türkiye

ÖZ

Amaç: Renin-angiotensin-aldosteron sistemi (RAAS), oksidatif stres ve çeşitli gastroenterolojik mekanizmalarda önemli roller oynar. RAAS etkili bir ajan olan omapatrilat, hem neprilisin nötr endopeptidazı (NEP) hem de anjiyotensin dönüştürücü enzimi (ACE) inhibe eder ve bu nedenle mide ülserine karşı koruyucu mekanizmaları etkileyebilir. Dolayısıyla bu çalışmada, omapatrilat tedavisinden kaynaklanan farmakolojik ve biyokimyasal değişiklikleri ortaya çıkarmak için farelerde indometazin tarafından indüklenen bir mide ülseri modelinde omapatrilatın gastroprotektif rolü incelendi.

Gereç ve Yöntem: Kırk iki BALB/c faresi yedi gruba ayrıldı: Kontrol, sadece 40 mg/kg omapatrilat, sadece 25 mg/kg indometazin, indometazin ve 40 mg/kg famotidin, diğer üç grup ise indometazin ve 10-40 mg/kg omapatrilat. Tüm kimyasallar belirlenen dozlarda 0,5 mL %0,9 NaCl çözümü içinde oral gavaj ile verildi. Mide ülserleri, famotidin (40 mg/kg) ve omapatrilat (10-40 mg/kg) ile tedavi edilen farelerde indometazin tarafından indüklendi. Mide dokusu örnekleri makroskopik olarak incelendi; ve oksidatif stres biyobelirteçleri malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), NEP, ACE seviyeleri ve ayrıca süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçüldü.

Bulgular: En iyi antiülser aktivite 40 mg/kg omapatrilat ile ölçüldü, burada ülser gruplarında gözlenen gastrik hasar önemli ölçüde tersine çevrildi ve spesifik famotidin tedavisine en benzer sonuçları verdi. Artan omapatrilat dozuna bağlı olarak, SOD aktivitesinin yanı sıra GSH ve MDA seviyeleri düzeldi. ACE ve NEP seviyeleri kontrol grubundaki seviyelerle benzerdi. Dolayısıyla; gastrotoksisite ve gastrik ülser endikasyonlarının tersine çevrildiğini gösteren bu makroskopik ve biyokimyasal bulgular, omapatrilatın NEP ve ACE inhibisyonunun indometazin toksitesindeki rolünü ve güçlü gastroprotektif potansiyelini göstermektedir.

Sonuç: NEP ve ACE'nin omapatrilat tarafından ikili inhibisyonu, indometazinle indüklenen mide ülseri ile ilişkili oksidatif stresi baskılayabilir. Dolayısıyla; omapatrilatın ülser tedavisinde koruyucu etkisi yeni tedavi stratejileri arayışlarına yol açabilir.

Anahtar Kelimeler: Gastrik ülser, indometazin, neprilisin, oksidatif stres, omapatrilat

ABSTRACT

Aim: The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays important roles in oxidative stress and various gastroenterological mechanisms. Omapatrilat, an RAAS-acting agent, inhibits both neprilysin neutral endopeptidase (NEP) and angiotensin converting enzyme (ACE) and may therefore affect protective mechanisms against gastric ulcer. Therefore, this study examined the gastroprotective role of omapatrilat in a mouse model of gastric ulcer induced by indomethacin to reveal pharmacological and biochemical changes resulting from omapatrilat treatment.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Elif ÇADIRCI, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Tel.: +90 442 344 87 19 **E-posta:** ecadirci@atauni.edu.tr, elifcadirci@gmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-0836-7205

Geliş tarihi/Received: 10.06.2023 **Kabul tarihi/Accepted:** 24.07.2023

©Telif Hakkı 2023 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2023 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.



Materials and Methods: Forty-two BALB/c mice were divided into seven groups: control, 40 mg/kg omapatrilat only, 25 mg/kg indomethacin only, indomethacin and 40 mg/kg famotidine, and three groups with indomethacin and 10-40 mg/kg omapatrilat. All chemicals were administered by oral gavage in 0.5 mL of 0.9% NaCl solution at the determined doses. Stomach ulcers were induced by indomethacin in mice treated with famotidine (40 mg/kg) and omapatrilat (10-40 mg/kg). Stomach tissue samples were examined macroscopically. Oxidative stress biomarkers of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), NEP and ACE levels as well as superoxide dismutase (SOD) activity were measured.

Results: The best antiulcer activity was measured with 40 mg/kg omapatrilat, where the gastric damage observed in the ulcer groups was significantly reversed, and gave the most similar results to the specific famotidine treatment. In relation with the increasing omapatrilat dose, SOD activity was corrected as well as GSH and MDA levels. Also the levels of ACE and NEP decreased back towards those measured in the control group. Therefore, these macroscopic and biochemical findings indicating reversal of gastrotoxicity and gastric ulcer indications demonstrate the role of omapatrilat's NEP and ACE inhibition in indomethacin toxicity, and its strong gastroprotective potential.

Conclusion: Dual inhibition of NEP and ACE by omapatrilat may suppress oxidative stress associated with indomethacin-induced gastric ulcer. Therefore, the protective effect of omapatrilat in the treatment of ulcers may lead to the search for new treatment strategies.

Keywords: Gastric ulcer, indomethacin, neprilysin, oxidative stress, omapatrilat

GİRİŞ

Non-steroidal anti-enflamatuvar ilaç (NSAID) olan indometazin; osteoartrit, romatoid artrit, tendinit, ankilozan spondilit ve travmatik sinovit gibi ciddi enflamatuvar hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır¹. İndometazin, enflamatuvar ağrının tedavisi için yaygın olarak reçete edilmektedir, ancak ciddi gastrointestinal ülserasyona neden olması nedeniyle antienflamatuvar etkileri gölgede kalmaktadır². İndometazinin ayrıca oksidatif stresi arttırdığı ve midedeki kan akışını bozduğu da bulunmuştur³. Mide ülseri olan hastalar yan etkiler nedeniyle indometazin tedavisini bırakmayı tercih etmektedirler⁴.

İndometazin, siklooksijenaz enzimlerinin (COX-1 ve COX-2) bilinen bir inhibitörüdür; ve mide ülseri üzerindeki etkilerinin özellikle COX-1 inhibisyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir³. Kan basıncı regülasyonunu ve elektrolit dengesini koordine eden multi hormonal bir sistem olan renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) de mide ülserlerinin etiolojisinde rol oynadığı yakın zamanda gösterilmiştir^{5,6}. RAAS aynı zamanda enflamasyon ve oksidatif stres gibi patofizyolojik olaylarda da rol almaktadır⁷⁻⁹. RAAS'ın son ürünü olan anjiyotensin II (Ang II), oksidatif strese bağlı olarak vasküler enflamasyon ve endotel disfonksiyonu sırasında da üretilir. Ang II üretimi, vasküler nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz aktivitesini artırır ve ayrıca süperoksit oluşumunu destekler. Ortaya çıkan süperoksit oksidatif stresi artırır ve endotel hasarını başlatır⁷. Ang II'nin anahtar aracı olduğu RAAS aktif bir ajan olan omapatrilat, hem neprilisin/nötral endopeptidazı (NEP) hem de anjiyotensin dönüştürücü enzimi (ACE) inhibe eder¹⁰. NEP inhibisyonu; daha güçlü vazodilatasyon¹¹, oksidatif stresin azalması ve enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun azalması gibi faydalarla sonuçlanır^{12,13}. Önceki araştırmalar omapatrilatın endotel disfonksiyonunu önleyebildiğini¹⁴ ve ayrıca böbrek ve kardiyovasküler koruma sağlayabildiğini göstermiştir^{15,16}.

Bu nedenle omapatrilat potansiyel olarak mide ülserine karşı etkili bir tedavi olabilir. Ancak mide ülseri ile ACE/NEP inhibisyonu arasındaki ilişki henüz aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, omapatrilatın indometazin indüklenen mide ülserlerine karşı gastroprotektif rollerini, omapatrilat tarafından NEP ve ACE inhibisyonunun çeşitli oksidan/antioksidan parametreler üzerindeki etkilerini ve bu ikili NEP ve ACE inhibisyonu ile omapatrilatın antiülser rolü arasındaki ilişkiyi inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

Famotidin, indometazin ve omapatrilat toz malzemeler olarak sırasıyla; Nobel A.Ş. (Türkiye), Merck Sharp & Dohme Corporation (Türkiye) ve Sigma-Aldrich'den (Almanya) satın alındı.

Hayvanlar

40-50 gram ağırlığındaki 42 BALB/c erkek fareler, deneyler boyunca standart koşullar altında (07:00-20:00 ışık süresi, %55 bağıl nem ve 21±2 °C) çelik kafeslerde tutuldu ve gerektiği kadar musluk suyu verildi ve standart pellet yemle beslendi. Tüm hayvan bakımı ve protokolleri Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (karar no: 157, tarih: 02.08.2018).

Hazırlama ve Tedavi

Fareler yedi gruba (n=6) ayrıldı, 24 saat aç bırakıldı ve aşağıdaki kimyasallar uygulandı:

Grup 1: Sağlıklı,

Grup 2 (OMA): Omapatrilat (40 mg/kg),

Grup 3 (ÜLSER): İndometazin (25 mg/kg),

Grup 4 (ÜLSER+FAMO): İndometazin (25 mg/kg) + Famotidin (40 mg/kg),

Grup 5 (ÜLSER+OMA10): İndometazin (25 mg/kg) + Omapatrilat (10 mg/kg),

Grup 6 (ÜLSER+OMA20): İndometazin (25 mg/kg) + Omapatrilat (20 mg/kg),

Grup 7 (ÜLSER+OMA40): İndometazin (25 mg/kg) + Omapatrilat (40 mg/kg).

Tüm kimyasallar, 0,5 mL %0,9 NaCl çözeltisinin oral gavajı yoluyla verildi. Omapatrilat 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarında uygulanmış olup daha önceki deneysel çalışmalarda benzer dozlarda omapatrilatın oksidatif stres parametrelerini etkileyebildiği belirlenmiştir^{17,18}. Uygulanan indometazin dozajı standart literatür bilgisine göre seçilmiştir³. Bu indometazin (25 mg/kg)¹⁹ dozajı, famotidin (40 mg/kg)¹⁹ veya omapatrilat (10, 20 ve 40 mg/kg)^{17,18} uygulandıktan 10 dakika sonra uygulandı²⁰.

Fareler daha sonra 6 saatlik bir sürenin ardından 50 mg/kg öldürücü dozda tiyopental anestezi ile sakrifiye edildi. Farelerin mideleri çıkarıldı, daha büyük eğrilik yüzeyi boyunca açıldı ve ardından salin solüsyonu (%0,9 NaCl) ile yıkandı. Toplanan mide dokusu örneklerinde makroskopik olarak ülserli alanların görüntüleri milimetrik kağıt üzerinde ölçülmüştür²¹. Antiülser aktiviteleri, sağlıklı gruba kıyasla her gruptaki ülserli alandaki azalma yüzdesi olarak hesaplandı.

Biyokimyasal Ölçümler

Cerrahi adımların ardından yaklaşık 75 mg öğütülmüş mide dokusu, bir homojenleştirici (QIAGEN'den TissueLyser II) kullanılarak eppendorf tüplerinde 1 mL fosfat tamponlu salin içerisinde homojenleştirildi ve ardından santrifüjlendi. Toplam protein konsantrasyonları Lowry yöntemi kullanılarak değerlendirildi (Sigma Aldrich toplam protein kiti TP0300-1KT).

Malondialdehit (MDA) seviyeleri²² ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi²³ standartlarda değerlendirildi ve her numunenin süpernatantı, daha önce tarif edildiği gibi enzim bağlantılı immünosorbent analizi (ELISA) okuyucu yöntemlerinin değiştirilmiş yöntemlerine göre oda sıcaklığında çalışıldı^{24,25}. Sırasıyla YLA0163MO, YLA1760MO ve YLA0167MO ELISA kitleri kullanılarak üreticinin talimatlara göre kullanıldı, ACE ve neprilisin aktiviteleri ve glutatyon (GSH) seviyesi BioTek Epoch Mikroplaka Spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü.

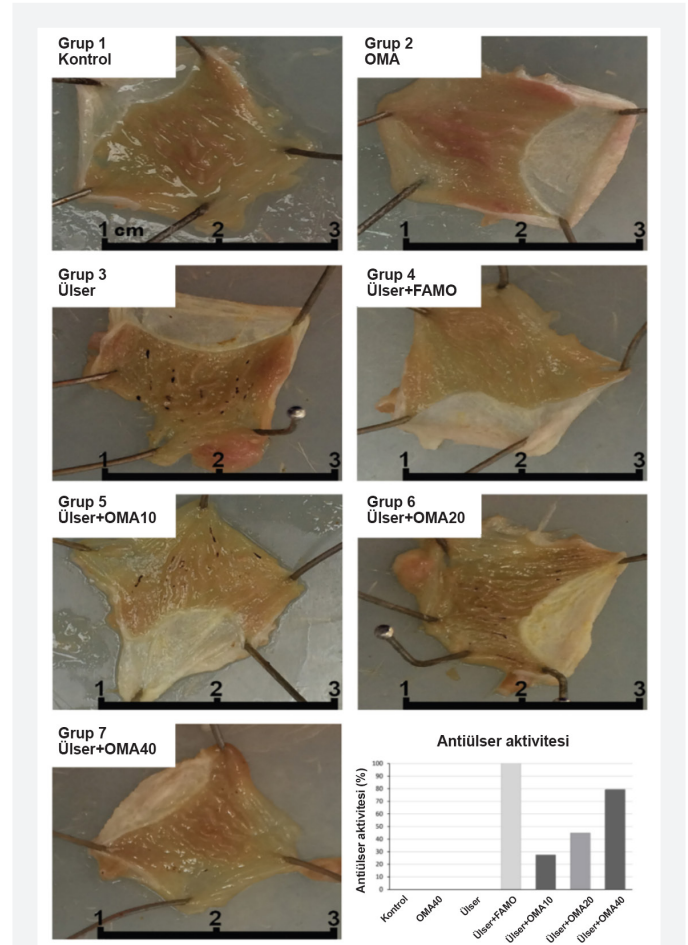
İstatistik Analiz

Biyokimyasal ölçümler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve IBM Statistical Package for the Social Sciences yazılımı sürüm 20.0 kullanılarak Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklar p<0,05'te anlamlı kabul edildi. Tüm sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.

BULGULAR

Mide Örneklerinde Mide Ülseri

Her deney grubundaki mide dokularının makroskopik görüntüleri Şekil 1'de gösterilmektedir. Grup 1 (sağlıklı kontrol), 2 (sağlıklı+omapatrilat) ve 4'ten (ülser+famotidin) elde edilen dokularda ülser oluşumuna dair herhangi bir belirti görülmedi ve görsel olarak anlamlı bir fark görülmedi. İndometazin uygulamasından beklendiği gibi, Grup 3 farelerden (indometazin kontrol grubu) elde edilen tüm mide dokusu örnekleri boyunca, mukozal defektlerden oluşan, farklı şekil ve boyutlarda çok sayıda ülser alan gözlemlendi. Bu odaklar belirgin sınırlara sahipti ve çoğunlukla şişmiş noktalarla çevrelenmişti. Sırasıyla 10, 20 ve 40 mg/kg omapatrilat ile ön işleme tabi tutulan grup 5 (OMA10), 6 (OMA20) ve 7'de (OMA40) artan omapatrilat dozajı ile bu noktaların sayısı ve boyutları azalmıştır. Bu bulgular, her deney grubunda ülserli noktaların ölçülen alanları ve bunlara karşılık gelen anti-ülser aktivitesi ile birlikte Tablo 1'de verilmektedir.



Şekil 1. Ülserasyonların gözlemlendiği fare gruplarından alınan mide dokusu örneklerinin makroskopik görüntüleri (ölçek çubukları 2 cm uzunluğunu gösterir)

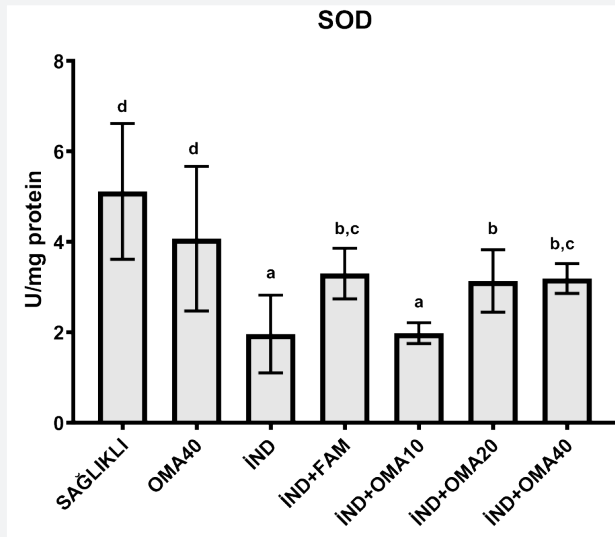
Tablo 1. Ülserli alanların ölçümü ve antiülser aktiviteleri

| Gruplar | Ülserli alan (mm ²) | Antiülser aktivite (%) |
|--------------|---------------------------------|------------------------|
| Sağlıklı | 0,0 ^a | - |
| OMA 40 | 0,0 ^a | - |
| ÜLSER | 29,0±2,0 ^c | - |
| ÜLSER+FAMO | 0,0 ^a | 100,0 |
| ÜLSER+OMA 10 | 21,0±2,0 ^d | 27,5 |
| ÜLSER+OMA 20 | 16,0±1,2 ^c | 44,8 |
| ÜLSER+OMA 40 | 6,0±0,3 ^b | 79,3 |

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak belirtildi. Antiülser aktiviteleri, kontrole kıyasla ilgili gruptaki ülserli alandaki yüzde azalma olarak hesaplandı. Karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı. Aynı harfe sahip ortalamalar anlamlı derecede farklı değildir (p<0,05)

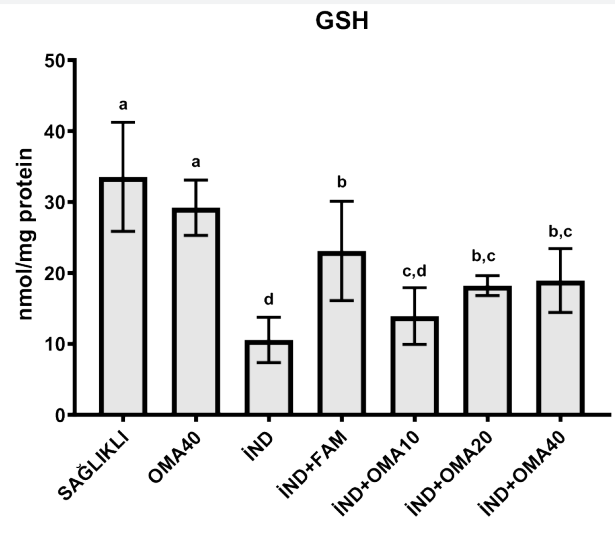
Biyokimyasal Sonuçlar

SOD, MDA ve GSH ölçümleri Şekil 2, 3 ve 4'de grafiksel olarak gösterilmektedir. 20 ve 40 mg/kg omapatrilat ile tedavi gruplarında ölçülen SOD aktivitesi, sağlıklı gruplarda (1 ve 2) ölçülenlere en yakın olanlardır. Grup 3'te en az SOD aktivitesi indometazin uygulamasıyla ölçüldü. Ayrıca 10 mg/kg omapatrilat uygulanan Grup 5'te Grup 3 ile benzer SOD aktivitesi görüldü. GSH ölçümlerinde de benzer sonuçlar elde edildi. En yüksek GSH düzeyi Grup 1 ve 2'de ölçüldü. Grup 3'te GSH düzeyi indometazin uygulamasına bağlı olarak anlamlı derecede azaldı, Grup 4'te ise standart famotidin tedavisiyle çoğunlukla düzeldi. Omapatrilat ile tedavi edilen gruplarda, Grup 5'te GSH



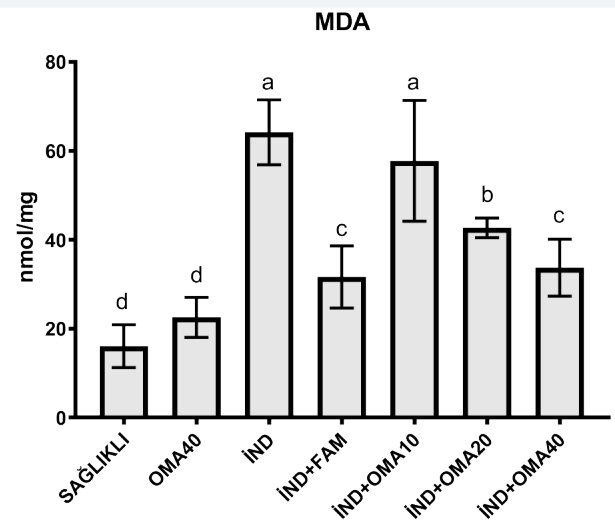
Şekil 2. İndometazinle indüklenen mide ülserinde omapatrilat tedavisinin SOD aktivitesi üzerindeki etkileri (sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. Aynı harfe sahip ortalamalar anlamlı derecede farklı değildir p<0,05)

SOD: Süperoksit dismutaz



Şekil 3. İndometazinle indüklenen mide ülserinde omapatrilat tedavisinin GSH düzeyi üzerine etkileri (sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. Aynı harfe sahip ortalamalar anlamlı derecede farklı değildir p<0,05)

GSH: Glutasyon



Şekil 4. İndometazinle indüklenen mide ülserinde omapatrilat tedavisinin MDA düzeyi üzerine etkileri (sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. Aynı harfe sahip ortalamalar anlamlı derecede farklı değildir p<0,05)

MDA: Malondialdehit

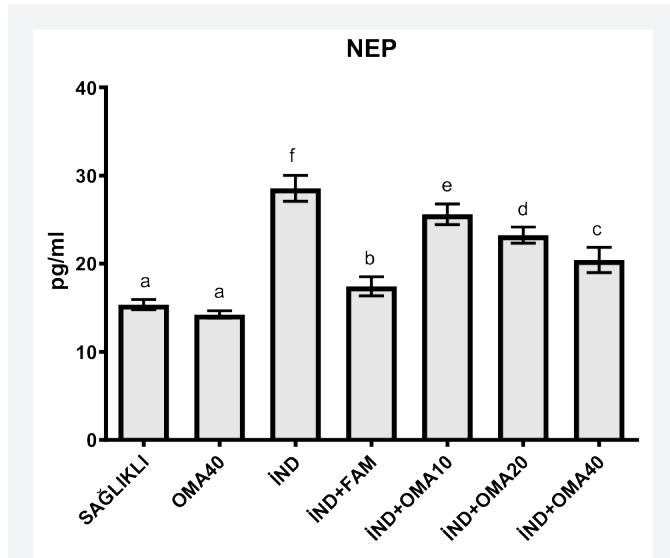
seviyesinde yalnızca küçük bir iyileşme görülürken, Grup 6 ve 7'de GSH seviyeleri, Grup 4'te standart tedaviyle ölçülene istatistiksel olarak benzerdi. MDA ölçümlerinde omapatrilatın oksidatif strese karşı etkinliği de gözlemlendi. Grup 1 ve 2 en düşük MDA düzeylerini gösterirken, en yüksek MDA düzeyleri Grup 3 ve 5'te ölçüldü. Grup 4'teki standart tedavi ve Grup 7'deki 40 mg/kg omapatrilat tedavisi, Grup 1 ve 2'de kaydedilenlere en yakın MDA düzeyleriyle sonuçlandı. SOD aktivitesinin yanı sıra GSH ve MDA düzeyleriyle ilgili bu sonuçlar, omapatrilatın ülserle karşı gastroprotektif potansiyelini göstermektedir. NEP ve ACE faaliyetleri Şekil 5 ve 6'da gösterilmektedir. En düşük NEP ve ACE seviyeleri Grup 1 ve 2'de ölçüldü; ve en yüksek seviye beklediği gibi indometazin nedeniyle Grup 3'te ölçüldü. Omapatrilat dozunun 10 mg/kg'dan 40 mg/kg'a çıkarılmasıyla bu enzim seviyeleri önemli ölçüde azaldı; bu da omapatrilatın hem NEP'yi hem de ACE'yi ikili olarak inhibe edebileceğini gösterir. Ülser oluşumuna paralel olarak hem ACE hem de NEP enzim seviyelerinde artış görüldü.

TARTIŞMA

Bu çalışmada hem NEP hem de ACE inhibitörü olan ve RAAS yolu üzerinden etki eden omapatrilatın indometazinin neden olduğu mide ülseri hasarını azalttığını gözlemledik. Omapatrilatın oksidan/antioksidan parametrelerle bağlantısı gösterilmiştir. İndometazinin gastrotoksik etki mekanizması ile omapatrilatın antiülser etkisi arasındaki ilişki de araştırıldı. Omapatrilatın mide dokusundaki hem NEP hem de ACE

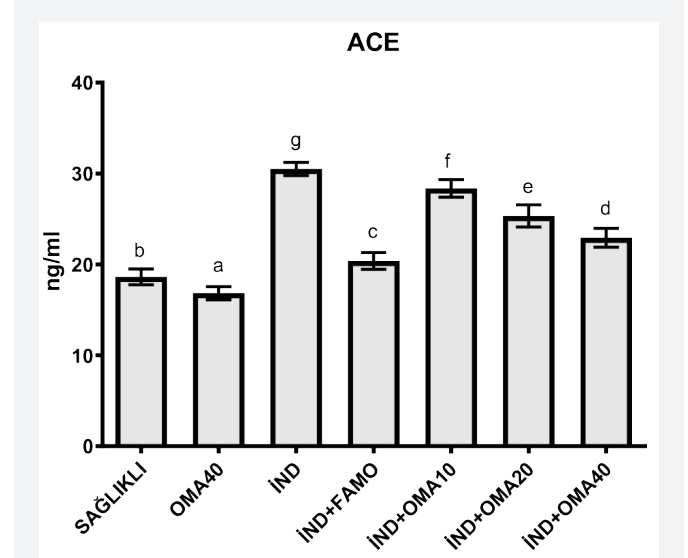
seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Omapatrilat tedavisinin GSH düzeyini ve SOD aktivitesini artırırken, MDA düzeylerini azalttığı gözlemlendi. Bu nedenle omapatrilatın mide ülserinde oksidatif stresin neden olduğu hasarı önlediği gösterilmiştir. Birçok enflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılan indometazin, NSAID'dir. İndometazinin iyi bilinen bir yan etkisi olan mide ülseri oluşumu, enflamasyonu tetiklemek için deneylerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle deneylerimizde indometazin sadece anti-enflamatuvar ilaç olarak değil aynı zamanda hayvanlarda ülser modeli oluşturmak için de kullanılmaktadır²⁶.

İndometazinin 10, 20 ve 25 mg/kg dozlarında hayvanlarda mide dokusunda önemli hasara neden olduğu gösterilmiştir²⁷. Benzer şekilde, sonuçlarımız sadece 25 mg/kg indometazin alan grupta açıkça görülebilen ülser alanlarını da gösterdi. Famotidin grubunda ülser oluşumu gözlemlenmedi. Omapatrilatın doza bağlı olarak antiülser etki gösterdiği görüldü. En iyi antiülser etkisi 40 mg/kg omapatrilat dozunda kaydedildi. RAAS'ta enflamasyonu ve oksidatif stresi indükleyen Ang II önemli bir son üründür²⁸. Ek olarak Ang II, gastrointestinal sistemdeki reseptörü aktive ederek mide mukozal damar sistemini daraltır²⁹. Gastrointestinal sistemde RAAS'ın mide³⁰, kolon³¹ ve bağırsak³² üzerinde fonksiyonel etkileri olduğu rapor edilmiştir. ACE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör bloker (ARB) ilaçları dahil olmak üzere RAAS'a etki eden ajanların farklı ülser modelleri üzerindeki etkileri daha önce



Şekil 5. İndometazine indüklenen mide ülserinde omapatrilat tedavisinin NEP seviyesi üzerine etkileri (sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. Aynı harfe sahip ortalamalar anlamlı derecede farklı değildir p<0,05)

NEP: Nötr endopeptidaz



Şekil 6. İndometazine indüklenen mide ülserinde omapatrilat tedavisinin ACE seviyesi üzerine etkileri (sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. Aynı harfe sahip ortalamalar anlamlı derecede farklı değildir p<0,05)

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzimi

incelenmiştir. Örneğin; hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilk ACE inhibitörü olan kaptopril, aspirinin neden olduğu mide lezyonları üzerinde antioksidan etkiler göstermiştir³³. ARB'lerin mide kan akışını koruyarak ülserasyonları önlediği ve sempatoadrenal aktivasyonu azalttığı belirlenmiştir³⁴. ARB'lerin sıçanlarda iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı mide hasarını da baskıladığı gösterilmiştir³⁵. Ang II'nin fizyolojik bir antagonisti olan anjiyotensin-(1-7), sıçanlarda stresin neden olduğu mide lezyonlarına karşı da etkili olmuştur⁹. Bu sonuçlar; RAAS'ın farklı aşamalarındaki inhibisyonunun ülser tedavisi sırasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli ülser modellerinde RAAS inhibisyonunun gastroprotektif yapısının altında yatan nedenler olarak potansiyel anti-enflamatuvar, gastro-koruyucu veya anti-oksidatif etkiler gösterilebilir. Bu bulgulara benzer şekilde, burada omapatrilatın ACE'yi inhibe ederek RAAS'ı bloke ettiğini ve mideyi Ang II'ye bağlı olası oksidatif stresten koruduğunu gösterdik. İndometazinin mide üzerindeki toksik etkisinin diğer NSAID'lere göre çok daha şiddetli olduğu bilinmektedir³⁶. İndometazinin gastrointestinal sistem üzerindeki bu etkisinin prostaglandin (PG) sentezinin inhibisyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir³⁷. Ancak NSAİİ'lerin gastrik mukozal hasarda rol oynadığı COX teorisi bu hasarı yeterince açıklayamamaktadır³⁸. Örneğin; bazı çalışmalarda tekrarlayan indometazin uygulamasıyla PGE2 oluşumu büyük oranda önlenmiş olsa da mukozal lezyonun azaldığı gözlenmiştir³⁹. Bu durum antiülser aktivite mekanizmasında PG dışında faktörlerin de olabileceğini göstermektedir. Bu düşünceden yola çıkarak oksidan/antioksidan parametrelerin mide mukozal adaptasyon mekanizmasında rol oynayıp oynamadığını belirlemek amacıyla GSH ve MDA düzeylerinin yanı sıra SOD aktivitesi de ölçüldü. Bazı çalışmalarda indometazinin neden olduğu mide hasarının etiopatogenezinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) rol oynadığı gösterilmiştir⁴⁰. ROS'a bağlı doku hasarı, hücre zarında lipit radikallerinin oluşmasıyla başlar. Daha sonra bu radikal önce lipit hidroperoksitlere, en sonunda da MDA, alkan ve aldehit gibi toksik ürünlere dönüşür^{41,42}. ROS'un zararlı etkileri, hücrelerin antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan bileşiklerden oluşan düzenleyici bir ağ aracılığıyla farklı ve güçlü detoksifikasyon mekanizmaları geliştirmesini gerektirmiştir⁴². Bu antioksidanlardan GSH, ROS konsantrasyonlarını belirli seviyelerin altında tutarak doku hasarını önler⁴³. Dolayısıyla beklendiği gibi en yüksek GSH düzeyinin kontrol grubunda ölçüldüğünü gözlemledik. Hasarın en yüksek olduğu indometazin grubunda GSH düzeyi en az ölçüldü. Ayrıca omapatrilatın ülser gruplarında GSH düzeyini doza bağlı olarak arttırdığı görüldü. Antioksidan seviyelerindeki bu artışla birlikte omapatrilatın oksidan/antioksidan dengesinin korunmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. Bir başka önemli antioksidan olan SOD'un, indometazinin neden olduğu hasarı kontrol etmede koruyucu bir faktör olarak görev yaptığı gösterilmiştir⁴⁴. Yukarıdaki GSH sonuçlarına benzer şekilde en yüksek SOD aktivitesini kontrol grubunda, en düşük SOD

aktivitesini ise indometazin grubunda ölçtük. Beklendiği gibi omapatrilatın doza bağlı olarak SOD aktivitesinde artışa yol açtığını gözlemledik. Deneylerimizde, omapatrilat ile tedavi edilen ülserli farelerde SOD aktivitesindeki artış, omapatrilatın antioksidan ve antiülser etkilerini göstermektedir. Ölçümlerimiz 40 mg/kg omapatrilatın standart famotidin tedavisiyle istatistiksel olarak benzer bulgulara yol açtığını göstermiştir.

Dokulardaki aşırı toksik oksijen radikallerinin, bir oksidatif stres biyobelirteci olan MDA'nın oluşumuna yol açan lipid peroksidasyonunu aktive ettiği bildirilmektedir⁴⁵. MDA, reaktif aldehitler üreterek hücre zarı yapısına ve diğer hücre bileşenlerine doğrudan zarar vererek doku hasarına ve çeşitli hastalıklara neden olur⁴⁶. Önceki çalışmalar ülserli mide dokusunda yüksek düzeyde MDA olduğunu göstermiştir⁴⁷.

Benzer şekilde yaptığımız deneylerde de indometazin grubunda MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre dört kat daha yüksek olduğu, omapatrilat uygulanan gruplarda ise yine doza bağlı olarak giderek azaldığı görüldü. SOD aktivitesinde olduğu gibi MDA düzeyleri de 40 mg/kg omapatrilat ve spesifik famotidin tedavisiyle istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. İndometazin ile oluşturulan ülser gruplarında SOD aktivitesinde ve GSH düzeylerinde azalma ve buna eşlik eden MDA düzeyinde artış gözlenen başka bir çalışmada da benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Bu değişiklikler, RAAS yolunu etkileyen bir renin inhibitörü olan aliskiren tedavisi nedeniyle tersine çevrilmiştir⁵. Bu bulgular aynı zamanda RAAS etkili bir ajan olan omapatrilatın antioksidan aktiviteyi teşvik ederek oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir. ACE ve neprilisin enzim aktivitelerine ilişkin bulgularımız yukarıda tartışılan oksidatif stres biyobelirteçlerine de benzerdi. Sağlıklı grubu ile karşılaştırıldığında indometazinin ACE ve neprilisin seviyelerini anlamlı derecede artırdığı, famotidin ile bu seviyelerin daha sonra sağlıklı seviyelere döndüğü görüldü. Ülserli farelerde omapatrilat uygulamasıyla, ACE ve neprilisin seviyelerinde 10 mg/kg'dan 40 mg/kg'a kadar omapatrilat dozajıyla orantılı benzer düşüşler kaydettik. Spesifik famotidin tedavisi ve 40 mg/kg omapatrilat ile elde edilen ACE ve neprilisin düzeylerinin her ikisi de, tedavi edilmemiş ülserli farelerde ölçülenlerden önemli ölçüde daha azdı, ancak yine de sağlıklı grubunda ölçülenlerin üzerindedi. Omapatrilat uygulaması sağlıklı farelerde ACE veya neprilisin düzeylerini değiştirmedi. Sonuç olarak omapatrilat ülser etiolojisinde anahtar rol oynayan Ang II üretimini engelleyerek ülser oluşumunu azalttı. Son çalışmalarda aliskiren ve enalapril gibi RAAS'ı etkileyen ilaçların antioksidan düzeylerini artırmada başarılı olduğu gösterilmiştir. Bu ilaçlar arasında hem NEP hem de ACE enzimlerini aynı anda inhibe ettiği bilinen ilk ilaç olan omapatrilat, yakın zamanda geliştirilen RAAS etkili bir ajandır¹⁰. Bu nedenle ACE/NEP yolunun indometazine bağlı mide ülseri üzerindeki olası etkilerini araştırdık ve ülser grubunda her iki enzimin düzeylerinde anlamlı artışlar gördük. ACE ve NEP

düzeylerindeki bu artış mide hasarına eşlik eden bir savunma mekanizması olarak yorumlanabilir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Deneysel çalışmanın sadece bir ülser modelinde çalışılmış olması ve dokuların histopatolojik olarak incelenememiş olması çalışmamızın kısıtlılıklarını oluşturmaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak, yaptığımız deneylerde omapatrilatın en iyi antiülser aktivitesini 40 mg/kg dozunda gösterdik. Makroskobik sonuçlarımız, oksidan/antioksidan düzeyleri ve biyokimyasal ölçümlerimiz, omapatrilatın 40 mg/kg dozajda hem neprilisin hem de ACE seviyelerini azaltarak sağlıklı grubunda ölçülenlere benzer anlamlı anti-ülser etkisi gösterdiğini göstermektedir. Bu bulgular, NEP ve ACE'nin omapatrilat tarafından ikili inhibisyonunun, indometazinle indüklenen mide ülseri ile ilişkili oksidatif stresi baskıladığını göstermektedir. Bu sonuçlar ilk kez mide ülserinde ACE ve NEP enzimlerinin birleşik rolünü ve omapatrilatın oksidatif strese karşı koruyucu etkilerini ortaya koymaktadır. Bu nedenle omapatrilatın ülser tedavisindeki koruyucu etkilerinin yeni tedavi stratejileri arayışına yol açabileceğini düşünüyoruz.

Teşekkür

Bu çalışma Kadir Giray ERKAYMAN'ın doktora tez çalışmasının bir parçasıdır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Tüm hayvan bakımı ve protokolleri Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (karar no: 157, tarih: 02.08.2018).

Hasta Onayı: Hayvan deneyidir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: K.G.E., E.Ç., Konsept: R.A.U., Z.B.A.M., A.B., Dizayn: R.A.U., Z.B.A.M., A.B., Veri Toplama veya İşleme: K.G.E., E.Y., Analiz veya Yorumlama: E.Y., A.B., E.Ç., Literatür Arama: K.G.E., Yazan: K.G.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep.* 2007;59:247-58.

- da Silva Pantoja P, Assrey AMS, Silva RO, Damasceno SRB, Mendonça VA, Mendes TS, et al. The polysaccharide-rich tea of *Ximenia americana* barks prevents indomethacin-induced gastrointestinal damage via neutrophil inhibition. *J Ethnopharmacol.* 2018;224:195-201.
- Polat B, Suleyman H, Alp HH. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chem Biol Interact.* 2010;186:82-9.
- Toktay E, Yayla M, Sahin L, Harmankaya A, Ozic C, Aksu Kilicle P, et al. The effects of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) extract on indomethacin-induced stomach ulcer in rats. *J Food Biochem.* 2022;46:14274.
- Halici Z, Polat B, Cadirci E, Topcu A, Karakus E, Kose D, et al. Inhibiting renin-angiotensin system in rate limiting step by aliskiren as a new approach for preventing indomethacin induced gastric ulcers. *Chem Biol Interact.* 2016;258:266-75.
- Pawlik MW, Kwiciecien S, Ptak-Belowska A, Pajdo R, Olszanecki R, Suski M, et al. The renin-angiotensin system and its vasoactive metabolite angiotensin-(1-7) in the mechanism of the healing of preexisting gastric ulcers. The involvement of Mas receptors, nitric oxide, prostaglandins and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol.* 2016;67:75-91.
- Aroor AR, Demarco VG, Jia G, Sun Z, Nistala R, Meiningner GA, et al. The role of tissue Renin-Angiotensin-aldosterone system in the development of endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:161.
- Sakuraya K, Endo A, Someya T, Hirano D, Murano Y, Fujinaga S, et al. The synergistic effect of mizoribine and a direct renin inhibitor, aliskiren, on unilateral ureteral obstruction induced renal fibrosis in rats. *J Urol.* 2014;191:1139-46.
- Zhu D, Tong Q, Liu W, Tian M, Xie W, Ji L, et al. Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats. *Biochem Pharmacol.* 2014;87:467-76.
- Aksakalli-Magden ZB, Ugan RA, Toktay E, Halici Z, Cadirci E. Potential role of angiotensin converting enzyme/neprilysin pathway and protective effects of omapatrilat for paracetamol induced acute liver injury. *Exp Ther Med.* 2022;12:25:66.
- Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens.* 2004;17:103-11.
- Hayek T, Hamoud S, Keidar S, Pavlotzky E, Coleman R, Aviram M, et al. Omapatrilat decreased macrophage oxidative status and atherosclerosis progression in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43:140-7.
- Ugan RA, Un H, Gurbuz MA, Kaya G, Kahramanlar A, Aksakalli-Magden ZB, et al. Possible contribution of the neprilysin/ACE pathway to sepsis in mice. *Life Sci.* 2020;258:118177.
- Quaschnig T, d'Uscio LV, Shaw S, Lüscher TF. Vasopeptidase inhibition exhibits endothelial protection in salt-induced hypertension. *Hypertension.* 2001;37:1108-13.
- Dong Y, Zhou H, Shaffer E, Atamas N, Liao WC, Wei C. The cardiovascular actions of omapatrilat in spontaneously hypertensive rats. *Curr Hypertens Rep.* 2001;3(Suppl 2):1-5.
- Taal MW, Nenov VD, Wong W, Satyal SR, Sakharova O, Choi JH, et al. Vasopeptidase inhibition affords greater renoprotection than angiotensin-converting enzyme inhibition alone. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:2051-9.
- Ugan RA, Un H, Gurbuz MA, Kaya G, Kahramanlar A, Aksakalli-Magden ZB, et al. Possible contribution of the neprilysin/ACE pathway to sepsis in mice. *Life Sci* 2020;258:118177.
- Lapointe N, Nguyen QT, Desjardins JF, Marcotte F, Pourdjabbar A, Moe G, et al. Effects of pre-, peri-, and postmyocardial infarction treatment with omapatrilat in rats: Survival, arrhythmias, ventricular function, and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:398-405.
- Ozbakiş-Dengiz G, Cadirci E, Yurdakan G. Histopathologic evaluation of anti-ulcerogenic effect of montelukast in indomethacin-induced experimental ulcer model. *Turk J Gastroenterol.* 2013;24:88-92.
- Kuruuzum-Uz A, Suleyman H, Cadirci E, Guvenalp Z, Demirezer LO. Investigation on anti-inflammatory and antiulcer activities of *Anchusa*

- azurea extracts and their major constituent rosmarinic acid. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2012;67:360-6.
21. Guidobono F, Pagani F, Ticozzi C, Sibilia V, Pecile A, Netti C. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacol.* 1997;120:581-6.
 22. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
 23. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34:497-500.
 24. Tatar A, Parlak SN, Yayla M, Ugan RA, Polat E, Halici Z. Effects of allergic rhinitis and desloratadine on the submandibular gland in a rat allergy model. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015;5:1164-9.
 25. Ugan RA, Cadirci E, Halici Z, Toktay E, Cinar I. The role of urotensin-II and its receptors in sepsis-induced lung injury under diabetic conditions. *Eur J Pharmacol.* 2018;818:457-69.
 26. Singh S, Khajuria A, Taneja SC, Khajuria RK, Singh J, Johri RK, et al. The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. *Phytomedicine.* 2008;15:408-15.
 27. Zamora Z, González R, Guanche D, Merino N, Menéndez S, Hernández F, et al. Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflamm Res.* 2008;57:39-43.
 28. Welch WJ. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2008;52:51-6.
 29. Heinemann A, Sattler V, Jocić M, Wiene W, Holzer P. Effect of angiotensin II and telmisartan, an angiotensin1 receptor antagonist, on rat gastric mucosal blood flow. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13:347-55.
 30. Pawlik MW, Sendur R, Biernat J, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW. Inhibition of the renin-angiotensin system protects gastric mucosa against ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology.* 2001;5:196. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(08\)80971-7/pdf](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(08)80971-7/pdf)
 31. Riaz AA, Wang Y, Schramm R, Sato T, Menger MD, Jeppsson B, et al. Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon. *FASEB J.* 2004;18:881-3.
 32. Petnehazy T, Cooper D, Stokes KY, Russell J, Wood KC, Granger DN. Angiotensin II type 1 receptors and the intestinal microvascular dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:1203-10.
 33. Ismail NM, Ibrahim IA, Hashim NB, Jaarin K. Effects of captopril on factors affecting gastric mucosal integrity in aspirin-induced gastric lesions in Sprague-Dawley rats. *Arch Med Sci.* 2013;9:1132-7.
 34. Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents gastric ulcers during cold-restraint stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1018:351-5.
 35. Nakagiri A, Sunamoto M, Murakami M. Angiotensin AT1 receptor blockers suppress ischemia/reperfusion-induced gastric injury in rats. *Inflammopharmacology.* 2007;15:171-4.
 36. Süleyman H, Akçay F, Altinkaynak K. The effect of nimesulide on the indomethacin- and ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol Res.* 2002;45:155-8.
 37. Kataoka H, Horie Y, Koyama R, Nakatsugi S, Furukawa M. Interaction between NSAIDs and steroid in rat stomach: safety of nimesulide as a preferential COX-2 inhibitor in the stomach. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1366-75.
 38. Ehrlich K, Plate S, Stroff T, Gretzer B, Respondek M, Peskar BM. Peptidergic and cholinergic neurons and mediators in peptone-induced gastroprotection: role of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol.* 1998;274:955-64.
 39. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(Suppl 5):33-55.
 40. Yasukawa K, Shigemi R, Kanbe T, Mutsumoto Y, Oda F, Ichikawa K, et al. In Vivo Imaging of the Intra- and Extracellular Redox Status in Rat Stomach with Indomethacin-Induced Gastric Ulcers Using Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30:1147-61.
 41. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
 42. Pardo-Hernández M, López-Delacalle M, Rivero RM. ROS and NO Regulation by Melatonin Under Abiotic Stress in Plants. *Antioxidants (Basel).* 2020;9:1078.
 43. Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum L.* (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol.* 2005;96:171-6.
 44. El-Missiry MA, El-Sayed IH, Othman AI. Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Ann Clin Biochem.* 2001;38:694-700.
 45. Talas DU, Nayci A, Polat G, Atis S, Comelekoglu U, Bagdatoglu OT, et al. The effects of dexamethasone on lipid peroxidation and nitric oxide levels on the healing of tracheal anastomoses: An experimental study in rats. *Pharmacol Res.* 2002;46:265-71.
 46. Archer SL, Peterson D, Nelson DP, DeMaster EG, Kelly B, Eaton JW, et al. Oxygen Radicals and Antioxidant Enzymes Alter Pulmonary Vascular Reactivity in the Rat Lung. *J Appl Physiol (1985).* 1989;66:102-11.
 47. Demircan B, Çelik G, Süleyman H, Akçay F. Effects of indomethacin, celecoxib and meloxicam on glutathione, malondialdehyde and myeloperoxidase in rat gastric tissue. *The Pain Clinic.* 2005;17:383-8.