

Deneyimizin ikinci aşamasında bir aylık 14 erkek Swiss albino sıçan kontrol ve deney grubu olmak üzere ayrıldılar. Kontrol ve deney gruplarına birinci aşamada olduğu gibi 4 hafta süreyle her gün serum fizyolojik ve vitamin B₆ intraperitoneal olarak enjekte edildi. 4. haftanın sonunda her iki grupta bulunan sıçanlara 2 saat süreyle hareketsizlik stresi uygulandı. akut stresi takiben hayvanlar dekapite edildi. daha sonra mideleri çıkartılarak 1. aşamada olduğu gibi mukozal bariyer ile ilgili parametrelerin ölçümü yapıldı. Ancak deneyin bu ikinci aşamasında akut stresi takiben hayvanlar hemen dekapite edilmek suretiyle feda edildikleri için bazal gastrik asit salgısı ölçülemedi. Her bir parametrenin ölçümünde kullanılan yöntemler ayrıntıları ile aşağıda açıklanmıştır.

Bazal gastrik asit sekresyonu :

Hafif eter anestezisi altında, 30 dakika süreyle bazal koşullarda her bir sıçan midesinin salgıladığı H⁺ iyon konsantrasyonunu ölçmek için alınan mide suyu örneklerine 2 damla Töpfer ayrıca konuldu. Daha sonra 0.01 N NaOH ile titre edildi. Tüketilen baz miktarı esas alınarak sonuçlar mEq/saat şeklinde hesaplandı.

Müküs miktarının tayini :

Mide mukozal bariyerinin müküs (asit mukopoliskaritler). Corne ve arkadaşlarının yöntemine göre ölçüldü (15). Yöntemin ayrıntıları aşağıda belirtilmiştir.

Gerekli reaktifler :

1- 0.05 M sodyum asetat

0.16 M sükröz

İçeren solüsyon hazırlanır. Bu solüsyonun pH'sı 5.8 olacak şekilde HCl ile ayarlanır. Bu solüsyon içine % 0.1'lik olacak şekilde Alcian blue konur.

2- 0.25 M sükroz

3- 0.5 M $MgCl_2$

4- Dietyl eter

Deneyin yapılışı : Deneye başlamadan önce küçük beherler içine 10 ml Alcian blue içeren tampon çözelti konuldu ve $37^{\circ}C$ deki su banyosuna yerleştirildi. Mide tartıldıktan sonra ters çevrilerek Alcian blue çözeltisi içine konuldu. 2 saat süre ile $37^{\circ}C$ de su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonun 15. ve 45. dakikalarında mide Alcian blue çözeltisinden çıkartılıp 0.25 M sükroz ile yıkanıp tekrar inkübasyona devam edildi (aynı Alcian blue çözeltisi içinde). 2 saatlik inkübasyonun sonunda 0.25 M sükroz ile mide yıkanarak 10 ml 0.5 M $MgCl_2$ çözeltisi içine konuldu. $37^{\circ}C$ de tekrar 2 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda $MgCl_2$ 'e geçen mavi rengi tespit edebilmek için, 5 ml $MgCl_2$ (içinde midenin inkübe edildiği) 5 ml dietyl eter ile karıştırılır. Su fazı (altaki mavi renkli faz) alınıp, 605 nm'de $MgCl_2$ çözeltisine karşı absorbansı ölçüldü. 1mg/ml Alcian blue solüsyonu standart olarak, $MgCl_2$ çözeltisi kör olarak kullanıldı.

Hesaplama : Deney öncesinde tartılan midenin ağırlığını Y gr olarak kabul edersek;

$$(müküs miktarı) h = \frac{\text{Numunenin optik dansitesi} \times 100}{\text{standartın optik dansitesi}(100 \text{ mg/ml'lik std})}$$

Y gr midede X gr müküs varsa

1 gr midede X

$$\frac{X}{Y} = \frac{1 \rightarrow X}{Y} \text{ (sonuç mg/gr olarak bulunmuş olur).}$$

Mukozal kazıntıdan lipidlerin elde edilmesi :

Bu deney için Rose ve Oklander'in yöntemi kullanıldı (60).500 milligram mukozal kazıntıya 18 ml ekstraksiyon karışımı (11 hacim izopropil alkol, 7 hacim hekzan) konularak vortekslendi. 2000 r-p-m' de beş dakika santrifüj edildi. Üsteki lipid fazı pastör pipeti ile aspire edilerek bir başka tüpe aktarıldı. Alta kalan fazın üzerine tekrar 2 ml ekstraksiyon karışımı konuldu ve Vortekslendi. Santrifüj- lemeden sonra üst faz alındı ve bir önceki tüpe ilave edildi. Bu iş- lem iki kez tekrarlandı. Ekstrakte edilen materyal tamamen uçuruldu. Daha sonra üzerine 1 ml izopropil alkol konuldu ve vortakslendi. Böy- lece lipid ekstraktları elde edildi.

Fosfolipid tayini :

Mide mukoza ekstraktlarında fosfolipid miktarı Baur ve arkadaş- larının yöntemi ile belirlendi (8).

Prensip : Fosfolipidler organik Solvent ile ekstrakte edilir. Ekstrakt uçurtularak kurtulur. Ca^{++} içeren nitrik asit ile organik materyal sindirilir (kalsiyum piro fosfat oluşumunu ve fosfor kaybı- nı önler). Nitrik asit ısıtılarak tamamen uçurulur. Geride kalan ma- teryal T CA askorbik asit karışımı ile eritilir. Fosfat ile mavi renk oluşması için molibdat ve arsenit eklenir.

Reaktifler :

1- Standart fosfat çözeltisi; KH_2PO_4 100°C 'de kurutuldu. 438.1 mg distile suda eritildi ve 100 ml'ye tamamlandı. 1 mg/ml fosfat içeren bu çözeltiden 5 ml alındı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Böylece 0.05 mg/ml fosfor içeren çalışma standardı hazırlanmış oldu.

2- Askorbik asit-TCA; 10 gr triklor asetik asit ve 2 gr askorbik distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3- % 1 Amonyum molibdat; 1 gr amonyum molibdat distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4- Arsenit-sitrat çözeltisi = 20 gr trisodyum sitrat ve 20 gr susuz sodyum arsenit distile suda eritildi. 20 ml glasiyal asetik asit eklendi ve su ile 1 litreye tamamlandı.

5- Ekstraksiyon karışımı; 3 hacim absolü alkol ile 1 hacim eter karıştırıldı.

6- Nitrik asit-kalsiyum çözeltisi; 30 mg kalsiyum karbonat 1 litre konsantre nitrik asid içinde eritildi.

7- Antibombing granül; cam granüler nitrik asit içinde kaynatıldı ve distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanıldı.

Deneyin yapılışı : Her tüpe bir kaç cam granülü bırakıldı. Fosfolipid tüplerine mukozal kazıntının bulunduğu tüpten 0.2 ml ekstrakt konuldu. Daha sonra bu tüplere 1 ml nitrik asit ilave edildi ve ateşte hiç nitrik asit dumanı kalmayacak şekilde uçuruldu ve soğutuldu. Her tüpe 1 ml 2 nolu reaktif, 0.5 ml 3 nolu reaktif, 1 ml'de 4 nolu reaktif konuldu ve karıştırıldı. 15 dakika bekledikten sonra köre karşı 700 nm'de spektrofotometrede okunarak absorbanları ölçüldü.

Aşağıdaki formülden fosfolipid miktarı hesaplandı.

$$\text{Fosfolipid(mg/dl)} = \frac{\text{Örnek Absorbans}}{\text{Standard Absorbans}} = \text{standard konstx dillüsyon faktörü}$$

Kolesterol tayini :

Mukozal kazıntıdaki kolesterol miktarı Zak yönteminden yararlanmak suretiyle ölçüldü. Yöntemin uygulanışı ve ayrıntıları aşağıda belirtilmiştir (6,75).

Gerekli reaktifler:

1- Derişik sülfürik asit

2- Derişik glasiyal asetik asit

3- Demir,III klorür reaktifi: 140 MgFeCl₃, 6H₂O tartıldı,glasiyal asetik asitte çözümlenerek hacim 100 ml'ye tamamlandı. Koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklandı.

4- Kolesterol standardı: 200 mg kristalize saf kolesterol 100 ml'lik balona konuldu. Propil alkol ile çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı : Her tüpe mukozal kazıntılardan elde edilen lipid ekstraktlarından 0.2 ml konuldu. Bunların üzerine 2 ml FeCl₃ reaktifi ilave edildi. Daha sonra her tüpe 2 ml sülfürik asit konuldu ve çalkalandı. 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra köre karşı 560 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen değerler formüle uygulandı.

$$\text{Örnekteki kolesterol konst} = \frac{\text{Standard Konst.}}{\text{Stand.Opt.danst}} \times \text{öm.Opt.danstx dillüsyon faktörü.}$$

Elde edilen ve hesaplanan bütün sonuçların değerlendirilmesinde Student'un "t" testinden yararlanıldı.