

**RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN GASTRİK
HASARLAR ÜZERİNE ALFA-LİPOİK ASİDİN
GASTROPROTEKTİF ETKİLERİNİN VE BU ETKİLERİN
ANTİOKSİDANT SİSTEM İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Kürşat Ali KAPLAN

**Yüksek Lisans Tezi
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU
2009**

Her hakkı saklıdır

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN GASTRİK HASARLAR
ÜZERİNE ALFA-LİPOİK ASİDİN GASTROPROTEKTİF ETKİLERİNİN VE
BU ETKİLERİN ANTİOKSİDANT SİSTEM İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Kürşat Ali KAPLAN

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2009**

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN GASTRİK HASARLAR
ÜZERİNE ALFA-LİPOİK ASİDİN GASTROPROTEKTİF ETKİLERİNİN VE
BU ETKİLERİN ANTİOKSİDANT SİSTEM İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Kürşat Ali KAPLAN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16/10/2009
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 22/10/2009

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Jüri üyesi : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYOĞLU

Jüri üyesi : Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN

Jüri üyesi : Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Jüri üyesi : Yrd. Doç. Dr. Mesut HALICI

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2009

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	I
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Mide Ülseri	6
2.2. Antioksidantlar	14
2.2.1. Serbest radikaller	14
2.2.2. Serbest radikal çeşitleri	16
2.2.3. Serbest radikal kaynakları	22
2.2.4. Serbest radikallerin etkileri	26
2.2.5. Antioksidant savunma sistemleri	30
2.2.5.1. Endojen (Doğal) antioksidantlar	31
2.2.5.2. Ekzojen antioksidantlar	40
2.2.5.3. Gıda antioksidantları	41
2.2.6. Antioksidant etki tipleri	41
2.3. Alfa Lipoik Asit	42
2.3.1. Alfa Lipoik Asit'in Kimyasal Özellikleri	42
2.3.2. Alfa Lipoik Asit'in Başlıca Görevleri	45
2.3.3. Alfa Lipoik Asit'in Klinik Kullanım Alanları	45
2.3.4. Alfa Lipoik Asit'in Klinik Kullanım Dozajı	53
2.3.5. Alfa Lipoik Asit'in Doğal Kaynakları	53
3. MATERYAL ve METOD	54
3.1. DeneYlerde kullanılan kimyasallar	54
3.2. DeneYlerde kullanılan cihazlar	54
3.3. DeneYlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	55
3.4. DeneY Hayvanları	57

3.5. İndometazin (IND) ile Ratlarda Ülserin Oluşturulması ve Alfa Lipoik Asit (ALA), Ranitidin (RAN) ve Lansoprazol LAN)'ın Uygulanması....	58
3.6. Mide Dokusunun Makroskopik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi	60
3.6.1. Mide Dokusunun Makroskopik İncelenmesi	60
3.6.2. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi	60
3.6.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	60
3.6.2.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü	61
3.6.2.3. Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü	62
3.6.2.4. Glutasyon s-transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü	63
3.6.2.5. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü	64
3.6.2.6. Total glutasyon (GSH) miktarı ölçümü	65
3.6.2.7. Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü	66
3.7. İstatiksel Analizler	67
4. BULGULAR	68
4.1. İndometazin ile Oluşturulan Ülser Nodeli Üzerine Deneysel Bulgular ..	68
4.2. Biyokimyasal Bulgular	71
4.2.1. SOD aktivitesi üzerine alfa lipoik asit (ALA)'ın etkileri	71
4.2.2. CAT aktivitesi üzerine alfa lipoik asit (ALA)'ın etkileri	73
4.2.3. GST aktivitesi üzerine alfa lipoik asit(ALA)'ın etkileri	75
4.2.4. MPO aktivitesi üzerine alfa lipoik asit(ALA)'ın etkileri	77
4.2.5. GSH aktivitesi üzerine alfa lipoik asit(ALA)'ın etkileri	79
4.2.6. LPO miktarı üzerine alfa lipoik asit(ALA)'ın etkileri	81
5. TARTIŞMA	83
6. KAYNAKLAR	94

TEŞEKKÜR

Bilimin yanı sıra, hayata ve insana olan bakış açımı değiştiren, asla paha biçemeyeceğim mesleki etik değerleri kazanmamı sağlayan, beni eğiten, ihtiyaç duyduğum her anda şefkat, alaka ve maddi-manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emeği bulunan kıymetli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU'na teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında hayvanlarla çalışmanın lezzetini tattırdığı, engin bir deniz olan bilim dünyasında insan sağlığı için çalışmanın ne derece meşakkatli ve bir o kadar da keyifli olduğunu bana öğrettiği ve her türlü desteği fazlasıyla verdiği için kıymetli hocalarım; Sayın Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Zekai HALICI'ya,

Başkanı olduğu Farmakoloji Anabilim Dalı'nın kapılarını sonuna kadar açtığı ve çalışmalarımı desteklediği için Sayın Prof. Dr. Fatma GÖÇER ile yardım ve alakalarını hiç eksik etmeyen tüm Farmakoloji Anabilim Dalı ekibine,

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde gerçekleştirilen bu çalışmanın ortaya çıkmasında desteklerini esirgemeyen dekanlarımız sayın Prof. Dr. Yunus KARA ve Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Temel Bilimler Bölüm Başkanımız sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU ve onların nezdinde tüm Eczacılık Fakültesi personeline,

Aynı laboratuvarında çalışmaktan onur duyduğum ve her türlü yardımlarını gördüğüm, sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut HALICI'ya ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı elemanlarına,

Son olarak aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Kürşat Ali KAPLAN

Ekim-2009

ŞEKİLLER LİSTESİ		Sayfa No :
Şekil 1.	Midenin yerleşimi ve ülserli midenin görünümü	7
Şekil 2.	ROS'ler ile vücut savunmaları arasındaki denge bozulmamalıdır	14
Şekil 3.	Antioksidant sistem	31
Şekil 4.	Glutasyon'un molekül yapısı	37
Şekil 5.	Lipoik asit (a) ve onun indirgenmiş formu-dihidrolipoik asit (b)	43
Şekil 6.	Araştırmada kullanılan Wistar ratları gösteren fotoğraflar	58
Şekil 7.	GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	66
Şekil 8.	LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	67
Şekil 9.	İndometazin (IND) uygulaması sonrasında sağlıklı ve muamele grubu sıçanlara ait mide dokularının makroskopik görünümü	69
Şekil 10.	Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun IND tarafından rat midelerinde oluşturulan ülserler üzerine etkilerini gösteren diyagram	70
Şekil 11.	Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	72
Şekil 12.	Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	74
Şekil 13.	Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutasyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	76
Şekil 14.	Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	78
Şekil 15.	Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutasyon (GSH) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram	80
Şekil 16.	Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipid peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram	82

TABLOLAR LİSTESİ	Sayfa No:
Tablo 1. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün rat midelerinde deneysel olarak indometazin (IND) ile oluşturulan ülserler üzerine etkileri	70
Tablo 2. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkileri	72
Tablo 3. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri	74
Tablo 4. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkileri	76
Tablo 5. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri üzerine etkileri	78
Tablo 6. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutatyon (GSH) miktarları üzerine etkileri	80
Tablo 7. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipit peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkileri	82

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT	: Katalaz
CCl ₄	: Karbontetraklorür
CCl ₃	: Triklorometil
COX	: Siklooksijenaz enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GAE	: Gallik Asit eşdeğeri
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HSV	: Herpes simplex virüs
HO·	: Hidroksil Radikali
HO ₂ ⁻	: Peroksil
IND	: İndometazin
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MPx	: Miyeloperoksidaz
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NO·	: Nitrik oksit
NO ⁺	: Nitronyum iyonu
NO ₂ ⁻	: Azot protoksit
NSAID	: Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar
NBT	: Nitro blue tetrazolium
O ₂ ^{·-}	: Süperoksit radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
PGE	: Prostaglandin
PMN	: Polimorfo nükleer
PUFA	: Polidoymamış yağ asiti
RAN	: Ranitidin
RNA	: Ribo nükleik asit
RO·	: Alkoksil radikalleri
ROO·	: Peroksil radikalleri
ROS	: Reaktif Oksijen türleri
RSO·	: Sülfenil radikali
RSO ₂ ·	: Tiyol peroksil radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAA	: Total antioksidan aktivite
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TFB	: Toplam fenolik bileşikler
WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı

'Ratlarda İndometazin ile Oluşturulan Gastrik Hasarlar Üzerine Alfa Lipoik Asidin Gastroprotektif Etkilerinin ve Bu Etkilerin Antioksidant Sistem ile İlişkisinin Belirlenmesi'

ÖZET: Bu çalışmada, alfa lipoik asit (ALA)'ın ratlarda indometazin (IND) ile oluşturulan ülser modelindeki koruyucu etkisi (*in vivo*) araştırıldı. Her bir deney grubu 6'şar rattan oluşturuldu. 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozlarda ALA, 50 mg/kg dozda ranitidin (RAN, pozitif kontrol), 30 mg/kg lansoprazol (LAN, pozitif kontrol), yalnızca musluk suyu (sağlıklı kontrol) ve 25 mg/kg dozda IND (negatif kontrol) oral yolla verildi.

IND ile muamele edilen grupta meydana gelen ülserin, uygulanan ALA'nın bütün dozlarının önemli oranda ülser oluşumunu azalttığı ($p<0.05$) belirlendi. Diğer yandan, antioksidant savunma sistemlerinin ülser gelişimindeki rolünün belirlenmesi amacıyla, rat mide dokularında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST) ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi antioksidan enzimlerinin aktiviteleri ile total glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) miktarları belirlendi. Bulgular, kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. IND uygulanan dokularda SOD ve GST enzim aktiviteleriyle GSH miktarı azalırken, MPO, CAT aktiviteleri ile LPO miktarının arttığı tespit edildi.

Elde edilen sonuçlar, IND'nin antioksidan savunma sistemini olumsuz etkileyerek ülser oluşumuna katkı sağladığını ve gastrik hasar oluşumunda serbest radikallerin üretildiğini göstermektedir. ALA, RAN ve LAN ile muamele edilmiş dokularda, IND'nin aksine antioksidan savunma sisteminin olumlu yönde etkilendiği ve gastrik mukozada üretilen reaktif oksijen (ROS) radikallerinin ülser oluşumundaki olumsuz etkilerinin azaltıldığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İndometazin, antioksidant, anti-ülserojenik aktivite, alfa lipoik asit.

‘Determination of Gastroprotective Effects Alpha Lipoic Acid and the Relation of These Effects of with Antioxidant System on Indomethacin-Induced Gastric Damage in Rats’

SUMMARY: In this study, the gastro-protective effect of alpha lipoic acid (ALA) in indomethacin (IND) induced ulcer model in rats was investigated, *in vivo*. Each of the experimental groups consisted from 6 rats. ALA at 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg doses, ranitidine (RAN, positive control) at 50 mg/kg, lansoprazol (LAN, positive control) at 30 mg/kg dose, water (healthy, control) and IND (negative control) at 25 mg/kg dose administrated per orally.

It is determined that ulcers occurred in IND administrated tissues were decreased significantly by all doses of ALA ($p < 0.05$). In order to discuss the role of antioxidant defence systems on ulcer progress, activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutation-*s*-transferase (GST) and myeloperoxidase (MPO) and total glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO) amounts were determined in rat stomach tissues. Results appreciated by comparing with controls. In IND administrated tissues, increased CAT, MPO activities and LPO amount in contrast to decreased activities of SOD and GST and amount of GSH amount were fixed.

These results suggested that free radicals are produced in the gastric mucosal damage and IND also effects negatively to the antioxidant defence systems that contribute ulcer formation. ALA, RAN, LAN administrated- tissues, antioxidant defence system was affected affirmative in contrast to IND-administrated tissues, and negative effects of reactive oxygen (ROS) radicals, produced in gastric mucosa were reduced.

Keywords: Indomethacin, antioxidant, anti-ulcerogenic activity, alpha lipoic acid.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ülser; mide ve duadenunumun multifaktöriyel bir hastalığıdır. Hastalığı meydana getiren faktörler asit sekresyonu ve koruyucu mukoza bariyerindeki bozukluklara ilave olarak genetik yatkınlık (irsiyet), stres, kortizon türü ilaçlar, sigara, alkol, aspirin ve indometazin gibi NSAİD (Non steroid antiinflamatuvar ilaçlar)'ler, *Helicobacter pylori* ve Herpes Simplex Virüsü (Tip I / HSV-1)'dür¹.

Ülseri meydana getiren önemli sebeplerden biri düzenli NSAİD kullanımınıdır. NSAİD'lerin ülser yapıcı etkileri, inflamatuvar bozukluklardaki kullanımlarının en büyük dezavantajı olmaya devam etmektedir. İndometazin uyarımlı ülser oluşumu temel olarak COX inhibisyonu ile ilişkilidir ve COX inhibisyonunun da prostaglandin biyosentezini baskılayarak gastrointestinal hasara karşı bir savunma faktörü olan mukus oluşumunu engellediği rapor edilmiş olmasına rağmen²⁻⁴, indometazin uyarımlı mide ülserlerinin oluşum mekanizması ayrıntılı olarak henüz tam olarak aydınlanmamış olup bu konuda alternatif sebepler üzerine tartışmalar hala devam etmektedir. Prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışının azalması, topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi indometazin uyarımlı mide ülserlerinin sebeplerinden bazılarıdır⁵⁻⁹. İndometazin gibi NSAİD'ler tarafından uyarılan akut gastrik deneysel lezyonlarda oksijen kaynaklı serbest radikallerin (ROS) de önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar yayımlanmıştır¹⁰⁻²⁷.

Bu çalışmalarda önemli miktarlarda üretilen oksijen metabolitlerinin ise dokuyu dejenere ederek ülsera sebep oldukları bildirilmiştir²⁸⁻³⁴. Diğer birçok doku hasarı gibi gastrik ülser de süperoksit anyonlarının oluşumuyla ilgilidir. Ayrıca gastrik mukozadaki ülserin tedavisinde antioksidan enzimlerin koruyucu etkilerine ve karşılıklı olarak bu enzimlerin birbirlerini etkilemelerine de dikkat çekilmiştir^{17-27, 35-50}.

Canlı dokulardaki hücreler ROS hasarlarını önleyebilecek veya tamir edebilecek pek çok savunma mekanizmasına sahiptir. ROS'un tahribatları, primer olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler ve sekonder olarak da antioksidan vitaminler, glutatyon (GSH), birçok makro ve mikro moleküller tarafından azaltılır^{17-27, 51-55}.

Şayet süperoksit ($O^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS üyeleri aşırı üretilirse, membran lipitlerinin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve ekstraselüler matriks glikozaminoglikanlarının zarar görmesine bağlı olarak doku hasarı prosesi başlayabilir. Gastrik ülser oluşumunu tetikleyen mekanizmalardan birisinin de bu mekanizma olabileceği pek çok araştırmacı tarafından öne sürülmüştür^{10-27,37,43,48}. Serbest radikalleri etkisizleştiren sekonder moleküllerden biri olan GSH, gastro intestinal dokuları makro molekül içeren lipitlerin oksidatif hasarlarından korumada önemli görev üstlenmiştir^{12,15,48,56-58}.

Bu gün bilinen pek çok etken maddenin indometazin ile uyarılan gastrik hasar üzerine pozitif etkileri gösterilmiştir^{12, 39-41, 44,47, 48,59-66}.

Mevcut araştırmada çalışılan alfa lipoik asit (ALA)'ın biyokimyasal proseslerdeki rolü dikkate alınarak, başlangıçta vitamin B komplekslerine dahil edilmiştir. Bununla birlikte şimdilerde araştırmacıların çoğu ALA'nın bir vitamin olmadığına inanmaktadır. Sülfürün kaynağı olan sistein ve oktanoik asit ALA'nın direkt prokürsör (başlangıç molekülü)'ü dürler ve bakteri ve bitkilerdekine benzer olarak insan ve hayvanlardaki mitokondrilerde sentezlendiği farz edilmektedir⁶¹.

ALA'nın moleküler özelliklerine ilaveten son yıllarda onun antioksidant özelliklerinin de keşfedilmiş olması bu moleküle bilim adamlarının ilgisini artırmış ve

ilerleyen araştırmaların ALA'nın doğrudan reaktif oksijen sınıfları (ROS) ve onların sebep oldukları metabolik hastalıklar üzerine etkilerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. ALA'nın hücre içi ROS'ların pek çoğunun radikalik etkisini süpürerek oksidatif stresle savaştığı pek çok çalışma ile de gsterilmiřtir⁶¹⁻⁶⁵. ROS'lerin radikalik etkilerinin süpürölerek ortadan kaldırılması bir tarafa vitamin C, vitamin E ve glutatyon (GSH) gibi diğer hücre sel antioksidantların rejenere edilerek yeniden kullanılabilir forma getirilmesini de ALA'nın sağladığı belirlenmiştir^{66,67}.

Son 50 yılda ALA'nın farmakolojik özelliklerine ilişkin araştırmalarda enteresan bir yükselişe tanık oluyoruz⁶⁸⁻⁷⁷. Diabet, ateroskleroz, nöronlardaki dejeneratif prosesler, eklem hastalıkları ve AIDS gibi pek çok hastalığın tedavisinde lipoik asidin faydalı etkilerini doğrulayan yayınların sayısında çok büyük bir artış vardır. Çağdaş tıbbın bu moleküle merakı aslında lipoik asidin redüktif (indirgeme) gücünden kaynaklanmaktadır. Lipoat/dihidrolipoat sisteminin düşük redoks potansiyelinden dolayı diğer antioksidantların okside formlarının redüksiyonunda olduğu gibi ROS'leri nötrleştiren reaksiyonlara oldukça etkili bir şekilde katılır. Antioksidantlar arasında yağda olduğu gibi suda da çok iyi bir şekilde çözünebilen yegâne molekül ALA'dır⁷⁸. Bu yüzden ALA antioksidantların antioksidantı olarak adlandırılır⁶⁸.

Literatürlerde ALA'nın görevleri arasında: Koenzim (bütün hücrelerde enerji elde etmek için başlıca yol olan glukoz oksidasyonunun en önemli enzimlerinden birisi olan piruvat dehidrogenaz enzim kompleksinin (PDEC) aktivitesi için), antioksidant (hücrelerde hasar yapan ROS'lerin etkisizleştirilmesi için), moleküler rejenerasyon (hücre içi ve hücre dışında görev yapan diğer antioksidantların rejenere (yenilenme) edilmesi için) ve moleküler kelasyon (kadmium, arsenik, mangan, bakır, çinko ve civa gibi metallere birleşerek (kelasyon) onların dokularda toksik etki göstermelerini

engellemek için) sayılmıştır⁷⁹⁻⁸². Bu moleküler yeteneklerini kullanarak geliştirilen çok sayıda araştırmalarda ALA'nın pozitif etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmaların bir bölümü 'Genel Bilgiler' başlığı altında ayrıntılı olarak verileceği için burada öz bilgi vermekle yetineceğiz.

ALA'nın pozitif etkileri:

*Diyabet ve diyabetik nöropatiler⁸³⁻⁹⁹.

*Nörolojik Hastalıklar¹⁰⁰⁻¹¹².

*AIDS Hastalığı^{62,113}.

*Zararlı Işınlardan Korunma Hastalıkları¹¹⁴⁻¹¹⁷.

*Apoptozis ve Kanser¹¹⁸⁻¹³².

*Diğer Hastalıklar:

-ALA'nın hepatik koma ve hepatit tedavisinde etkili olduğu bildirilmiş ve akut alkol zehirlenmesi esnasında ALA verilmesi tavsiye edilmiştir¹³³.

-RNA polimeraz II'yi inhibe ederek ve mRNA sentezini bloklayıp zehirlenmeye yol açan α - ve β - amanitin isimli iki mantar metabolitinin neden olduğu zehirlenmelerde ALA başarı ile kullanılmıştır¹³⁴⁻¹³⁶.

-Hipertansiyon üzerine ALA'nın pozitif etkileri gösterilmiştir^{137,138}.

-Eklem hastalığının iyileştirilmesi oksidatif strese azalma, enflamatuvar sitokin aktivasyonunun ve NF-KB DNA bağlama aktivitesinin inhibisyonu ile ilişkili olduğunu kaydeden bir çalışmada ALA'nın in vivo (canlıda) kemik yapı bozulmalarını ve in vitro (deney ortamında-canlı dışında) olarak da osteoklastogenezi engellediği sonuç olarak ALA'nın romatoid artrit için yeni ilave bir terapi olabileceğine işaret edilmiştir¹³⁹⁻¹⁴¹.

-Yaşlılıkla ilgili hastalıkların azaltılması ve egzersizin olumsuzlukları üzerine ALA'nın etkilerine dair yapılan ön çalışmalar umut vericidir⁶².

-Diğer yandan fakültemiz bünyesinde araştırmalarına devam eden ekibimizin yayın aşamasına getirdikleri son araştırmalarında enflamasyonu engellendiğinin belirlendiği çalışmaların büyük bölümü gerçekleştirilmiş ve neredeyse yayın aşamasına gelinmiştir^{142,143}. Ayrıca ekibimizin gerçekleştirdiği farklı bir projede de ALA'nın deneysel sepsis sonrası oluşturulan akciğer hasarı üzerine olumlu etkileri çok önemli bir dergide yayınlanmak üzere¹⁴⁴.

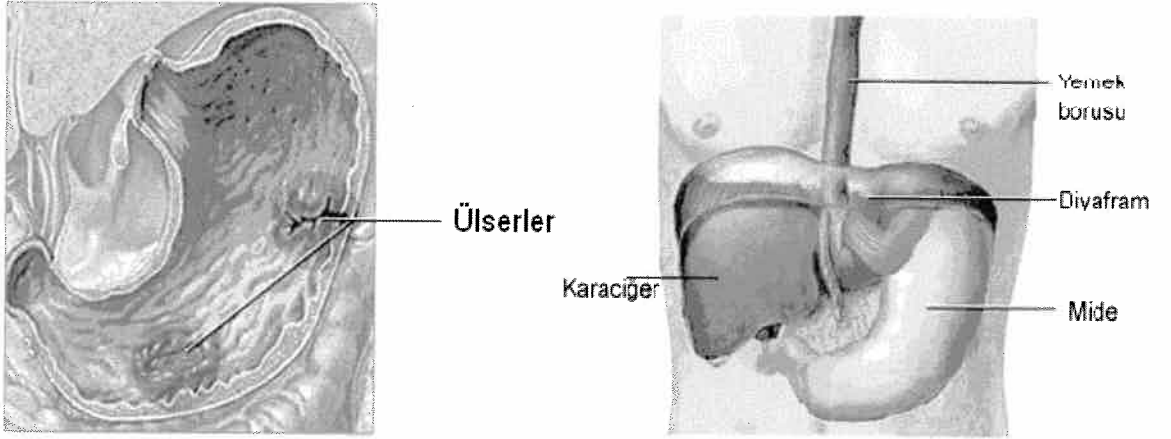
Yapılan literatür taramalarında ALA'nın antiülserojenik etkisine dair çalışmalara rastlayamadık. Bu yüzden araştırmamız bu önemli molekülün mükemmel özelliklerine bir yenisinin eklenmesi açısından önemli kabul edilebilir. Mevcut araştırmada ALA'nın antiülserojenik aktivitesinin olup olmadığı sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modeli kullanarak belirlenmeye çalışılmış ve sıçan mide dokularındaki antioksidant sistemin çeşitli parametreleri (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon *s*-transferaz, miyeloperoksidaz gibi enzimler ile glutatyon ve lipit peroksidasyon düzeyleri) üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide Ülseri

Mide diyaframın (göğüsle karın boşluğunu birbirinden ayıran kas bölme) altında, epigastrik (mide hizasındaki karın duvarına ait), umbilikal (göbeğe ait) ve sol hipokondriak (lokmaaltı) bölgede yer alan sindirim sisteminin en geniş bölümüdür (Şekil 1). Midenin belirli bir şekli yoktur. Ancak içerisi orta derecede dolu olan ve iki ucundan tutulmuş sarkık bir torbaya benzetilebilir. Midenin iç hacmi yaşa göre değişir. Yeni doğanda 30 cm³, pubertede 1000 cm³ ve erişkinde 1500 cm³ kadardır¹⁴⁵. Mide fizyolojik olarak, besinlerin sindiriminde önemli rol oynayan ve sindirim enzimleri, hormonlar, hidroklorik asit, B12 vitamininin ince bağırsağın son kısmından emilmesi için varlığı şart olan intrensik faktör gibi salgıları yapan, hem ekzokrin (salgılarını kanallar aracılığıyla vücut boşluklarına veya dışarı salan bez sistemleri) hem de endokrin (salgılarını bir kanal sistemi olmaksızın doğrudan kan akımına veren bez sistemi) bir organdır. Anatomik olarak beş kısımda incelenmesine rağmen histolojik olarak *kardia*, *fundus*, *korpus* ve *pilor* olmak üzere dört kısımda incelenir. Bununla birlikte *fundus* ve *korpus* mikroskobik yapı olarak aynı olduğundan histolojik olarak sadece üç bölge ayırt edilebilir. Mide histolojik olarak içten dışa doğru *tunika mukoza*, *tunika submukoza*, *tunika muskularis* ve *tunika seroza* olmak üzere 4 tabakadan meydana gelir¹⁴⁶.

Kardia bölümü: Midenin en proksimali (bir organizmanın orta eksenine ya da organizmanın herhangi bir parçasının bir bağlantı noktasına göre yakın olan bölgesi) olan 2-3 cm genişliğindeki bölümüdür.



Şekil 1. Midenin yerleşimi ve ülserli midenin görünümü.

Fundus bölümü: Midenin kardia düzeyinin üzerinde kalan kubbe şeklindeki bölümüdür.

Korpus bölümü: Midenin orta bölümü olup fundus ile antrum arasındaki yerdir.

Antrum ve pilor: Midenin korpustan sonraki antrum ve pilorik kanalın olduğu bölümdür. Pilor kanalının sonunda bulunan pilorik sfinkter, mide içeriğinin duodenuma geçişini kontrol eder.

Midenin üç temel fonksiyonu vardır:

- Depolama: Besin maddeleri sindirilmek üzere geçici bir süre depolanır. Yeni doğanda 30 ml hacme sahip iken, yetişkinde normal şartlardaki hacmi 1–1,5 litredir. Gerekliğinde 2–3 litre besin depolayabilir.
- Alınan besinleri mide ile karıştırarak yarı sıvı, yarı katı şeklindeki kimüs haline getirir.
- Kimüsün ince bağırsaklara geçişini kontrol eder.

Midede sindirim ve kimüs oluşumu, mide salgısı ile sağlanır. 24 saatte 2–3 litre mide özsuyu salgılanır. Bu salgı içinde pepsin, HCl, intrinsik faktör, mukus ve su bulunur. Mide cerrahi anatomi açısından, proksimal (organın gövdeye bağlanma noktasına

yakın kısmı) mide cerrahi bölümü ve distal (organizmada ya da bir yapının bağlanma yerinden uzakta olan herhangi bir bölgesi) mide cerrahi bölümü olarak iki ana bölümden oluşur. Midenin ön duvarı ve arka duvarı uzun eksen boyunca sağ ve solda birer eğrilikle birleşmişlerdir. Sağ taraftaki konkav eğriliğe kurvatura minör, sol taraftaki konveks eğriliğe kurvatura majör denir. Midenin küçük kurvaturü kardias ile pilor arasında ve diyaframın sağ krusunun çapraz yapan lifleri önünde uzanır. Büyük kurvatur üstte gastrointestinal ligaman, altta omentum majus ile bağlantılıdır. Omentum majusun iki yaprağı arasında sağ ve sol gastroepiploik damarlar bulunur^{147,148}. Torba şeklinde olduğundan şekli; doluluk derecesine, kasının kasılma durumuna (tonus), solucanvari hareketlerine, vücut yapısına, ayakta ya da yatar vaziyette oluşuna, komşu organların durumuna göre değişir. Mide boş iken yukarıya ve aşağıya, dolu iken arkaya ve öne bakar. Bu nedenle yüzlere anterosuperior ve anteroinferior yüzler denir^{147,148}.

Mide direkt olarak dış ortamla ilişkisi olan birkaç organdan biridir. Dışardan oral olarak aldığımız tüm besin ve kimyasal maddelerin ilk temas ettiği organ midedir. Bu nedenle gastrointestinal sistemin en önemli organlarından olan midede birçok koruma mekanizması bulunmakla beraber birçok fizyopatolojik olayın da gelişmesi olasıdır. Ayrıca gastrointestinal sistem direkt olarak otonom sistemle kontrol edildiği için sinirsel veya emosyonel tüm değişiklikler öncelikle mideyi etkileyecektir. Tüm bu nedenlerden dolayı mideyi etkileyen birçok sistemik hastalık bulunmakla beraber en sık karşımıza mide ülseri çıkmaktadır. Mide ve duodenumu etkileyen patolojilerin etyolojisi farklı olmakla beraber sonuç olarak enflamasyon meydana gelmekte ve bunun sonucunda ise peptik ülser oluşmaktadır^{147,148}.

Peptik ülser; mide mukozasının ileri derece enflamasyonu anlamına gelir. Mide ve duodenumun multifaktöriyel-kronik enflamatuvar hastalığıdır; gastrointestinal sistemin herhangi bir yerinde asit-pepsinle temas etmiş bir mukoza deliği olarak da tanımlanmaktadır. Özellikle erişkinlerin ileri yaşlarında yaygın olmak üzere tüm toplumda hafif ve orta şiddette ülser oldukça sık olarak görülmektedir. Gastritte enflamasyon yüzeysel olduğundan çok zararlı değildir. Hâlbuki peptik ülser, mukozanın, mide sıvısının sindirim işlevi sonucu ortadan kaldırılmış alanıdır ve yüzeysel olmayıp daha derinlere inmektedir^{147,148}. Gastrointestinal (GI) ülserasyonda inflamatuvar cevap genellikle yıkıcıdır. Çünkü hepsi doku nekrozu ve gastrik ülserasyon patogenezinin yol açan lipit türevli eikosanoidlerin yanı sıra lokal inflamasyon araçlarının salınımıyla birlikte görülür. Çalışmalar parental lökotrien uygulamasının gastrik vazokonstriksiyon, vasküler permeabilitede artış, gastrik mukozada yıkım, asit ve pepsin sekresyonunda artış meydana getirdiğini göstermiştir¹⁴⁹. Eğer vasküler hasar varsa, süperfisyal mukozal kapiller kan akımı yavaşlar ve dolaşımdan plazma sızar. Bu durum mukozal kan damarlarında dolaşımın tamamen durması sonucu konjesyonu hızlandırır. Nekrotik yüzey epitelinin dökülmesi ile oluşan erozyon, hipoksik ortamda genişler ve böylece hemorajik derin erozyon ve ülser meydana gelir. Şayet vasküler hasar minimal derecede ise veya yoksa kan akımı devam eder ve süperfisyal mukozal hücre hasarına rağmen gastrik pit'deki proliferatif zon çabucak hasarı karşılar ve hücre proliferasyonu gelişir. Eğer vasküler hasar yoksa veya az ise süperfisyal epitelin %95'i etanolle yıkıldığı halde hasardan 15–60 dakika sonra derindeki kübik hücreler yüzeyi kaplar. Vasküler hasar ve derin hemorajik erozyon veya ülserlerin yokluğunda, gastrik mukozanın epitelyal yenilenmesi son derece hızlı ve yeterlidir. Başka bir deyişle eğer vasküler hasarı farmakolojik olarak dikkate alırsak, gastrik mukozal epitel doğal ve

yeterli tamir kapasitesinden dolayı kendi kendine iyileşir^{150,151}. Belirtildiği üzere gastrik hasarın midedeki savunma ve yıkıcı faktörlerin etkileşim sürecindeki düzensizlikten ileri geldiği iyi bilinmektedir. Gastrik hasar; mide ve duodenumda mukus, bikarbonat, prostaglandin sentezi gibi mukozal koruma mekanizmaları ile mukozaya zarar verebilen asit-pepsin arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkar. Asit sekresyonu ve koruyucu mukoza bariyerindeki bozukluklara ilave olarak genetik yatkınlık (irsiyet), stres, travma, sepsis, hemorajik şok, yanıklar, pulmoner ve karaciğer hastalıkları, rezerpin, epinefrin, steroidler, sigara kullanımı, alkol, aspirin ve indometazin gibi nonsteroid antienflamatuar ilaçlar (NSAİİ), *Helicobacter pylori* ve *Herpes simplex* virüsü (Tip I/HSV-1) hastalığı meydana getiren faktörlerdir. Hastaların yaklaşık %60-80'inde etiyolojik faktör bilinmemekle beraber hastalık gelişimindeki fizyopatoloji birbirlerine benzerdir^{152,153}. Bunun yanı sıra, insanlarda kronik ülserlerin %75-85'i *Helicobacter pylori* enfeksiyonu gösterilmiş olup, bu bakteri polimorfonükleer lökositlerin oksidatif baskısına yol açar. Bunun sonucunda önemli miktarda oksijen metabolitleri üretilir ve bu metabolitler ise dokuyu dejenere ederek ülsera sebep olur^{28,29}.

Hayvanlarla yapılan araştırmalarda, ülser hastalığının sadece insanlarda değil aynı zamanda rat, kedi, köpek, sığır, domuz, kuzu ve tavuklarda da görüldüğünü göstermiştir. Ülser hayvanlar arasında en yaygın olarak kedi, köpek gibi evcil hayvanlarda görülmektedir. Kedi ve köpeklerde gastrik hasar oluşmasının birçok nedeni olmakla beraber dengesiz yağ, karbohidrat ve protein içeren besin maddelerinin alınması ve çevresel stres yapıcı ajanların etkisinin de rolünün olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tavuk ve domuzlarda da çevresel stres ve beslenme faktörlerinin gastrik hasara neden olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan sığırlarda iklim, yaş ve süttten kesimin gastrik hasar oluşmasını etkilediği aynı zamanda beslenmenin, parazitik faktörlerin, savunma

ve saldırgan faktörlerdeki değişikliklerin gastrik hasar oluşumu ile paralellik gösterdiği görülmektedir^{26, 154-156}.

Non steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) günümüzde özellikle romatizmal hastalıklarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlara bağlı olarak özofagus, mide, duodenum ve böbreklerde önemli yan etkiler görülmektedir¹⁴². Endoskopik taramalarda NSAİİ kullanan bireylerin %35-60'nda midede erozyonlar ve submukozal kanamalar ile %10-25'nde mide ve duodenumda ülserler görülmektedir. Özellikle yaşlılarda bu oranlarda ve komplikasyon riskinde daha fazla artış olmaktadır^{157,158}. Ayrıca NSAİİ kullananların yaklaşık % 10'unda ölüm bildirilmiştir. NSAİİ bağlı gelişen gastroduodenal lezyonlar akut olarak 1-2 hafta içinde, kronik olarak ise dört hafta ve sonrasında gelişir¹⁵⁷. Daha öncede belirtildiği üzere ülseri meydana getiren önemli sebeplerden biri de NSAİİ kullanımıdır. NSAİİ kullanımı gelişen toplumlarda kullanım sıklığı oldukça artan ilaç gruplarından biridir. Ayrıca sosyoekonomik şartların daha iyiye gitmesi sonucu artan ortalama insan ömrü nüfustaki yaşlı oranını artırmış olup kronik hastalıklara bağlı NSAİİ kullanımını artıran bir başka neden haline gelmiştir. NSAİİ'lerin ülser yapıcı etkileri, enflamatuvar bozukluklardaki kullanımlarının en büyük dezavantajı olmaya devam etmektedir. NSAİİ'ler tarafından uyarılan gastrik hasarların oluşum mekanizması ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır. Bunlar arasında prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışında bir azalmanın olması topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi sayılabilir¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Aspirin ve indometazin'in siklooksijenaz (COX) enzim sistemini inhibe ederek antienflamatuvar aktivite gösterdikleri düşünülmektedir. 1990'lara kadar vücutta tek tip COX olduğu zannedilirken daha sonra COX enziminin COX-1 (yapısal) ve COX-2 (indüklenebilir) olmak üzere iki izozimi olduğu anlaşılmıştır. Bu iki izozimin genetik kodlamaları da

farklıdır¹⁶²⁻¹⁶⁵. Vücutta predominant olan tip COX-1 olup, fizyolojik uyarılarla aktive olan formdur. COX-1 damar endoteli, mide mukozası, böbrek, kalp ve trombositlerde bulunur. COX-2 ise enflamatuvar uyarılarla aktive olan formdur. Makrofajlarda ve diğer enflamatuvar hücrelerde bulunur ve iltihap etkenleri ile indüklenebilir¹⁶⁶. NSAİİ'lerin gastrik yan etkilerinden COX-1 inhibisyonu, anti-inflammatuar etkilerinden ise daha çok COX-2 inhibisyonu sorumludur¹⁶⁷. Aspirin ve indometazin, COX-1'e olan selektiviteleri COX-2'ye nispeten daha yüksektir. Hâlbuki flurbiprofen COX-2'yi COX-1'e göre daha fazla inhibe eder. COX-2 etkileri COX-1 e göre daha fazla olan NSAİİ'lerden meloksikam, tenoksikam ve nabumeton halen tıbbi kullanımı yaygın olan ilaçlardır^{150,165}.

Aspirin ve indometazin gibi antienflamatuvar ilaçların COX enzim sistemini bloke etmesi ise prostaglandin biyosentezinin baskılanması ve gastrik mukozal bariyerin bozulması sonucu gastrik hasarın oluşumuna neden olur. Daha önceki araştırmalarda COX enziminin inhibisyonu sonucunda araşidonik asit metabolizmasının 5-lipoksijenaz yolunda bir artış meydana geldiği ve bunun da lökotrienlerin ve hidroperoksieikosatetraenoik asidin oksijeninden türevlenen gastrik mukozada tahribata sebep olan radikallerin aşırı üretimi ile sonuçlandığı kaydedilmiştir^{23,26,27,149,153}. Oksijen radikallerinin stres, etanol ya da NSAİİ'lerle oluşturulan akut deneysel gastrik lezyonların patogenezindeki rolü de çok iyi bilinmektedir^{10,16,23,26,27,35}. Bununla beraber gastrik bikarbonat ve mukus sekresyonunun azalması indometazinin hasarlayıcı etkisine yardım eder¹⁶⁸. NSAİİ'ların gastrik hasar oluşturmadaki temel mekanizmaların başında reaktif oksijen sınıfları (ROS) miktarını artırması ve prostaglandin miktarını düşürmesi gelmektedir. Bu ROS miktarındaki artış ve buna paralel olarak prostaglandinlerin eksikliği midede gastrik asitlerin, safra tuzlarının ve etanol'ün tahrip

edici etkilerini artırmaktadır. ROS'nin gastrik ve duodenal mukozaya verdiği tahrip edici ülseratif etkileri (kanamalarda dâhil olmak üzere), hayvanlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede araştırılmıştır^{169,170}.

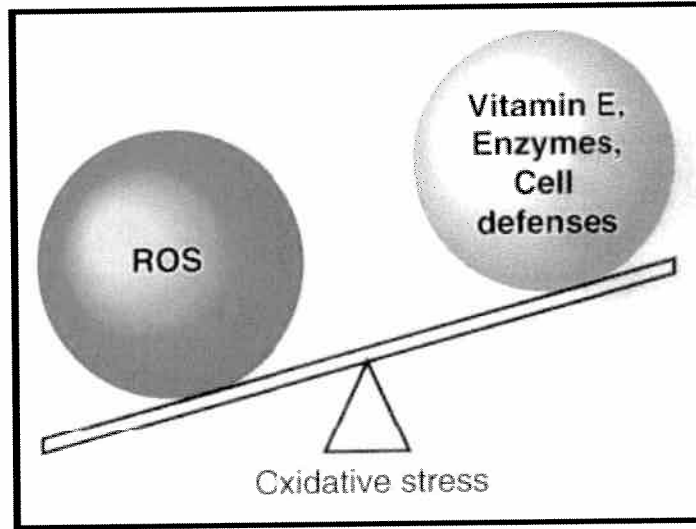
İndometazin gibi NSAİİ'lar kullanılarak oluşturulan deneysel akut gastrik lezyonlarda oksijenden türevli ROS ve LPO'nun önemli rollerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca bu çalışmalarda lipit peroksit ve hidrojen peroksitin gastrik mukozal hücrelerde birikiminin hızlanmasına rağmen glutatyon peroksidaz aktivitesinin azaldığı görülmektedir. Hidroksil, süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit, peroksinitrit gibi radikallerin çeşitli reaksiyonlarla dokularda oluşturduğu hasarlar gibi gastrik hasar oluşumunda da birçok reaksiyonu yönlendirdikleri görülmektedir. Bu yüzden gastrik mukozadaki ülser formasyonunun giderilmesinde antioksidan enzimlerin koruyucu fonksiyonlarının olduğu düşünülmüştür¹⁷¹⁻¹⁷⁵.

Hücreler ROS'un zararlı etkilerini önleyebilecek veya oluşan zararlı etkileri tamir edebilecek birçok mekanizmaya sahiptir. ROS'un tahribatları, primer olarak enzimler ve sekonder olarak da antioksidan vitaminler, glutatyon (GSH) ve melatonin gibi birçok makro ve mikro moleküller tarafından azaltılarak serbest radikallerin hücrelerde düşük ve belirli konsantrasyonlarda tutulmaları sağlanır^{176,177}. Şayet süperoksit (O_2^-), hidroksil (HO^*) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS üyeleri aşırı üretilirse, membran lipitlerinin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve ekstraselüler matriks glikozaminoglikanlarının zarar görmesine bağlı olarak doku hasarı prosesi başlayabilir. Gastrik hasar oluşumunu tetikleyen mekanizmalardan birisinin de bu mekanizma olabileceği pek çok araştırmacı tarafında öne sürülmüştür¹⁷¹⁻¹⁷⁵. Serbest radikalleri etkisizleştiren sekonder moleküllerden GSH ise, gastrointestinal doku lipitlerini oksidatif hasardan korumada önemli görev üstlenmiştir^{45,46,178,179}. Bu gün bilinen pek

çok etken madde ve bitki ekstraktları'nın indometazin ile uyarılan gastrik hasar üzerine pozitif etkileri gösterilmiştir^{23-27,180-185}.

2.2. Antioksidantlar

Serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) engelleyerek bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidant savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidantlar" olarak bilinirler. Organizmalarda ROS miktarı ile antioksidantlar arasında bir denge sürekli olarak vardır. Bu dengenin ROS lehine kayması oksidatif stresi artırırken (Şekil 2) organizmalar da pek çok hastalığın ortaya çıkmasına elverişli hale gelmiş sayılır¹⁸⁶. Bu yüzden öncelikle serbest radikalleri iyi tanımak gereklidir.



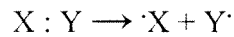
Şekil 2. ROS'ler ile vücut savunmaları arasındaki denge bozulmamalıdır.

2.2.1. Serbest radikaller:

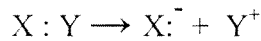
Serbest radikaller orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen

otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir^{19,24,25,187,188}. Elektronlar atomlar içerisinde orbital olarak bilinen bölgelerde en fazla iki tane olacak şekilde ve birbirlerine zıt konumda bulunmaktadır. Demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezken bazı atom kombinasyonları (nitrit dioksit, nitrik oksit) bir orbitalinde tek elektron bulunduran dağılımları nedeni ile radikal özellik gösterirler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dizilişlerinin yanında termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilmelidir. Serbest radikaller üç yolla meydana gelir^{19,24,25,189}.

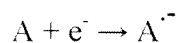
1. Hemolitik bağ ayrılması ve bir elektronun bir molekülden diğerine transfer edilmesi sonucu oluşan serbest radikallerdir. En yaygın görülen serbest radikal oluşumu hemolitik bağ ayrılmasıdır.



2. Bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atom veya atom gruplarının birinde kalır.



3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu oluşan serbest radikaller.



Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijenin bu özelliği onun diğer

serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlamaktadır. Oksijen atomu orbitallerindeki elektronların farklı dizilimi ile de süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna da neden olur. Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalleride yer almaktadır. Oksijenli (Aerobik) solunum yapan canlılar dışardan aldıkları besin maddelerini oksijeni kullanarak enerjiye çevirirler. Dolayısıyla aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin en fazla oluştuğu canlı grubudur. Bu yüzden aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin etkilerine daha fazla maruz kalırlar^{19,24,25,190}.

2.2.2. Serbest radikal çeşitleri:

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Oksijen molekülünün içerdii iki serbest elektrondan bir tanesini dışarıdan bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur.

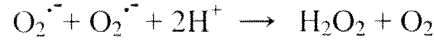


Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) hemen hemen bütün aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Süperoksit radikalının eozinofil, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi fagositik hücreler tarafından üretilerek radikal oluşunu artırdığı binmektedir^{19,24,25,189}.

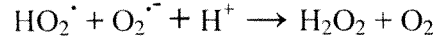
Süperoksit radikali nadir olarak oksidatif hasara neden olurlar. Çünkü süperoksit dismutaz enzimi ile hızlı bir şekilde hidrojen peroksite (H_2O_2) çevrilir. Buna ilaveten asidik durumlarda H_2O_2 ve peroksil ($HO_2^{\cdot-}$) radikallerini üreten spontan reaksiyona

uğrar. Süperoksit radikallerinin asıl zararları hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır¹⁹¹.

İki süperoksit radikalinin bir araya gelmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



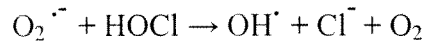
Süperoksit radikali ve peroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.



Süperoksit radikalinin nitrik oksit radikali ile birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlamaları sonucu peroksinitrit meydana gelir¹⁹².

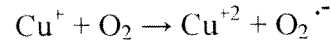
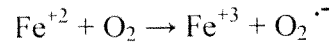


Hidroklorik asit (HOCl) oksijen metabolitleri ile reaksiyona girme özelliğine sahip olması nedeniyle ilgi uyandırmıştır. Hidroklorik asitin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda oldukça güçlü oksidan olan hidroksil (OH[•]) radikalinin oluştuğu görülmüştür¹⁹³.

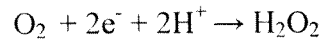
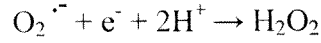


Süperoksit anyonu hem indirgeyici hem yükseltgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitler nitrobluetetrazolium ve sitokrom c'yi indirger. Redüktan olarak görev yaptığında ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev

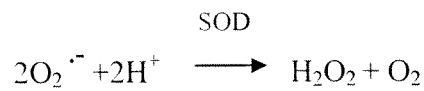
yaptığında ise epinefrinin oksidayonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksite indirgenir^{19,188,194}. Diğer taraftan geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olup serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir¹⁹⁵.



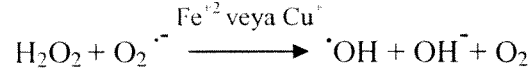
Hidrojen peroksit (H₂O₂): Asidik ortamda moleküler oksijenin ortamdaki iki elektron alması veya süperoksit'in bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir^{19,24,25,188,196}.



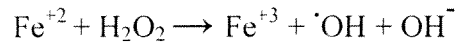
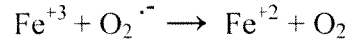
Biyolojik sistemlerdeki hidrojen peroksitin asıl kaynağı herhangi bir sistem tarafından üretilen süperoksit radikalinin dismutasyon reaksiyonudur. Ayrıca ürat oksidaz, glukoz oksidaz, ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler iki elektronunu oksijene vererek H₂O₂ oluştururlar.



Hidrojen peroksit kendi başına çok zayıf oksidant özelliği gösterir. Çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir. Hidrojen peroksit gerektiğinde hücreler tarafından selenyum içeren glutation peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılabilir. H_2O_2 serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir^{19,24,25,188,196}.

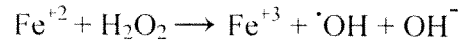
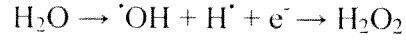


Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz olarak meydana gelebilir. Ancak katalizör olmadığı zaman çok yavaş ilerler. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demir'e (Fe^{+2}) indirgenir. Daha sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten $\cdot OH$ ve OH^- üretilir^{197,198} reaksiyonun mekanizması aşağıdaki şekildedir.

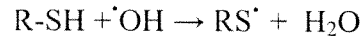


Hidroksil radikali ($\cdot OH$): Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında yani fenton reaksiyonu sonucu ve suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılması ile oluşan son derece reaktif oksidan radikaldir. Hidroksil radikali özellikle

biyolojik moleküller üzerine saldıran ve oluştuğu yerde büyük hasarlara neden olan oldukça hareketli bir oksidandır¹⁹⁹.



Hidroksil radikali birçok biyolojik molekülden hidrojen atomu koparır. Bunlardan birisi de tiollerdir.



Meydana gelen sülfür radikali oksijenle birleşerek tiyol peroksil (RSO_2) ve sülfenil (RSO^{\cdot}) gibi oksisülfür radikallerini meydana getirir. Bu radikaller de biyolojik moleküllerde hasar yapıcı etkiye sahiptir.

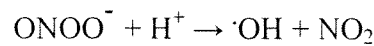
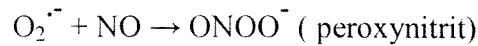
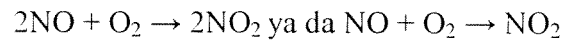
Bekli de OH^{\cdot} en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu stimüle etmesidir. Bu durum hidroksil radikallerinin membrana yakın bir yerde üretilmesi ve membran fosfolipid zincirinin yağ asidi tabakasına atak tapması ile meydana gelir. Ayrıca hidroksil radikalının araşidronik asit gibi doymamış yağ asitlerine olan ilgisinin de fazla olduğu ileri sürülmektedir.

Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$): Singlet oksijen eşleşmemiş elektron yada elektronlara sahip olmadıandan dolayı bir serbest radikal değildir. Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin

ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Ancak orbitalinde içerdiği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer reaktif oksijen türleri ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen özellikle fotokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir^{186,200}.

Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO₂): Nitrik oksit ve nitrojen dioksit eleşmemiş elektronları ile birer radikaldirler. Nitrojen dioksit, nitrik oksitin oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir. NO₂ oldukça zehirli ve çok güçlü bir oksidandır. Oksijen redüksiyonu sırasında NO₂'ye maruz kalması durumunda araşidronik asit metabolizmasının NO₂ konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Düşük miktarda NO₂'nin araşidronik asit metabolizmasını büyük oranda artırdığı gözlenmiştir^{196,201,202}.

Nitrik oksit L-arjinin amino asitinden in vivo olarak üretilmektedir. NO kokusuz, renksiz ve az indirgenebilen oksidan bir gazdır. Son yıllarda radikal olan nitrik oksit üzerinde oldukça fazla durulmaya başlanmıştır. Nitrik oksit eleşmemiş elektronları sayesinde süperoksit, tiol grupları ve nitrojen dioksit ile hızlı reaksiyonlar oluşturmaktadır. Diğer radikallerle birlikte diabetes mellitus, septik şok, kalp bozuklukları, Alzheimer hastalığı ve gastrik ülserlerin oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir^{18,23,196,202,203}.



Diğer Serbest Radikaller: Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R[•]), peroksil radikalleri (ROO[•]), alkoksil radikalleri (RO[•]), tiyol radikalleri (

RS') gibi önemli serbest radikallerde oluşabilir. Bunlardan özellikle polidoymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol radikalleri de tekrar oksijenle reaksiyona girerek sülfenil (RSO') veya tiyol peroksil (RSO₂') vb. gibi radikalleri oluşturabilirler¹⁵⁶.

2.2.3. Serbest radikal kaynakları:

Serbest radikaller organizmanın normal yaşamını sürdürmesi için gerekli olan metabolik faaliyetlerini devam ettirmesi için gerekli olan reaksiyonların sonunda oluşabildiği gibi stress ve radyasyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Bu nedenle serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır.

Eksojen radikal kaynakları:

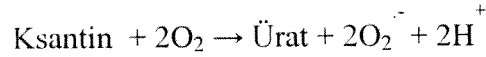
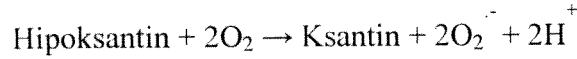
- İlaç oksidasyonları, Radyasyon, Güneş ışığı, UV-ışınları
- Sigara dumanı, egzoz gazları, kükürt dioksit
- Alışkanlık yapan maddeler
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksit, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotikler.
- Stres^{154,155,186,188}.

Endojen radikal kaynakları:

- *Küçük moleküllerin otooksidasyonu:* Normal ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon reaksiyonları ile serbest radikalleri oluşturur^{186,204,205}.

- *Enzimler ve proteinler:* Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, serbest radikal oluşumuna neden olurlar^{169,186}.

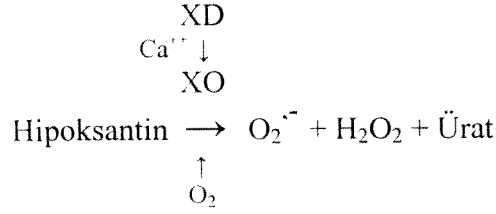
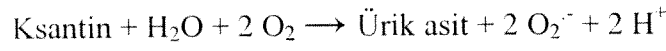
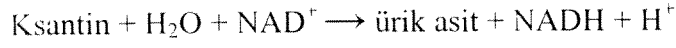
Ksantin oksidaz normalde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat, in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürat'a oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir^{156,170,186}.



Hipoksantin- ksantin arasındaki bu tepkime sonucu oluşan süperoksitin yarattığı en büyük hasar vasküler sistemdedir. Fakat yapılan araştırmalar ksantin oksidaz enziminin barsak, akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda da hasara neden olduğu gözlenmiştir^{165,175}.

Normalde NAD bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal oluşumuna neden olmaz. Ancak ilk iskemi atağından sonra hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası oluşturma eğilimine girer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması proteazların miktarı artsa bile devam eder. Bu sırada hücre ksantin dehidrogenazın (XD) ksantin oksidaz (XO)'a dönüşümüne izin verir. Bu oluşan hücre içi olayların sonunda XD enzimi dehidrojenaz formundan oksidaz formuna dönüşür ve süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot -}$) radikalinin üretimine neden olur. Oluşan süperoksit

radikalleri hızlı bir şekilde hidrojen peroksit'e dönüştürür. Hidrojen peroksit güçlü bir radikal olmasa da, Fe^{+2} varlığında fenton reaksiyonu oluşturarak güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur^{164,189}.



Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğunu da aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler²⁰⁶.

- *Mitokondriyal elektron transferi*: Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynaklarından biri elektron taşıma sisteminden (ETS) sızan elektronlardır. Mitokondriyal ETS'den elektron iki yerde sızmaktadır. Birincisi, nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat (NADH)-dehidrogenaz basamağında, iki olarak koenzim Q ya da ubikinon basamağında elektron sızması görülmektedir. ETS'nin son basamağında elektronların O_2 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi oksijenin %97-99'unu harcayarak suya indirger. Ancak O_2 'nin %1-3'ü elektron transport zincirinden sızan elektronlarla bir araya gelerek süperoksit radikalinin üretimini artırır. Böylece NAD^+ bağlı substratlar, süksinat, adenosin di fosfat (ADP) ve oksijen gibi endojen

faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretimine etki eder^{156,163,186}.

- *Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri:*

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve b₅, doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları ise okside ederler.

- *Peroksizomlar:* Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır.

Bu organeldeki D-aminoasid oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar O₂⁻ üretmeden, bol miktarda H₂O₂ üretimine sebep olurlar. Ancak katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir^{186,194,207,208}.

- *Plazma membranı:* Plazma membranı serbest radikal üretimi için kritik bir yer

oluşturmaktadır. Ekstraselüler olarak üretilen serbest radikaller diğer hücre komponentlerine ulaşmadan önce plazma membranını geçmesi gerekir. Bu geçiş sırasında membranda toksik reaksiyonların oluşmasına da neden olabilirler. Membranda yer alan fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler ve membran proteinleri serbest radikallerden çabuk etkilenirler. Lipid peroksidasyonu veya yapısal proteinlerin oksidasyonu sonucu membran permabilitesinde bozukluklar meydana gelmektedir^{163,166,167,186,207,208}.

Hidrojen peroksit membranları neredeyse su kadar kolay geçebilen güçlü oksidandır. Bu nedenle proteinlerin ve lipidlerin hidrofobik kısımlarını daha iyi parçalayabileceği ve toksik etkisinin daha fazla olacağı tahmin edilmektedir. Serbest

radikallerin nonfagositik hücre membranlarında NADPH-oksidadaz aracılığı ile üretiminin serbest radikal oluşumunun önemli bir kaynağı olarak görülmektedir^{150,186}.

Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi plazma membranıyla bağlantılı enzimler ile mikrozomlar tarafından serbest radikal üretimi, bu enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asit metabolizması ile ilişkili pek çok yeni buluş ve biyolojik açıdan önemli ürünlerin meydana gelmesinden dolayı ilginçtir. Bu ürünler prostaglandinleri, tromboksanları, lökotrienleri ve anafaksinin slow-reakting substratını içerir. Son zamanlarda araşidonat metabolizmasında yer alan bu enzimatik proseslerin otokatalitik lipid peroksidasyonuna öncülük etmesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır. Serbest radikal üretimini bazı toksik maddeler artırabilir. Bu maddeler dört gruba ayrılır^{186,194}.

- 1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.
- 2- Toksin bir serbest radikale metabolize olabilir. Örneğin toksik bir madde olan karbontetra klorür (CCl₄) karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil (CCl₃) serbest radikale dönüştürülür. Bu radikalın oksijenle reaksiyona girmesi neticesinde meydana gelen peroksil radikali güçlü lipid peroksidasyonu başlatıcıdır.
- 3- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun en basit örneği paraguattır.
- 4- Toksin antioksidant aktiviteyi düşürebilir. Örneğin parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından glutatyonla reaksiyona girerek ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

2.2.4. Serbest radikallerin etkileri:

Serbest radikaller etkilerini özellikle canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip olan DNA, yağlar, proteinler ve karbonhidratlara saldırarak gösterirler. Mitokondride

oksijenli solunum sonucunda meydana gelen serbeset radikallerin alveolar epitel tabakada ve DNA ya zarar vererek yapısal ve metabolik çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir^{151,181,186,209}.

Membran lipidleri üzerine etkileri: Membranlar üzerindeki birçok bileşik ve molekülün serbest radikallerden etkilenmesine rağmen, radikallerin en belirgin etkileri yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatmaları olarak bilinir. LPO, polidoymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam eden birçok biyolojik yapıda hasarlara neden olan reaksiyon sürecidir. LPO membranlarda oluşturduğu yıkıcı etkisi genellikle reaksiyon sırasında açığa çıkan $\cdot\text{OH}$ radikalinin membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür^{118,186,210-212}.

Lipid peroksidasyonu başlatan ilk hareket membran yada polidoymamış yağ asitlerinin içerdiği metilen grubundan ($-\text{CH}_2-$) bir hidrojen (H^\cdot) atomunun çıkartılması ile başlar. Böylece tek elektron içeren H^\cdot 'nin uzaklaştırması sonucu karbon merkezli $-\text{CH}^\cdot-$ lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Bir dizi değişikliğe uğrayarak molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H^\cdot parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam ederek zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur^{118,154,186,196}.

Lipid hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir. Ayrıca lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizörlüğünde yıkılması sonucu çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenlerimalondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrenel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarlı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler^{168,187,212-214}.

LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidant reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder¹⁹⁶. LPO sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar kısaca²¹⁵.

- 1- Membran üzerindeki yağ asiti miktarında azalma meydana gelir.
- 2- Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan lipid hidroperoksitleri biomembranlar üzerinde yerleşmiş halde bulunan bazı enzimleri enzimleri inhibe eder.
- 3- Tiyol gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerindeki protein-lipid ilişkisini bozar.
- 4- Membranın yapı taşlarından olan lipidlerin akışkanlığını bozar.
- 5- Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli yapısal moleküllerde bozulmalara neden olurlar.

Proteinler üzerine etkileri: Proteinler, lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Proteinlerin radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin (PCO) ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinlerde fragmantasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal fonksiyonlarında bozukluklar ve enzim aktivitelerinde aksaklıklar meydana gelir^{118,181,186,216}.

Proteinlerin çok farklı şekillerde modifikasyona uğramasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirteci yoktur. Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit miktarı, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifiktir. Bazı oksidatif protein modifikasyonları ise geniş çaplı özellik taşır ve çok sayıda amino asitte değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir. Spesifik modifikasyonlara tirozin'nin ditirozine dönüşümü, geniş çaplı modifikasyonlara ise arginin, lizin ve tirozin amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir^{217,218}.

DNA üzerine etkileri: İyonize edici radyasyondan kaynaklanan hücre ölümünün başlıca nedeni olarak nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girmesi ve bu

reaksiyon sonucunda DNA'da mutasyona ve hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan melanoaldehit (MDA)'in nadirde olsa DNA'da mutasyona sebep olduğu, beslenme ve yaşam şekli gibi faktörlerle bir araya gelerek kanser ve genetik bazı hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir^{219,220}.

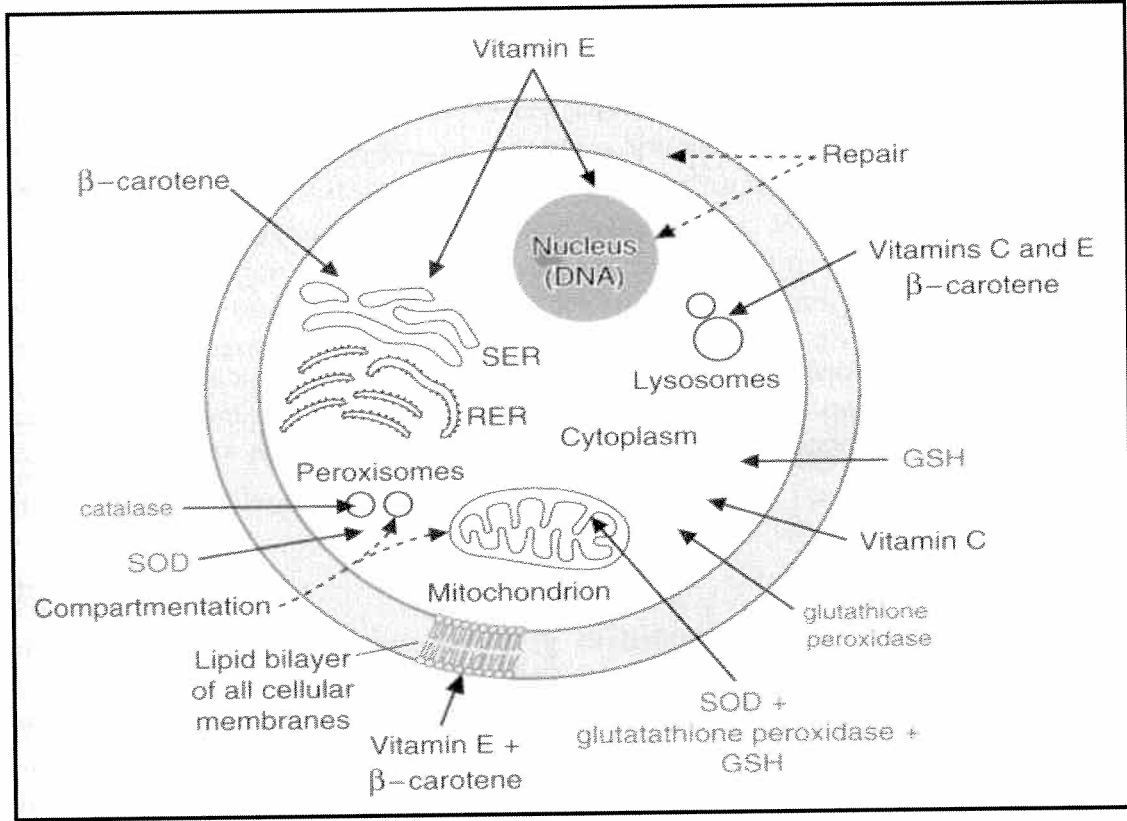
Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer ve DNA hasarına neden olurlar. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer^{221,222}.

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Reaktif oksijen türleri, DNA'nın oksidatif hasarı sonucu karsinogenesis ve çeşitli hastalıklar görülebilir^{118,186,207,208,210,223,224}.

2.2.5. Antioksidant savunma sistemleri

Canlılar serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranının da etki gösteren birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engelleyerek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. İşte canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme antioksidant savunma sistemi veya kısaca antioksidantlar denilmektedir. Antioksidantlar endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmakla beraber serbest radikal oluşumunu engelleyen ve mevcut radikalleri etkisiz

hale getirenler veya enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilir (Şekil 3).



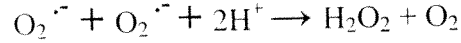
Şekil 3. Antioksidant sistem¹⁹⁸ (<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>).

2.2.5.1. Endojen (Doğal) antioksidantlar:

a. Primer antioksidantlar (Enzimler):

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD'nin aktivitesi yaş artışıyla beraber artar. SOD yaklaşık olarak bütün canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu-ZnSOD, extraselular etki gösteren ECSOD ve mitokondri de bulunan tetramerik Mn

ihtiva eden Mn-SOD izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'nin tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler²²⁵⁻²²⁷.



Süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bu enzim ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda insan eritrositlerinde de tesbit edilmiştir. Birçok deney sisteminde çalışılan bu enzimin ksantin-ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiği görülmüştür. Hemen hemen bütün canlılarda bulunan ve süperoksit gibi oldukça saldırgan bir radikalın etkisini ortadan kaldıran SOD'nin canlılarda önemli roller üstlendiği ve yaşamsal etkiye sahip olduğu düşünülmektedir^{19,22,24,144,186,207,208,228-232}.

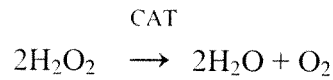
Cu-Zn SOD; ilk kez 1969 yılında tanımlanmış, hayvansal hücrelerin sitozolünde yer aldığı belirlenmiş ve molekül ağırlığında yaklaşık olarak 32000 Dalton olduğu kaydedilmiştir. Cu-Zn SOD birbirinin aynı olan iki alt üniteden meydana gelmiştir ve her alt üniteye bir Cu atomu ve bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetillenmiş terminal amino grubu taşıdığı tespit edilmiştir^{204,208,228}.

Mn-SOD; prokaryotik hücreler molekül ağırlığı 40000 dalton olan, birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan enzimdir. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, ancak 80000 molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının pek çok ortak özelliği primer yapıları da birbirine çok benzerdir. Ancak aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak

yapısal özellik yoktur²³³. Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD (FeSOD) bulundurur²³⁴.

Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerektiği ve hatta iki enzimin bir kompleks haline getirilip fenton reaksiyonu sonucu oluşan radikallerin giderilmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir^{19,22,24,25,144,186,188,207,208,229-232,235}.

Katalaz (CAT): Katalaz, tüm canlı hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört tane alt grup içeren ve her bir alt grubu 60,000 dalton ağırlığında olan enzimdir. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizlemektir^{22,24,25,144,186,188,207,208,229-232,235-237}.



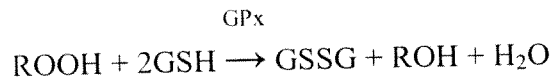
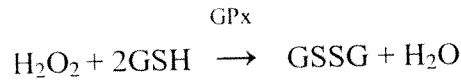
Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda lokalizedir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllu lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır^{194,238,239}.

Glutasyon peroksidaz (GPx): Glutasyon peroksidaz enziminin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise

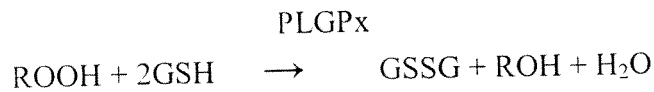
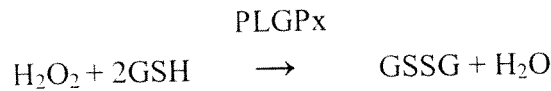
yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir^{118,186,207,208,240,241}.

Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. GPx, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur^{242,243}.

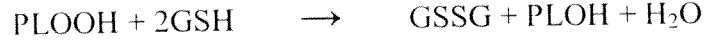
GPx, aşağıdaki reaksiyonları katalizler^{207,208,240,244}.



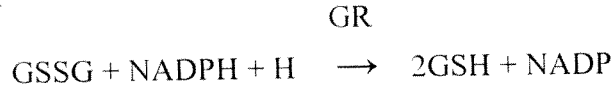
Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPx) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidant olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGPx membran peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar^{245,246}.



PLGPx



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktazı (GR) katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutatyon (GSH)'a dönüşür.



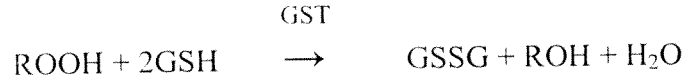
GPx'in, hücredeki dağılımı, GR'a bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur²⁴⁶.

Glutatyon s-transferaz (GST): "Selenyuma bağlı olmayan GPx" olarak adlandırılır. GST'ler, sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere glutatyonu aktaran proteinlerdir. *E.coli*'den insana kadar çok çeşitli türlerden GST saflaştırılabilirken en çok da sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır²⁴⁷.

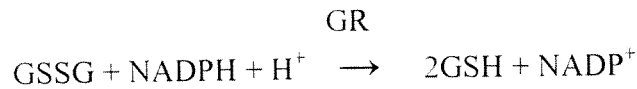
GST'ler başta araşidonik ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere LPO'lara karşı Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi koruyucu mekanizma oluştururlar²⁴⁸.

GST'ler antioksidant aktivitelerine ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahip GST'lerin tüm canlı hücrelerde bulunması hayati önemlerinin bir göstergesidir. Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak, yabancı maddeleri glutatyonda ki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini

sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir ve daha ileri bir ürüne metabolize olabilirler. GSH'den glutamat ve glisin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür²⁴⁸.

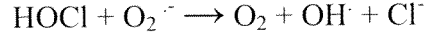
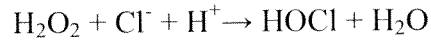


Glutasyon redüktaz (GR): Glutasyon redüktaz 50.000 daltonluk alt birimlere sahip bir dimerdir. Görevi yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirmektir. Bu indirgenme işlemi sırasında NADPH'dan gelen elektronlar okside glutasyonun disülfid bağına direkt olarak transfer edilemezler. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan Fenil adenin difosfat (FAD)'a transfer edilirler. Daha sonraki alt birimlerdeki 2 sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatona aktarılmış olurlar. Her bir subunit 3 tane yapısal alan içerir, bunlar: FAD bağlayıcı olan, NADPH bağlayıcı olan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı ve NADP⁺ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrojenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara benzerler. FAD ve NADP⁺'nin izoalloksozin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde geniş ölçüde aralarında bağlanırlar. Oksidize glutasyon için bağlayıcı alanın bir alt biriminin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği belirtmek gerekir²⁴⁹.



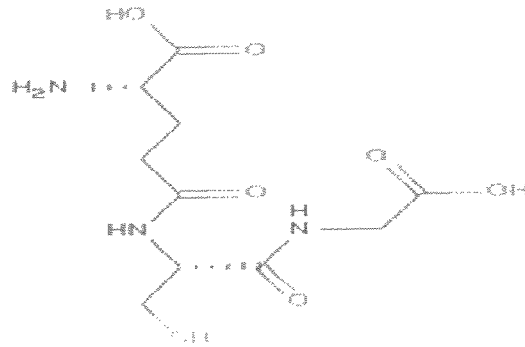
Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu ise, GR'nin GSSG'yi GSH'ye çevrimi için gereken NADPH'ı sağlar²⁵⁰.

Miyeloperoksidaz (MPO): Nötrofil granüllerde bol miktarda bulunan MPO enzimi H_2O_2 'den hipoklorik asit (HOCl) oluşturmak üzere etki eder. Asidik pH oluşumuna bağlı olarak MPO aktivitesi artmakta ve membranı kolayca geçen H_2O_2 bakteriye toksik etki yapmakta ya da hidroksil (OH) radikaline dönüşmektedir. Bu tepkimede HOCl yer almaktadır. H_2O_2 ile MPO, Cl^- iyonlarını HOCl'ye dönüştürmektedir. Çok reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir^{6,229,250}.

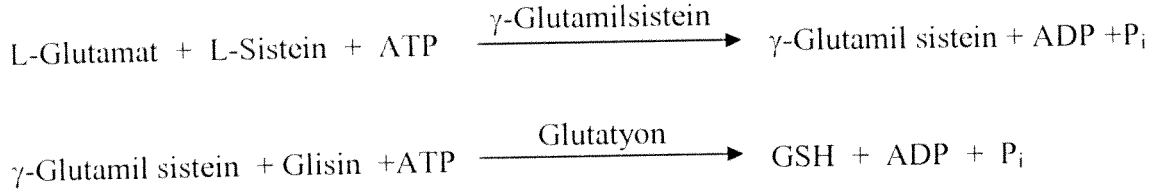


b. Sekonder antioksidantlar:

Glutasyon (GSH): GSH, birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir (Şekil 4). GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır²⁵¹.



Şekil 4. Glutasyon'un molekül yapısı



GSH, hemoglobin ve diğ er eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutatyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde H₂O₂ ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidant etki sergiler ve H₂O₂'yi alyuvarlardan uzaklaştırır. H₂O₂ birikmesi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azaltabildiğ inden bu tepkime çok önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ile süperoksit oluşurken diğ er dokularda ise bu sitokrom P 450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşur^{207,208,250-252}.

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH'yi peptid bağından dolayı düşük enerjili bileşikler arasında kabul edebiliriz. GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfid-sülfidril değ işimi tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluş an hidrojen peroksidi uzaklaştıran enzim GPx'e substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğ unda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'ye indirgenerek GSH miktarı düzenlenir^{229,253}.

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. Örneğ in GPx ve CAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen

radikallerini kimyasal olarak inaktive eden askorbik asit, α -tokoferol ve B-karoten gibi diyetle alınan antioksidantlarla ilgilidir^{186,207,208,254}.

Birçok enzimin şayet sistein tiyol grubu (-SH) oksitlenecek olursa inaktive ya da inhibe olur. GSH, Gama-glutamilsisteinilglisin, duyarlı ve esansiyel -SH gruplarını içeren enzimlerin doğal aktivatörüdür. Glutasyon hücrede bir ko-enzimden ziyade var olan amino asit öncüllerinden kolayca sentezlenen doğal bir antioksidantdır. Fenilalanin ve tirozinin oksidatif yıkımında görev alan maleilasetoasetat izomeraz da dahil olmak üzere glutasyon çok az sayıda enzim için spesifik bir koenzimdir. Glutasyonun hücre içi derişimi kontrol edilerek birçok enzimin aktivitesi düzenlenebilir²⁵³.

Diğer sekonder antioksidantlar: Canlı vücudunda oldukça az miktarlarda bulunmasına rağmen vitaminlerin vücuttaki görevleri oldukça fazladır. Vitaminlerin bir bölümü, besinlerle aldığımız karbonhidrat, yağ ve proteinden enerji ve hücrelerin oluşması ile ilgili biyokimyasal olayların düzenlenmesine yardımcı olurlar. A, E ve C vitaminleri vücut hücrelerinin serbest radikallerin meydana getirebileceği hasarları önleyerek hücrelerin normal işlevlerini sürdürmeleri ve bazı zararlı maddelerin etkilerinin azaltılmasında (Antioksidant etki) yardımcı olurlar. Antioksidantlar, hücremizi, serbest radikalleri nötrleştirerek korurlar. Bunlar uyum içerisinde çalışan bir takım gibi radikalik saldırılara karşı koyarlar. β -Karotenin, askorbik asitin ve tokoferolün antioksidant etkileri yıllardan beri bilinmektedir. β -Karoten organizmada A vitaminin parsiyal oksijen öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidant olarak görev yapar. Bununla beraber, 15 torr'da 150 torr'dan daha iyi antioksidant olduğu, 760 torr'da ise prooksidan olarak davrandığı bildirilmiştir. Hücrelerin dışında β -Karoten nöbet tutarken; hücre

duvarından, içeri girmek isteyen saldırganlara karşı savunmayı ise eser elementlerden selenyumun da yardımıyla E vitaminini üstlenmiştir^{186,255}.

Suda çözünen vitaminlerden birisi olan askorbik asit yapı itibariyle en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Yüksek yapılı hayvanların pek çoğu ve bitkiler kolayca askorbik asidi glukozdan sentezleyebilmektedirler. Hücre içerisindeki C vitamini serbest radikallere son darbeyi vurmakta ve bu şekilde radikallerin tesirleri ortadan kaldırılmaya çalışmaktadır. E vitamini yağda çözünen bir vitamin olup temel görevi lipitleri oksidatif hasardan korumaktır. İnce barsaklardan kolayca emilir ve vücudun tüm dokularına taşınarak hücre membranları etrafında depolanır. Böylece hücre membranında koruyucu bir tabaka oluşturmuş olur^{118,186,256}.

2.2.5.2. Ekzojen antioksidantlar:

1. *Ksantin oksidaz inhibitörleri:* Tungsten, allopürinol, oksipürnol, folik asit ve pterin aldehit
2. *Soya fasulyesi inhibitörleri:* Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.
3. *NADPH oksidaz inhibitörleri:* Adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuar ilaçlar, cetiedil ve difenilin iyodonyum
4. *Recombinant süperoksit dismutaz*
5. *Troloks-c:* E vitamini analogu
6. *Endojen antioksidant aktiviteyi artıran maddeler:* Glutasyon peroksidaz aktivitesini artırır. Bunlar; Ebselen ve asetil sisteindir.
7. *Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları:* Mannitol ve albümin

8. *Demir redoks döngüsünün inhibitörleri*: Desferroksamin ve seruloplazmin

9. *Nötrofil adezyon inhibitörleri*

10. *Sitokinler*:

- Tümör Nekroz Faktör (TNF)
- Interlökin 1

11. *Barbitüratlar*

12. *Demir şelatörleri*²⁵⁷.

2.2.5.3. Gıda antioksidantları:

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Etoksiguin
- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
- Propilgalat
- Sodyum benzoat
- Fe-süperoksit dismutaz^{186,257}.

2.2.6. Antioksidant etki tipleri: Antioksidantlar dört ayrı şekilde etki ederler^{118,186,207,208,255,257}:

1. *Toplayıcı etki (scavenging etki)*: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya reaktif olamayan yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.

2. *Bastırıcı etki (quencher etki)*: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen atarak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkiye bastırıcı etki denir.

3. *Onarıcı etki (repair etki)*: Genellikle DNA'daki hasarların tamir edilmesinde bu etki sürekli geçerlidir.

4. *Zincir kırıcı etki (chain breaking etki)*: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir.

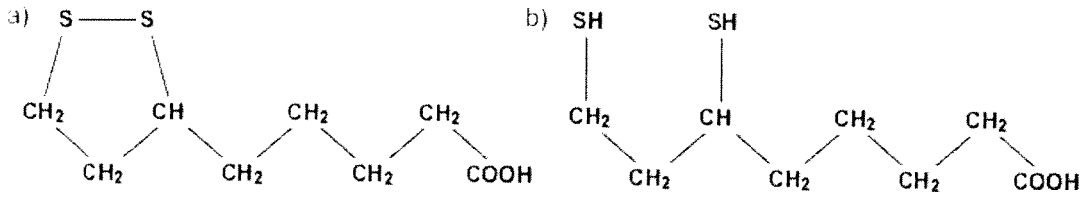
Serbest radikaller ve bunları etkisizleştirmek için kullanılan veya üretilen antioksidantlar hakkında mevcut bilgiler arttıkça bunlara olan ilgi de bilim adamları tarafından her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda hemen her sahada yapılan çalışmaların antioksidant özellikler ile birlikte değerlendirme çalışmaları da ön plana çıkmaktadır.

2.3. Alfa Lipoik Asit

Alfa-lipoik asit (ALA) aslında yakından tanıdığımız bir moleküldür. B grubu vitaminler' den birisidir. Hem suda hem de yağda çözünebildiği için hücre içinde, hücre dışında ve membran yapısında da etkisini sürdürebilir. Günlük besinlerimizle kolayca ve bol miktarda alınabilir. Alfa lipoik asit (LA) son yıllarda bilim adamlarının büyük ilgisini çeken moleküllerden birisidir²⁵⁸.

2.3.1. Alfa Lipoik Asit'in Kimyasal Özellikleri: Alfa lipoik asit (ALA) 1950'de sığırcı karaciğerinden daha sonra da patatesten izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda onun kimyasal yapısı tespit edilmiş ve çeşitli sentezler vasıtasıyla doğrulanmıştır. ALA 6,8-dithiooktanoik asit olarak ta adlandırılabilir. Asimetrik karbon atomuna sahip olmasından dolayı optikçe aktiftir. ALA kan beyin bariyerini aşabilen düşük moleküler ağırlıkta bir maddedir. Doğal olarak meydana gelen ALA 'R' konfigürasyonundadır ve

polarize ışığı sağa (dekstro D) döndürür (Şekil 5). ALA'nın amidi E2 (dihidrolipoat açıltransferaz)'nin koenzimidir. E2; lösin, izolösin ve valinin transaminasyonu esnasında şekillenen α -keto asitler. α -ketoglutarat ve ve piruvatın oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyen mitokondrial multienzim komplekslerinin alt ünitesidir. Bu reaksiyonlar koenzim A'ya α -keto grubu transfer edilmesine dayanan mekanizmayı anlatır. Aynı zamanda LA glisin sentez ve yıkımına katılan 4 mitokondrial enzim kompleksinin temel elementidir^{62,68}. ALA diyetten kolayca emilir, nakledilir, beyini de içerisine alan çeşitli dokularda hücrelerin sitoplazmasında bulunan glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz tarafından NADPH 'ın varlığına bağlı olarak dihidrolipoik asite (DHLA) dönüştürülür^{62,63,64,68}.



Şekil 5. Lipoik asit (a) ve onun indirgenmiş formu-dihidrolipoik asit (b).

Biyokimyasal proseslerdeki rolü dikkate alındığında, başlangıçta vitamin B komplekslerine dahil edilmiştir. Bununla birlikte şimdilerde araştırmacıların çoğu lipoik asidin bir vitamin olmadığına inanmaktadır. Sülfürün kaynağı olan sistein ve oktanoik asit lipoik asidin direkt prokürsör (başlangıç molekülü)'ü dürler ve bakteri ve bitkilerdekine benzer olarak insan ve hayvanlardaki mitokondrilerde sentezlendiği farz edilmektedir⁶¹.

ALA'nın moleküler özelliklerine ilaveten son yıllarda onun antioksidant özelliklerinin de keşfedilmiş olması bu moleküle bilim adamlarının ilgisini artırmış ve ilerleyen araştırmaların ALA'nın doğrudan reaktif oksijen sınıfları (ROS) ve onların

sebepler oldukları metabolik hastalıklar üzerine etkilerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. ALA'nın hücre içi ROS'ların pek çoğunun radikalik etkisini süpürerek oksidatif stresle savaştığı pek çok çalışma ile de gösterilmiştir⁶¹⁻⁶⁵. ROS'lerin radikalik etkilerinin süpürülerek ortadan kaldırılması bir tarafa vitamin C, vitamin E ve glutatyon (GSH) gibi diğer hücrel antioksidantların rejenere edilerek yeniden kullanılabilir forma getirilmesini de ALA'nın sağladığı belirlenmiştir^{66,67,259} ALA ve DHLA'nın hem prooksidant hemde antioksidant özelliklere sahip olduğu bazı çalışmalarda^{119,120,259,260} gösterilmiş olmasına rağmen hem ALA hem de DHLA güçlü antioksidant aktivite gösterir^{261,262} ve hücre içi GSH seviyesini artırmak için glutatyon disülfiti veya dehidroaskorbati redüksiyona uğrattır. En önemli tiyol yapısındaki antioksidant olan GSH, sistemik olarak uygulandığında kan-beyin bariyerini aşmadığı için beyinde sentezlenmek zorundadır. Bu yüzden DHLA hücre içi ve hücre dışı alanlarda beyin antioksidant potansiyelini artırmak için oldukça enteresan bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Son 50 yılda ALA'nın farmakolojik özelliklerine ilişkin araştırmalarda enteresan bir yükselişe tanık oluyoruz⁶⁸. Diabet, ateroskleroz, nöronlardaki dejeneratif prosesler, eklem hastalıkları ve AIDS gibi pek çok hastalığın tedavisinde lipoik asidin faydalı etkilerini doğrulayan yayınların sayısında çok büyük bir artış vardır. Çağdaş tıbbın bu moleküle merakı aslında lipoik asidin redüktif (indirgeme) gücünden kaynaklanmaktadır. Lipoat/dihidrolipoat sisteminin düşük redoks potansiyelinden dolayı diğer antioksidantların okside formlarının redüksiyonunda olduğu gibi ROS'leri nötrleştiren reaksiyonlara oldukça etkili bir şekilde katılır. Antioksidantlar arasında yağda olduğu gibi suda da çok iyi bir şekilde çözünebilen yegâne molekül ALA'dır⁷⁸. Bu yüzden lipoik asit antioksidantların antioksidantı olarak adlandırılır⁶⁸.

2.3.2. Alfa Lipoik Asit'in Başlıca Görevleri:

- * Bütün hücrelerde enerji elde etmek için başlıca yol olan glukoz oksidasyonunun en önemli enzimlerinden birisi olan piruvat dehidrogenaz enzim kompleksinin (PDEC) aktivitesi için koenzim olarak gereklidir.
- * Hücrelerde hasar yapan ROS'lerin etkisizleştirilmesi için gereklidir.
- * Hücre içi ve hücre dışında görev yapan diğer antioksidantların rejenere (yenilenme) edilmesi için gereklidir.
- * Kadmium, arsenik, mangan, bakır, çinko ve civa gibi metallerle birleşerek (kelasyon) onların dokularda toksik etki göstermelerini engeller⁷⁹⁻⁸².

2.3.3. Alfa Lipoik Asit'in Klinik Kullanım Alanları:

Diyabet ve diyabetik nöropatiler: ALA diyabetlerin ve diyabetik nöropatilerin tedavisi için yoğun prelinik ve klinik denemeler altındadır^{83,84}. ALA'nın proteinlerin glikasyon oranını düşürdüğü ve CML oranını azalttığı ispatlanmıştır⁸⁶. Diyabete bağlı olarak gelişen katarakt gelişimi üzerine ALA'nın pozitif etkilere sahip olduğu yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir^{85,87}.

ALA'nın denendiği önemli klinik denemelerde birisi ALADIN programı adlı bir çalışmadır. Bu programda sübjeler deney ve kontrol grubu olarak rastgele ayrılmışlar ve iki körlü ve plasebo kontrollü bir prosedür uygulanmıştır. Tip II diyabetli ve periferik nöropatili toplam 328 hasta bu çalışmaya katılmıştır. Hastalar plasebo ve lipoik asidi 1200, 600 ve 100 mg dozlarda intra venöz olarak 3 hafta boyunca almışlar ve plasebo verilen kontrol gruplarına göre kan glukoz seviyesinin % 24 düşürüldüğü ve plazmada lipit peroksidasyon ürünlerinin % 8 azaltıldığı tespit edilmiştir⁸⁸.

Diyabet üzerine ALA'nın etkilerinin araştırıldığı ve deney hayvanları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar oldukça yoğun bir şekilde günümüzde de sürdürülmektedir. Bir çalışma da deneysel diyabetlilerin laktat ve piruvat konsantrasyonlarında ALA'nın pozitif etkileri gösterilmiştir⁸⁹. Başka bir çalışma da siklohegzimit ile uyarılan diyabette ALA uygulanması hastalık geliştiren hayvanların yüzdesini (yaklaşık %30) ve pankreas adacıklarının enflamasyon sürecini önemli düzeyde azalttı⁹⁰. Diğer yandan insüline resistanslı kaslar ve genetik olarak diyabetli obez hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar ALA'nın kas dokusunda kullanımını %62 oranında düzelttiğini ve glikolizde glikoz oksidasyonunu %30'un üzerinde hızlandırdığını gösterdi. ALA uygulanmasının kaslardaki glikojen konsantrasyonunu artırdığı (%21) ve plazma serbest yağ asidi konsantrasyonunu düşürdüğü (%15–17) ve ratlarda ki insülin resistanslı iskelet kaslarında aerobik ve anaerobik glikoliz oranları ile glikoz transport sistemlerini ileri düzeyde uyardığı gösterilmiştir⁹¹. Bu durum lipoatın pankreasın beta hücreleri üzerine koruyucu etkisine işaret etmektedir. Benzer sonuçlar 10 gün süreyle günde 500 mg lipoik asit enjekte edilen Tip II diyabetli 20 hastayı içeren bir deneyde de elde edildi⁹² (bu deneyde de glukoz kullanımının hızlandırdığı dökümanlanmıştır). Diğer bir çalışmada insüline doku sensitivitesi artırılmış Tip II diyabetli hastalara ALA uygulandığında glisemi seviyesinin düşürüldüğü gösterilmiştir⁹³. Yapılan diğer bir çalışmada γ - linoleik asit ve α -lipoik asit birlikte ratlara verilmiş ve deneysel diyabetik nöropatinin hem elektrofizyolojik ve hem de nörokimyasal uyumunun düzenlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir⁹⁴. Diğer yandan ALA'nın insülin resistansı belirteçlerinin (hiper tansiyon ve hiper glisemi gibi) bir bölümünü azalttığı^{95,96} ve pankreasın Langerhans adacıkları denilen bölgesinde yer alan β -hücrelerinin fonksiyonlarını ve hücre kümelerini koruduğu kaydedilmiştir⁹⁷⁻⁹⁹.

Diyabette ve diyabete bağlı polinöropatiler de LA'nın çok açık bir şekilde farmakolojik olarak yararlı etkilere sahip olduğu son çalışmalarından ortaya çıkmaktadır. Yazarlar diyabet ve nörodejeneratif hastalıklarda ALA ile tedavinin etkinliğini Lipoat/dihidrolipoat sisteminin yalnızca antioksidant özelliklerine atfetmişlerdir. Bu durum ROS süpürme yeteneği ve güçlü bir antioksidan olan glutasyon (GSH) gibi diğer antioksidanların redükte formlarının doku konsantresyonları üzerine önemli bir etkiye sahip olmasından kaynaklandığını vurgulamışlardır.

Nörolojik Hastalıklar: Merkezi sinir sisteminin fonksiyonlarının düzeltilmesi veya korunması üzerine ALA'nın etkilerinin araştırılmasına dair çalışmalar başlangıç aşamasında olmasına rağmen sonuçlar umut vericidir¹⁰⁰. ALA'nın sinir hücreleri üzerine koruyucu etki sergilemek üzere potansiyeli olduğu ilk kez 1968'de oksijen toksisitesi üzerine yayınlanan kapsamlı bir review de anıldı¹⁰¹. Felç, kalp durması, kanama ve kafa yaralanmasına bağlı olarak gelişen beyin hasarı az veya çok artırılmış hipoksia (oksijen yetmezliği) peryodu sonrası dokuların birdenbire yeniden oksijenlenmesi (reperfüzyon)'nin bir sonucudur. İskemik reperfüzyona maruz bırakılan (serebral arter kapatılarak) hayvanlara ALA uygulanması reperfüzyonun etkilerini azalttı, bu hayvanlarda beyindeki ROS seviyesi daha düşüktü, hasarın boyutu azaltıldı ve hayvanların yaşama zamanı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kesinlikle daha uzundu¹⁰²⁻¹⁰⁴. Bir başka çalışmada ALA'nın nöronal hücreleri glutamatın hücresele toksisitesinden koruduğu, hücre içi glutasyon azalmasını engellediği ve nöronal nitrik oksit sentaz enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir¹⁰⁵. San Bruno'da ki Tıbbi Araştırma Merkezinden Byrd, doğum aşamasındaki hamile kadınlara ALA uygulanmasının doğru olabileceğini www.lipoic.com isimli sitede ileri sürdü. O kendi fikrini yeni doğanın sık sık zayıf veya güçlü hipoksia ve daha sonrada yeni doğanın reperfüzyon ve ani yeniden

oksijenlenmesi ile bağlantılı olduğu gerçeği ile destekledi. Repertüzyonda lipoik asitin hücre-koruyucu aksiyonun denenmesinden beri, çalışan kadınlara bu komponentin uygulanmasının çocukta nöronların hızlı kaybını tamamen önleyebileceği ve yeni doğanın sağlığı ve zekâsı üzerine yararlı etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Hücrelerin redoks durumu ile oksidatif stres seviyesi arasındaki karşılıklı ilişkinin doğrulanması ve nörodejeneratif proseslerin ilerleyişi, Parkinson hastalığından ölen hastaların substantia nigra sının nöronlarındaki GSH'nin çok düşük seviyede olduğunu gösteren çalışmalardan kaynaklanmaktadır. Parkinson hastalarının beyinlerinin otopsi çalışmaları ekstra piramidal sistemde dopaminin artırıldığını göstermiştir¹⁰⁶. Artırılmış dopamin, H₂O₂'nin fazla üretilmesine böylelikle de nörotoksik hidroksil radikali (HO.) nin birikmesine yol açar. Yukarıda bahsedildiği üzere ALA hem GSH miktarını rejenere etmekte hem de hidroksil radikalini etkisizleştirmekte böylelikle de antioksidant sistem üzerine etki ederek pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Günümüzde, Parkinson hastalığının patogenezisinde yalnızca mitokondrial bozukluklar ve serbest radikallerin rolü değil aynı zamanda, bu dataların ışığında, tam karşıt olarak günümüze kadar tedavinin altın bir standartı olarak dikkate alınan Parkinson hastalığının tedavisinde direkt dopamin prokürsörü olan L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine)'nin kullanımı ile bir problemin ortaya çıkmış olması da sorgulanmaktadır. Şöyleki hidrojen peroksit üretiminin ve dolayısı ile hidroksil radikali konsantrasyonunun artışının yalnızca dopaminin oksidasyonundan değil aynı zamanda onun prokürsörü olan L-DOPA'nın oksidasyonundan da sonuçlandığı gösterilmiştir¹⁰⁷. Kişilik parçalanması tarafından eşlik edilen hafıza ve bilme kapasitesi kaybı gibi semptomlara sahip olan Alzheimer hastalığı merkezi sinir sisteminin ilerleme yeteneğinde olan bir hastalıdır. Bu hastalığın seyrine ROS'nin de katkıda

bulduğuna inanılmaktadır^{108,109}. Dementia (delilik) teşhisli hastalara verilen ALA'nın hastalığın akışını engellediği iki nörolojik test (MMSE: minimalmental state examinatio, ASAScog: Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale) tarafından doğrulandı¹¹⁰. Bu çalışmalar hazırlık çalışmaları olmakla beraber bazı yazarlar tarafından bu çalışmaların kontrollü bir denemenin metodolojisi ile uymadığının ve Alzhaymer hastalığının akışında ALA'nın potansiyel bir nöroprotektif etkiye işaret edebileceğinin altı çizilmiştir. Ayrıca vasküler demans'ta piruvat dehidrogenaz enzim kompleksinin azaltıldığı ve ALA ilavesi ile bu enzimin aktivitesinin artırıldığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir¹¹¹. Limitli sayıdaki çalışmalarda ALA ve Vit. E içeren antioksidant ilaçların nöropatik sendromları azalttığı ve sinir iletim hızını düzelttiği bulunmuştur¹¹².

AIDS Hastalığı: AIDS tedavisinde ALA'nın kullanımının faydalı etkileri olduğuna dair bazı araştırmalar mevcuttur^{62,113}. Çeşitli çalışmalar ALA'nın AIDS'in tedavisinde önemli olan NF-KB aktifleşmesini önlediğini kanıtlamıştır¹¹⁴. Aktif NF-KB sonuçta apoptozise uğrayacak olan enfekte olmuş T lenfositlerde virüs çoğalmasının hızlanmasına yol açan provirüs HIV'nin belirli DNA bölgelerine bağlanma ile ilgili olabileceği gösterilmiştir¹⁰⁰.

Zararlı Işınlardan Yol Açtığı Hastalıklar: ALA'nın radyoprotektif etkisi Korkina ve arkadaşları tarafından Çernobil kazası izlenerek gözlemlendi¹¹⁵. Kontamine olan alanlarda yaşayan çocuklara 4 hafta süreyle günde 400 mg ALA ve 200 mg Vitamin E verildi. Spontan olarak lökositlerin ışık çıkarma özelliği luminol testi uygulanarak tespit edildi ve her iki uygulamada da bir ay sonra normale geri döndürüldü. Yalnızca çok yüksek doz ALA verilenlerde eritrosit glutatyon düzeyinde önemli bir düşüşe neden oldu. ALA tedavisinin böbrek ve karaciğer fonksiyonlarını normalleştirdiği de anıldı. Diğer yandan

Demir ve arkadaşları ultraviyole radyasyona karşı ALA'nın koruyucu etkisi olduğunu yaptıkları çalışmada ortaya koydular¹¹⁶. ALA'nın zararlı ışınlar karşı koruyucu etkileri göz önüne alınarak deri kremleri üretildiği de literatürde kayıtlıdır¹¹⁷.

Apoptozis ve Kanser: Apoptozis, kontrollü olarak hücrelerin ölmesi anlamına gelirken kanser, bozulan hücresel mekanizmaya bağlı olarak kontrolsüz bir şekilde hücrelerin bölünerek çoğalmasındır. Kanser hücrelerinin bir özelliği de normal apoptozis sürecine karşı koymalarıdır¹¹⁸. Kanser hastalığının tedavi edilmesi amacı ile son yapılan ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında kanserli doku ve hücrelerin apoptozise karşı gösterdikleri direncin kırılmasını sağlayacak muhtemel ilaçların bulunması hedeflenmektedir. ALA bu yönü ile de pek çok araştırmada değerlendirilmiş ve son derece önemli sonuçlar elde edilmiştir. ALA prooksidant (oksidasyon etkisini artırıcı) özelliklere de sahiptir¹¹⁹⁻¹²². Örneğin, ALA doza bağlı olarak kas içi ROS üretimini artırır ve hücre içi oksidant seviyelerini yükselterek adiposit (yağ hücresi)'lere glukoz girişini uyarır¹²¹. Kanser hücrelerinde de ROS'ler hücre büyümesi ve apoptozis regülasyonu aşamalarında hayati bir rol oynar. ALA ve onun redüksiyona uğramış formu olan DHLA'nın proliferasyonunu (hücre bölünmesini) durdurduğu ve çeşitli kanser hücrelerinde ve kanserli hale dönüştürülmüş hücre dizilerinde apoptozisi uyardığı (normal ve kanserli hale dönüştürülmemiş hücre dizilerine karşı çok düşük aktivite göstermesine rağmen) yapılan araştırmalarda gösterilmiştir¹²³⁻¹²⁶. Bununla birlikte ALA'nın apoptozis sürecini başlatmak suretiyle mi veya bir sinyal molekülünü aktive ederek mi apoptozisi uyardığı henüz tamamen açık değildir. Apoptotik süreçte ROS nin rolünün ne olduğu ve bu süreç ile ilişkili özel bir ROS türü'nün rolü olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir. Fakat apoptozis sinyal sistemi boyunca ROS'nin rolü olduğu düşüncesi pek çok araştırma ile desteklenmiştir. Bu

araştırmalardan bazıları: Pek çok apoptozis yapıcı ajanlar tarafından oluşturulan apoptozisi antioksidantlar inhibe etmektedir¹²⁷⁻¹²⁹ apoptozise uğrayan hücrelerde ROS artırılır¹³⁰; dışarıdan uygulanan ROS'ler çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi uyarır^{129,131} ve hücre içi antioksidant seviyelerinin azaltılması apoptotik hücre ölümünü teşvik eder¹³² şeklinde özetlenebilir.

ALA'nın hem pro-oksidant hemde antioksidant olarak etki gösterdiğinin rapor edilmiş olmasından dolayı onun apoptoziste ki rolü ve etki mekanizması henüz tamamen açıklanamamıştır. Bu konuda çok sayıda araştırma yapılmış ve halen de yapılmaktadır. Yapılan araştırmalardan birisinde kanserli hale dönüştürülmüş (HT29) insan kolonu hücrelerinde ALA'nın mitokondrial solunumu ve güçlü bir radikal molekül olan superoksit anyonu (O_2^-)'nun seviyesini artırdığı gösterilirken normal dönüştürülmemiş hücrelerde aynı etkiler gözlenmemiştir¹²⁶. Aynı şekilde başka bir çalışmada ALA'nın kanser hücrelerine dönüştürülmemiş hücreler üzerine minimal etki gösterirken Jurkat, FaDu, and Ki-v-Ras gibi dönüştürülmüş mezenşimal hücreleri içeren çeşitli tümör hücresi kümelerinin apoptozisini uyardığı gösterilmiştir¹²⁵. ALA'nın sağlıklı insan periferel kan monositleri üzerine bir etkiye sahip olmaksızın redoks regülasyonu yolu ile insan lökemik (lösemili) T-hücrelerinin Fas-ayarlı apoptozisini de kuvvetlendirdiğı bildirilmiştir¹²³. Bu çalışmalar ALA tarafından kanser hücrelerinin ölmesinde ROS'nin rolünü ve bir antikanser ajanı olarak ALA'nın potansiyel yararını açıklamaktadır. Kanser hücreleri üzerine ALA'nın etkilerinin araştırıldığı bir makale de ALA'nın, ROS üretimini artırdığı ve insan akciğerinin kanserli epitelyum hücreleri (H460)'nin apoptozisinde artışa yol açtığı rapor ediliyor ve ROS süpürücüleri ve GPx ve SOD gibi antioksidant enzimlerin normalden fazla üretilerek ROS üretiminin engellenmesi yolu ile ALA'nın uyardığı apoptozis etkili bir şekilde inhibe edildiğı ifade

ediliyor. Ayrıca apoptozis sürecinin önemli elemanları olan proteolitik enzimlerden kaspazların inhibitörleri ilave edilerek LA'nın uyardığı apoptozisin engellenebileceği ortaya konulmuştur. Aynı şekilde mitokondrial solunum zincirini inhibe eden 'rotonone' da ALA'nın ROS ve apoptozis oluşturuvcu etkilerini potansiyel olarak engelleyebildiği deneylerle gösterilmiştir. Bu durum ALA'nın oluşturduğu hücre ölümünde ROS'lerin rolü olduğunun ispatı olarak değerlendirilmiştir. Hücrelerde apoptozisi engelleyen faktörlerden birisinde Bcl-2 proteini olduğu vurgulanarak peroksitlere bağılı olarak protein yapılı moleküllerin yıkımının artması ile Bcl-2 miktarının da azaltıldığı yapılan deneylerle belirlenmiştir. Sonuç olarak ta 'ALA prooksidand aktivite göstererek peroksit oluşumunu hızlandırır ve bunu Bcl-2'nin azalmasına bağılı olarak apoptozisin artırılması izler' denilmiştir.

Diğer Hastalıklar:

- * ALA'nın hepatik koma ve hepatit tedavisinde etkili olduğu bildirilmiş ve akut alkol zehirlenmesi esnasında ALA verilmesi tavsiye edilmiştir¹³³.
- * RNA polimeraz II'yi inhibe ederek ve mRNA sentezini bloklayıp zehirlenmeye yol açan α - ve β - amanitin isimli iki mantar metabolitinin neden olduğu zehirlenmelerde ALA başarı ile kullanılmıştır¹³⁴⁻¹³⁶. Hipertansiyon üzerine ALA'nın pozitif etkileri gösterilmiştir^{137,138}.
- * Eklem hastalığının iyileştirilmesi oksidatif strese azalma, enflamatuvar sitokin aktivasyonunun ve NF- κ B DNA bağlama aktivitesinin inhibisyonu ile ilişkili olduğunu kaydeden bir çalışmada ALA'nın in vivo (canlıda) kemik yapı bozulmalarını ve in vitro (deney ortamında-canlı dışında) olarak da osteoklastogenezi engellediği sonuç olaraksa ALA'nın romatoit artrit için yeni ilave bir terapi olabileceğine işaret edilmiştir¹³⁹⁻¹⁴¹.

- * Yaşlılıkla ilgili hastalıkların azaltılması ve egzersizin olumsuzlukları üzerine ALA'nın etkilerine dair yapılan ön çalışmalar umut vericidir⁶².
- * Diğer yandan fakültemiz bünyesinde araştırmalarına devam eden ekibimizin yayın aşamasına getirdikleri son çalışmalarda enflamasyonu engellendiği belirlenmiş ve neredeyse yayın aşamasına gelinmiştir^{142,144}.

2.3.4. Alfa Lipoik Asit'in Klinik Kullanım Dozajı: Araştırmacılar insanlarda 200-1800 mg/gün arasında değişen terapötik dozlar rapor etmişlerdir^{140,141,263-266}. Oral letal doz (LD50) sıçanlar için 1130 mg/kg ve fareler için 502 mg/kg; intra peritoneal letal doz (IP LD50) sıçanlar için 200 mg/kg ve fareler için 160 mg/kg olarak bildirilmiştir⁶⁶.

2.3.5. Alfa Lipoik Asit'in Doğal Kaynakları: ALA'nın glukoz oksidasyonunun çok miktarda gerçekleştirildiği kalp, karaciğer ve kas gibi dokularda daha bol olduğu söylenebilir. Yapılan miktar analizi çalışmalarından birisinde şu sonuçlara ulaşılmıştır. Sığır böbreği (2,6 mg/g ağırlık), sığır kalbi (1,5 mg/g ağırlık), sığır karaciğeri (0,9 mg/g ağırlık), ıspanak (3,2 mg/g ağırlık), brokoli (0,9 mg/g ağırlık) ve domates (0,6 mg/g ağırlık), bal kabağı (0,4 mg/g ağırlık) kırmızı et ve patateste bol miktarda bulunmaktadır²⁶⁷. Diğer yandan bazı firmalar yalnızca ALA içeren preparatların yanı sıra ALA'nında yapısında yer aldığı preparatlarında halkımızın kullanımına sunmuşlardır. Bu tür preparatlar doktorlarımızın önerisi ile hem hastalıkların tedavisini güçlendirmek hemde günlük yaşantımızın getirdiği ekstra olumsuzluklara vücudumuzun mukavemetini artırmak amacı ile günlük düzenli kullanım için eczanelerimizde yer almaya başlamıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Araştırmamız kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda ve biyokimyasal ölçümlerde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company (Germany)'den, ülser deneylerinde kullanılan ilaçlar ve pozitif kontroller ise aşağıda listelendiği gibi farklı firmalardan temin edilmiştir.;

İndometazin	: (Endol kapsül, 25 mg) Deva İlaç
Ranitidin	: (Ranitine tablet, 150 mg) Biofarma İlaç
Lansoprazol	: (Lansor kapsül, 30 mg) Sanovel İlaç
Sodyum pentotal	: (Pentothal sodium flakon, 500 mg) Abbot Lab.

3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal 32 R
UV-visible spektrofotometre	: Thermo Spectronic-HELIOS β
pH metre	: Schott CG 842
Hassas terazi	: Scaltec SPB 31
Derin dondurucu	: Sanyo MDF - 235
Magnetik karıştırıcılar	: Boeco MSH 300
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Buzdolabı	: Profilo
Distile su cihazı	: GFL 2012
Çalkalayıcılı su banyosu	: Memmert
Homojenizatör	: Ika-Werke
Döner buharlaştırıcı (evaporatör)	: BSI
Kompresör	: Milipore
UV lambası 254nm - 366nm	: Model Mineralight
Liyofilizatör	: Labconco

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları:

SOD Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu): 1.7 g KH_2PO_4 ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve sonra hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

SOD Ölçüm Karışımı:

- A - 0.3 mM Ksantin: 0.0018 g Ksantin alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 40 ml'ye tamamlandı.
- B - 0.6 mM EDTA: 0.0035 g EDTA alındı, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlandı (2 damla 5 M NaOH ile çözünür).
- C - 150 μM NBT (Nitro blue tetrazolium): 0.0024 g NBT alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.
- D - 0.4 M Na_2CO_3 : 0.5088 g alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 12 ml'ye tamamlandı.
- E - 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartıldı, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 6 ml'ye tamamlandı.

SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (167 U/L Xanthine oksidaz): Orijinal ambalajından (1 ml sinde 32 mg protein ve 0.3 U enzim ihtiva eden enzim) 34.79 μl alındı ve üzerine 2 ml soğuk 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi eklendi.

SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$): 0.7928 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alındı, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 3 ml ye tamamlandı. Bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı ve +4°C'de saklanarak soğuk olarak kullanıldı.

SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.8 mM CuCl_2): 0.0108 g CuCl_2 alındı, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

CAT Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, %1 Triton X-100 içeren Fosfat Tamponu): 1.7 g KH_2PO_4 ve 2.5 ml Triton X-100 alınarak 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir

pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve sonra hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

CAT Ölçüm Karışımı (40 mM, pH 7'de H₂O₂ içeren 50 mM Fosfat Tamponu): 1020 µl H₂O₂ ve 1.7 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.0'ye ayarlandı ve sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

GST Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu): 1.7 g KH₂PO₄ ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

GST Ölçüm karışımı (0,11 M Fosfat Tamponu): 3.02 g KH₂PO₄ alınarak 75 ml saf suda çözüldü, pH'ı pH metre kullanılarak 6.5'e ayarlandı ve son hacim 200 ml olacak şekilde saf su ile seyreltildi.

A - 30 mM Glutasyon çözeltisi: 0.046 g glutasyon tartıldı, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 5 ml'ye ayarlandı.

B - 30 mM CDNB: 0.03 CDNB tartıldıktan sonra az bir miktar %99.9 saflıktaki etil alkolde çözüldü ve hacmi aynı etil alkol ile 5 ml'ye tamamlandı.

MPO Homojenat Tamponu (50 mM, pH 6.0 olan ve % 0.5 HTAB [MA, 364.5-hexadecy three methyl ammonium bromide] içeren Fosfat Tamponu):

1.02 g KH₂PO₄ ve 0.75 g HTAB alınarak 125 ml saf suda çözüldü, pH'ı pH metre ile 6.0'a ayarlandı ve hacmi saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.

MPO Ölçüm karışımı 50 mM KH₂PO₄ pH 6'sı (MA, 136.09) olan 0.167 mg/ml o-dianizidin-HCl ve % 0.0005 H₂O₂ içeren 45 ml ölçüm karışımı):

A - 0.167 mg/ ml o-dianizidin-HCl 45 ml: (MA, 317.2), 7.5 mg o-dianizidin-HCl

B - % 0.0005 H₂O₂ (%30'luk tan) 45 ml için: 83.3 µl % 30'luk H₂O₂'den alınarak 500 ml ye tamamlanmış çözeltiden 4.5 ml alındı.

C- 50 mM KH₂PO₄ pH 6,0: 0.3062 g KH₂PO₄ alındı.

Bu üç tartım alındı. 40 ml saf suda çözüldü, pH'ı 6,0'a ayarlandı ve hacmi saf su ile 45 ml ye tamamlandı.

GSH Homojenat Tamponu (50 mM, pH 7.4, Tris - HCl Tamponu):

1.514 g Tris-HCl 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.4'e ayarlandı ve sonra hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlandı.

GSH Ölçüm Tamponu (200 mM pH 8.2, 0.2 mM EDTA içeren Tris-HCl Tamponu):

6.05 g Tris-HCl ve 0.0146 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 8.2'ye ayarlandı ve sonra hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlandı.

GSH miktarını ölçmek için gereken çözelti (10 mM DTNB):

0.03963 g DTNB alındı ve bir miktar metil alkolde çözümlenerek hacmi yine metil alkol ile 10 ml ye tamamlandı.

LPO Homojenat Tamponu (% 10 KCl):

10 g KCl alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

LPO Ölçüm karışımı:

A - % 8 Sodyum lauril sülfat (SLS): 0.8 g SLS alınıp bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

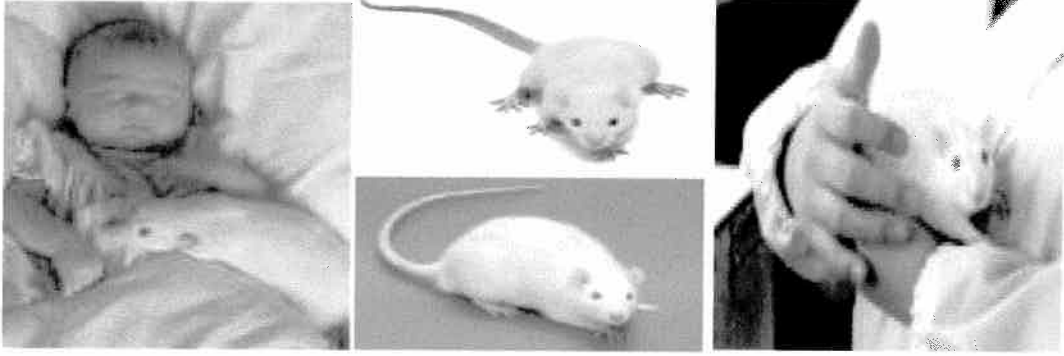
B - % 0.08 Tiyobarbitirik (TBA): 0.48 g TBA alınarak 1-2 damla 1 M NaOH çözeltisi ilavesi ile bir miktar saf suda çözüldü. Daha sonra distile su ile hacmi 60 ml ye tamamlandı.

C - % 20 Asetik asit: 13 ml glasiyel asetik asit alındı, üzerine 65 ml saf su eklendi.

3.4. Deney Hayvanları:

Tez çalışmalarında 180–200 g ağırlıkta 60 adet erkek Albino Wistar ratlar (Şekil 6) kullanılmıştır. Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarından temin edildi ve deneyler Tıp Fakültesi,

Farmakoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Hayvanlar deneye alınmadan önce gruplara ayrıldı ve standart şartlar altında muhafaza edildi ve beslendi²⁶⁸.



Şekil 6. Araştırmada kullanılan Wistar ratları gösteren fotoğraflar.

3.5. İndometazin (IND) ile Ratlarda Ülserinin Oluşturulması ve Alfa Lipoik Asit (ALA), Ranitidin (RAN) ve Lansoprazol (LAN)'un Uygulanması:

IND ile uyarılan gastrik hasarlı doku üzerine ALA'nın antiülser etkilerini araştırmak üzere yapılan bu çalışma, Guidobono ve arkadaşlarının yöntemi temel alınarak bazı değişiklikler yapılmak suretiyle gerçekleştirildi^{17,269}.

Deney prosedürü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

1. Her bir grupta 6 adet rat kullanılarak deney grupları oluşturuldu ve bir gün boyunca aç bırakıldı. Bu gruplar;
 - a) İndometazin (IND) grubu: Ülser gelişimini kontrol etmek amacıyla sadece indometazinin verildiği grup (negatif kontrol),
 - b) Referans grupları: Ülser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ranitidin ve lansoprazol gibi ticari referans ilaçların verildiği gruplar,

- c) Sağlıklı grup (kontrol): İndometazinin ũlser yapıcı etkisini ve enzim aktivitesindeki değişikleri sağlıklı dokularla mukayese edebilmek için hiçbir maddenin verilmediği grup,
- d) Uygulama grupları: Antiũlser etkisini incelemek ũzere ALA'nın altı farklı dozunun verildiği gruplardır.
2. Hayvanlar aç bırakıldıktan bir gũn sonra, her bir uygulama grubunda bulunan ratlara; ALA farklı dozlarda (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg) olmak ũzere saf suda ozũlerek oral yoldan steril metal bir sonda ile verildi. Referans gruplarına ise ranitidin (25 mg/kg) ve lansoprazol (30 mg/kg) ayrı ayrı saf suda preparatları hazırlanarak oral yoldan steril metal bir sonda ile verildi. Sağlıklı gruba ise saf su verildi ve diğer hayvanlar ile aynı Şartlar altında (oda, sıcaklık, nem, gũneŐ ışığı, karanlık vb.) muhafaza edildi.
 3. Yukarıda belirtilen tũm maddeler belirtilen doz ve miktarlarda oral olarak verildikten 5 dakika sonra tũm sıçanlara aynı Şekilde oral yolla IND (25 mg/kg dozda) verildi.
 4. IND verilmesinden 6 saat sonra yũksek dozda anestezik madde (thiopental sodium 50 mg/kg) kullanılarak tũm gruplardaki hayvanlar sakrifiye edildi ve mideleri çıkarıldı.
 5. Mideler bũyũk kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandı ve makroskopik olarak incelendikten sonra tũm sıçan gruplarına ait mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı.
 6. ALA'nın antiũlser ve antioksidant etkileri, makroskopik ve biyokimyasal analizler yapılarak belirlendi. ALA verileni gruplardan elde edilen sonuçlar, IND ve referans ilaçlarının verildiği gruplardan elde edilen sonuçlar ile mukayese edildi.

3.6. Mide Dokusunun Makroskopik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi

3.6.1. Mide Dokusunun Makroskopik İncelenmesi: Gastrik lezyonların belirlenmesi için rat mideleri makroskopik değerlendirmeye alındı ve rat mideleri, büyük kurvatur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra ülser sayısı ve alanları tespit edildi. Ülser alan genişlikleri milimetrik kâğıt kullanılarak bir büyüteç yardımıyla ölçüldü. ALA ve referans ilaçlar (RAN ve LAN)'ın antiülser etkileri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Antiülser etki (\%)} = \frac{\text{İG}-\text{DG}}{\text{İG}} \times 100$$

(İG İndometazin grubu ülser alanını, DG ise deney gruplarının ülser alanını göstermektedir)

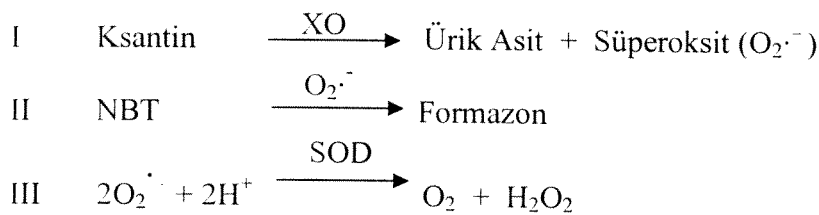
3.6.2. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi: Antiülser deneylerinden sonra üç gün içerisinde biyokimyasal incelemeler için -20°C de saklanan mide dokularındaki enzim aktivitelerini ölçmek üzere mide dokularından homojenatlar hazırlandı. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda SOD, CAT, GST ve MPO enzim aktiviteleri ile GSH ve LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında, üç paralel tekerrür olarak gerçekleştirildi.

3.6.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması: Mide dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. Her bir rat grubu dokularından 0,5 g tartıldı, üzerlerine 4,5 ml tampon çözeltilerden (her parametre için farklı bir tampon sistemi kullanılarak) ilave edilerek 1/10 oranında seyreltildi. Bu homojenatlar sonra

homojenizatörde 10 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar bir süzgeç kağıdından süzildükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4°C'de santrifüj edildi ve hazırlanan bu süpernatantlarda biyokimyasal araştırmalar yapıldı^{181,207,208,270,271}.

3.6.2.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri, şayet ortamda NBT (nitrobluetetrazolium) mevcutsa, NBT ile reaksiyona girerek formazon boyası oluştururlar. Bu bileşik 560 nm dalga boyunda maksimum absorbanans verir. Şayet ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H₂O₂'ye dönüştürüldüğü için formazon oluşumu azalacak buna bağlı olarak da 560 nm'de ölçülen absorbanans azalacaktır. Absorbanstaki azalmanın miktarı bize SOD aktivitesini verecektir. Özetle; SOD aktivitesi aşağıda verilen II nolu reaksiyonun inhibe edilme derecesiyle ölçülebilmektedir.



SOD ölçümü: SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları (1988) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü²⁷². Mide dokuları homojenize edildikten sonra 18.000 g'de 1 saat santrifüj edildi. Cam bir spektrofotometre küvetine 2450 µl ölçüm karışımı (0,3 mM ksantin, 0,6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0,4 M Na₂CO₃, 1,2 g/L BSA), 500 µl supernatant, 50 µl ksantin oksidaz eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkubasyon bırakıldı ve 100 µl 0,8 mM CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

SOD aktivitesi'nin hesaplanması: Oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik kuvartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EU) elde edildi ve SOD aktivitesi *mmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.

$$\text{EU/mg doku} = \Delta A_{\text{kör}} - \Delta A_{\text{numune}} / \Delta A_{\text{kör}}$$

3.6.2.3. Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: Aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂'nin CAT vasıtasıyla suya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbands azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Harcanan H₂O₂ miktarından CAT aktivitesi aşağıda bahsedilen yöntemeye göre hesaplanmıştır.

CAT ölçümü: CAT'ın aktivitesi Aebi'nin belirttiği kurallar uygulanarak ölçüldü²⁷³. 0,5 g doku alınarak üzerine 4,5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,8) ilave edilerek homojenize edildi. Oluşan homojenat 18.000 g'de 4°C'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar katalaz aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H₂O₂ çözeltisinden 1,5 ml konularak numune çözeltisinden 1,5 ml ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet alt üst etme sonrası spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 15 saniye aralıkla 3 dakika süreyle ölçülerek absorbands azalması köre karşı kaydedildi.

CAT aktivitesi'nin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, azalma katsayısı (ΔH_2O_2), 0,00394 ($mmol^{-1} \times mm^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 240 nm'de, dakikada 1 mmol H_2O_2 'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak $mmol/min = A/39,4 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. CAT aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *mmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi. Deneyler 3 tekrar yapılarak verildi.

3.6.2.4. Glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: GST ölçüm ortamındaki 1-kloro 2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile ortama ilave edilen glutatyon 340 nm'de ölçülebilen bir kompleks oluşturmaktadır. GST bu kompleks oluşumunu katalizlediği için oluşan renk şiddeti ile GST aktivitesi arasında doğru orantı vardır. Böylece 340 nm'de ölçülen renk şiddetinden GST aktivitesi kolayca hesaplanabilir.

GST ölçümü: Rat mide dokusundan elde edilen homojenatların GST aktiviteleri Habig ve Jakoby tarafından belirtilen prosedür doğrultusunda belirlendi²⁷⁴. Son konsantrasyonları: 0,1 M KH_2PO_4 tamponu (pH 6,5), 1 mM CDNB ve 1 mM glutatyon olacak şekilde reaktifler 3 ml'lik kuvartz küvete pipetlendi. GSH katılır katılmaz küvet altüst edilerek absorbanslar 3 dakika boyunca ve 15 saniyede bir kaydedildi. 3 dakikalık zaman aralığındaki absorbans değişiminin lineer olduğu kısımdan dakika başına absorbans değişimi tesbit edildi.

GST aktivitesinin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans artışı olan aralıktan dakika başına absorbans azalması ile hesaplandı. Işık yolu (b)= 10 mm, ekstinksiyon katsayısı (ϵ)=9,6 ($\text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 340 nm'de, dakikada 1 mmol konjugatın üretilmesini sağlayan enzim miktarı (EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak $\text{mmol}/\text{min} = (A / 9,6) \times 300$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. GST aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *nmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi. Deneyler 3 tekrar yapılarak verildi.

3.6.2.5. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: MPO enzimleri nötrofillerin solunum patlaması esnasında H_2O_2 vasıtası ile hipoklorik asit üretirler ve kofaktör olarak Hem'e ihtiyaç duyarlar. Aktivite ölçüm ortamındaki H_2O_2 , MPO vasıtasıyla harcanırken oluşan hipoklorit absorbansta bir artışa sebep olur. Ölçüm prensibi, meydana gelen absorbans artışının 460 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Oluşan hipoklorit miktarından MPO aktivitesi hesaplanabilir.

MPO ölçümü: MPO aktivitesi Bradley'in belirttiği yöntem esas alınarak ölçüldü²⁷⁵. 0,1 g doku alınarak üzerine 10 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ilave edilerek homojenize edildi. Oluşan homojenat 3500 g 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar MPO aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2,8 ml ölçüm tamponu, 0,12 ml homojenat tamponu ve 0,12 ml numune çözeltisinden ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet spektrofotometrede 460 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla ve 5 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedildi.

MPO aktivitesi'nin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}$), 0,00394 ($\mu\text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 460 nm'de, dakikada 1 mmol H_2O_2 'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak $\text{mmol}/\text{min} = A/39,4 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. MPO aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol}/\text{dakika}/\text{mg doku}$ olarak tarif edildi. Deneyler 3 tekrar yapılarak verildi.

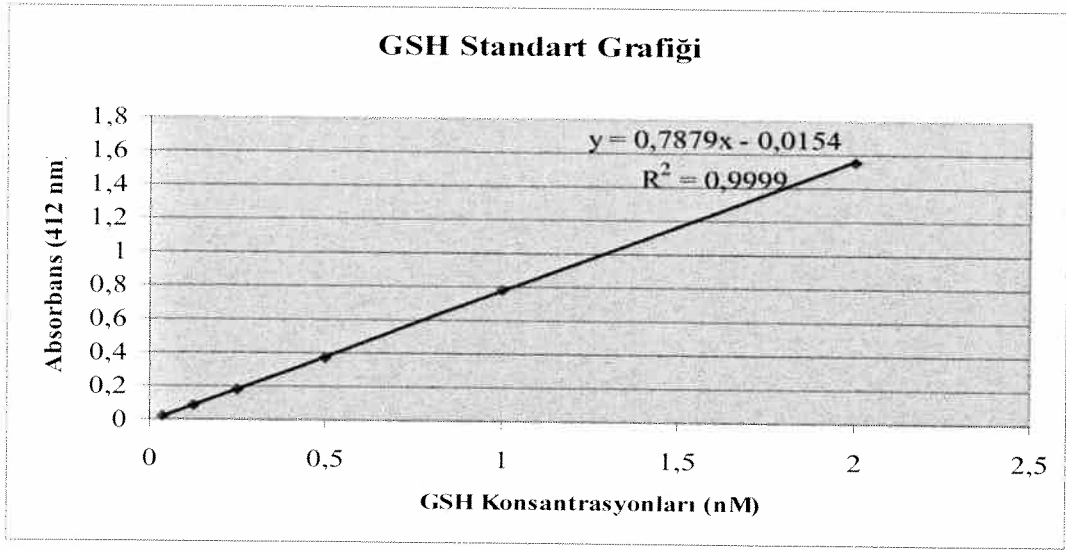
3.6.2.6. Total glutatyon (GSH) miktarı ölçümü:

Ölçüm prensibi: Ölçüm ortamındaki DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] disülfid bir kromojendir ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Meydana gelen sarı renk 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

GSH miktarının ölçülmesi: Sedlak ve Lindsay'in geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi²⁷⁶. 0,5 g doku üzerine 4,5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 12.000 g 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 1500 μl ölçüm tamponu (0,2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH = 8,2), 500 μl süpernatant, 100 μl DTNB ve 7900 μl metanol pipetlenerek vortekslendi. Karışım 37°C'ta 30 dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra ölçümleri alındı.

GSH miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 412 nm'de 3 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden

hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten (Şekil 8) yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, *nmol/mg doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak belirlendi.



Şekil 7. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

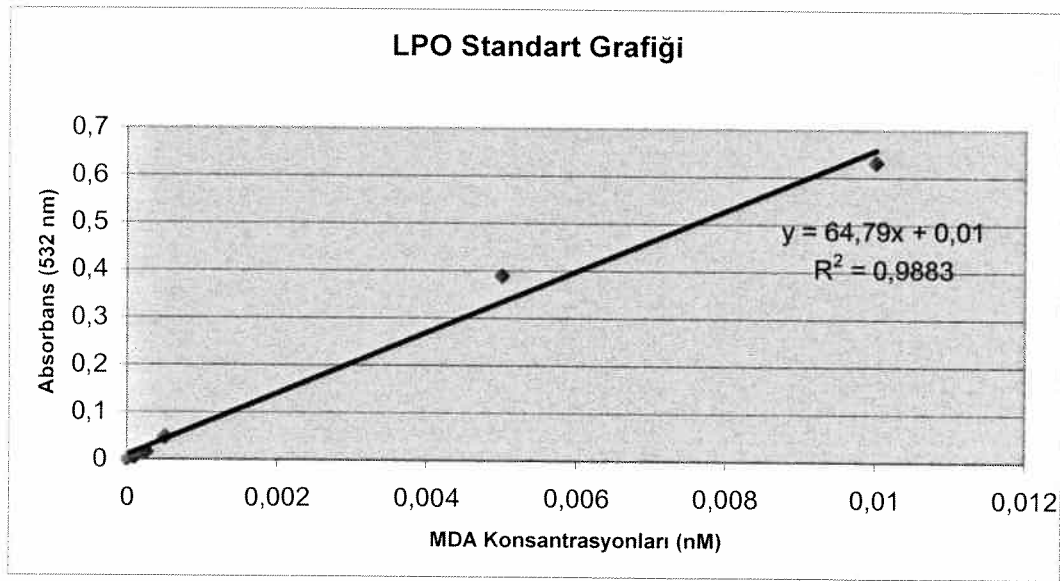
3.6.2.7. Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü:

Ölçüm prensibi: Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu LPO'nun son ürünlerinden olan MDA düzeyini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyonu temel alır. Bir molekül MDA iki molekül TBA ile stabil kırmızı renk oluşturmak üzere reaksiyona girer. LPO ölçümü, Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre MDA'nın asidik ortamda TBA ile oluşturduğu rengin 532 nm'de ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı²⁷⁷.

LPO ölçümü: 0,5 g doku üzerine 4,5 ml %10 KCl ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 5000 g 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO

miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl %8 sodium lauril sulfat (SLS), 750 µl %20 asetik asit, 750 µl %0,08 TBA ve 150 µl distile su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100°C'ta 60 dakika inkubasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml *n*-bütanol ilave edildi ve ölçüm alındı.

LPO miktarının hesaplanması: Oluşan kırmızı renk miktarları 532 nm'de 3 ml'lik cam küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler yapıldı (Şekil 8). Numunelerin LPO miktarları, *nmol MDA/g doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.



Şekil 8. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

3.7. İstatistiksel Analizler

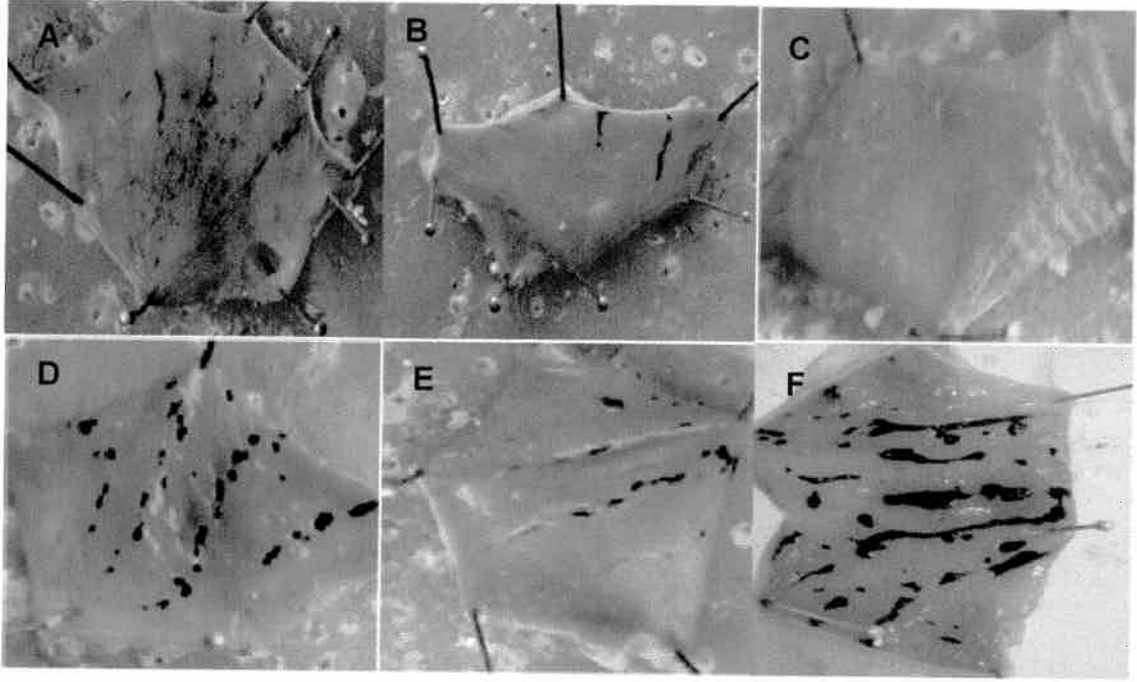
İstatistiksel analizler SPSS 13.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri one-way variance analyzes (ANOVA) testi ile belirlendi ve $p < 0,05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı ve sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklı gruplar farklı harflerle temsil edilecek şekilde sunuldu.

4. BULGULAR

Yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz veriler, bu bölümde tablo ve şekiller ile gösterilmiştir. Bulgularımızı sunuş şeklimiz öncelikle ülser deneylerine ait bulguların değerlendirilmesi ve daha sonrada biyokimyasal bulguların değerlendirilmesi şeklinde olacaktır. Ülser deneylerinden elde edilen bulgular tablo ve şekillerle izah edilmeye çalışılacak bu sunumları biyokimyasal bulguların değerlendirilmesi izleyecektir. Her deneye ait veriler tablo halinde verilecek ve değişik muamele grupları arasındaki farkın daha iyi görülmesi amacıyla da tablonun hemen altında diyagramlar halinde sunulacaktır. Tablo olarak verilen bulgular, 3 tekerrür olarak yapılan deney sonuçlarının ortalaması \pm standart hata (SE) olarak sunulmuştur. Bütün verilere SPSS 13.0 software kullanılarak *one-way variance analyzes (ANOVA)* testi uygulanmış ve $p<0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulanmış ve istatistiksel olarak farklı olan her grup farklı bir harf ile belirtilmiştir.

4.1. İndometazin ile Oluşturulan Ülser Modeli Üzerine Deneysel Bulgular:

Yaptığımız *invivo* deneylerden elde ettiğimiz veriler, bu bölümde Tablo ve Şekiller ile gösterilmiş olup IND grubuna göre mukayeseler “antiülser etki (%)” olarak ifade edilmiştir. Ülkemizde ülser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ticari ilaçlardan H₂ reseptör antagonistleri (HRA) ve proton pompa inhibitörleri (PPI) deneylerimizde referans ilaç olarak, antiülser etkinin derecesinin anlaşılabilmesi amacıyla kullanılmıştır. H₂ reseptör antagonisti olarak ranitidin (RAN), proton pompa inhibitörü olarak ise lansoprazol (LAN) seçilmiştir. Ülser gelişiminin tespitinde negatif kontrol olarak indometazin (IND) kullanılmıştır (Şekil 9). Her deneye ait veriler çizelgeler halinde sunulmuştur. Bulgular kısmında çizelge halinde sunulan veriler, 3 tekerrür olarak yapılan deney sonuçlarının ortalaması \pm standart hata (SE) olarak verilmiştir.



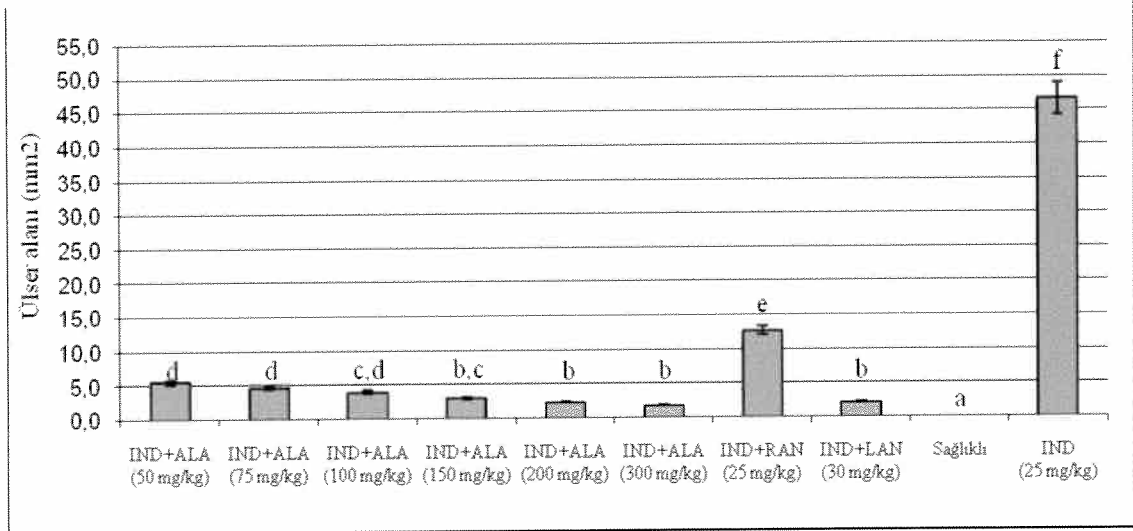
Şekil 9. İndometazin (IND) uygulaması sonrasında sağlıklı ve muamele grubu sıçanlara ait mide dokularının makroskobik görünümü. [C: Muamele edilmemiş (sağlıklı), F: Yalnızca IND (25 mg/kg) ile muamele edilmiş, A, B, D, E: IND (25 mg/kg) + ALA, RAN veya LAN ile muamele edilmiş sıçan midesi].

ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozlarda indometazinin neden olduğu gastrik hasarları önemli oranda azaltmıştır (Tablo 1 ve Şekil 9,10) ($p < 0,05$). ALA'nın her bir dozu sırasıyla %88.2, 89.9, 91.4, 93.5, 95.1 ve 96.1 oranında etki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer yandan araştırmamızda, RAN'ın %72.3 oranında; LAN'ın %95.3 oranında IND'nin oluşturduğu ülseri azalttığı belirlendi. Referans ilaçlardan RAN ile karşılaştırıldığında ALA'nın tüm dozlarının daha yüksek oranda ($p < 0,05$); LAN ile karşılaştırıldığında ALA'nın 50, 75 ve 100 mg/kg dozlarının LAN'dan daha düşük ($p < 0,05$) 150 mg/kg dozunun LAN'a eşit ($p \leq 0,05$), 200 ve 300 mg/kg dozlarının ise LAN'dan daha yüksek ($p < 0,05$) oranda ülser oluşumunu engellediği belirlendi. Bu bulgulara göre ALA'nın oldukça yüksek bir antiülserojenik aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

Tablo 1. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün rat midelerinde deneysel olarak indometazin (IND) ile oluşturulan ülserler üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	Ülser alanı (mm ²)	% Inhibition [§]
IND+ALA	6	50	5.5±0.7d	88.2*
IND+ALA	6	75	4.7±0.5d	89.9*
IND+ALA	6	100	4.0±0.4c,d	91.4*
IND+ALA	6	150	3.0±0.4b,c	93.5*
IND+ALA	6	200	2.3±0.3b	95.1*
IND+ALA	6	300	1.8±0.5b	96.1*
IND+RAN	6	25	12.7±1.0e	72.3*
IND+LAN	6	30	2.2±0.6b	95.3*
IND	6	25	46.5±0.4f	0
Sağlıklı	6	-	0.0±0.0a	-*

ALA'nın altı; RAN ve LAN'ın ise tek dozu ratlara verilmiş ve sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farksızdır ($\alpha=0.05$). IND grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan farklı gruplar ($p<0.05$) * ile gösterilmiştir. [§] % olarak IND'ye göre hasar alanlarındaki inhibisyon miktarını ifade etmektedir.



Şekil 10. Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun IND tarafından rat midelerinde oluşturulan ülserler üzerine etkilerini gösteren diyagram.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. SOD aktivitesi üzerine alfa lipoik asit (ALA)'in etkileri: ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen SOD aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 11'de gösterilmiştir. SOD aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *mmol/dakika /mg doku* olarak tarif edilmiştir.

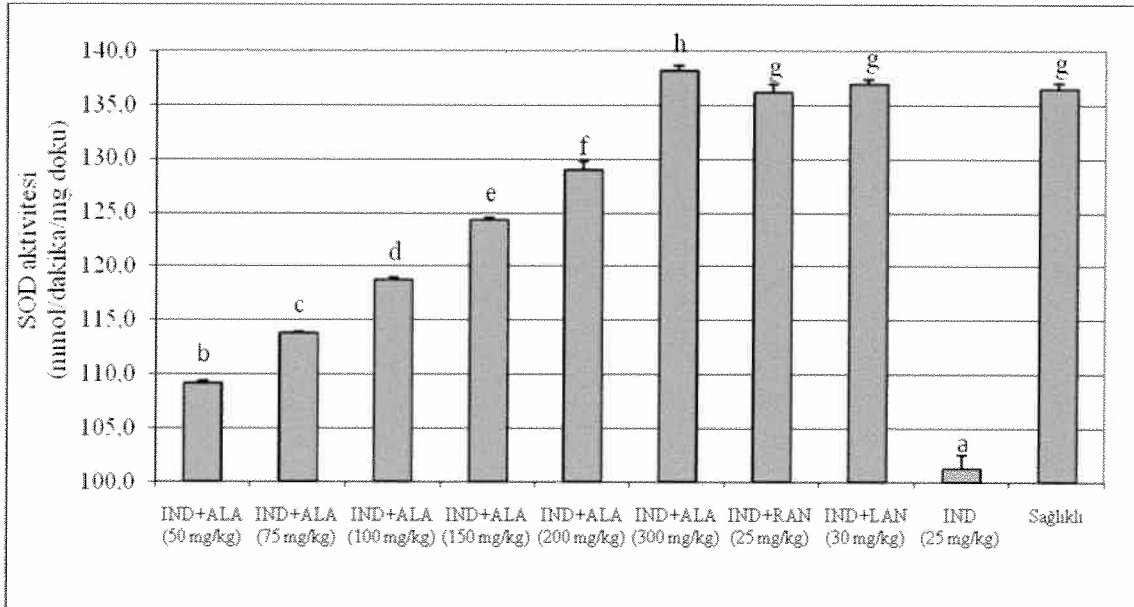
Tablo2'den görüldüğü üzere SOD aktiviteleri kontrol grubunda 136.5 ± 0.3 , IND grubu midelerinde 101.2 ± 0.2 , RAN grubunda 136.1 ± 0.3 , LAN grubunda 137.0 ± 0.2 ve IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 109.2 ± 0.2 , 113.8 ± 0.2 , 118.7 ± 0.6 , 124.3 ± 0.3 , 129.0 ± 0.2 ve 138.2 ± 0.2 olarak tespit edilmiştir. Tablo 2 ve Şekil 11 de görüleceği gibi IND'nin önemli oranda ($p < 0.05$) azalttığı SOD aktivitesini, ALA'nın 5 dozu (50, 75, 100, 150 ve 200 mg/kg) kontrol seviyesine artırmış ($p < 0.05$) hatta 300 mg/kg dozda kontrol seviyesi üzerine çıkarmıştır ($p < 0.05$). Referans ilaçlarda ALA'ya benzer şekilde uygulandıkları dozlarda IND'nin azalttığı SOD aktivitesini kontrol seviyesine çıkarmışlardır ($p \leq 0.05$).

Tablo 2 ve Şekil 11 da görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen SOD aktivitesinde ki inhibisyon ($p < 0.05$) uygulanan ALA'nın 200 ve 300 mg/kg dozları ve referans ilaçlar tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol seviyesine yaklaştırmıştır. Bu bulgular ALA, RAN ve LAN'ın SOD aktivitesi üzerine aktive edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 2. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	SOD aktivitesi (mmol/dakika/mg doku)	% Aktivite
IND+ALA	6	50	109,2±0,2b	80.0*
IND+ALA	6	75	113,8±0,2c	83.4*
IND+ALA	6	100	118,7±0,6d	86.9*
IND+ALA	6	150	124,3±0,3e	91.1*
IND+ALA	6	200	129,0±0,2f	94.6*
IND+ALA	6	300	138,2±0,2h	101.2*
IND+RAN	6	25	136,1±0,3g	99.7*
IND+LAN	6	30	137,0±0,2g	100.4*
IND	6	25	101,2±0,2a	74.1
Sağlıklı	6	-	136,5±0,3g	100.0*

ALA'nın altı; RAN ve LAN'ın ise tek dozu ratlara verilmiş ve sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$). IND grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan farklı gruplar ($p<0.05$) * ile gösterilmiştir.



Şekil 11. Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.2.2. CAT aktivitesi üzerine alfa lipoik asit (ALA)'in etkileri:

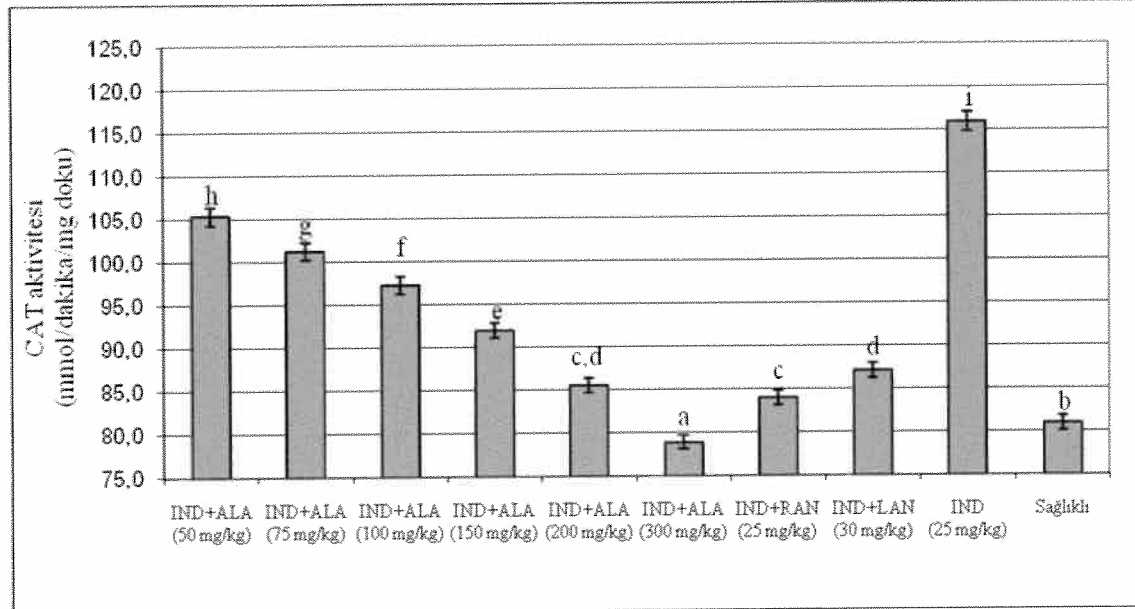
ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen CAT aktivitesini gösteren sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 12'de gösterilmiştir. CAT aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *mmol/dakika /mg doku* olarak tarif edilmiştir.

Tablo 3'den görüldüğü üzere CAT aktivitesi kontrol grubunda 81.0 ± 0.8 , IND grubu midelerinde 115.9 ± 0.4 , RAN grubunda 83.9 ± 0.4 , LAN grubunda 87.1 ± 0.9 ve IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 105.3 ± 0.6 , 101.2 ± 0.2 , 97.2 ± 0.5 , 91.9 ± 0.3 , 85.5 ± 0.6 ve 78.9 ± 0.5 *mmol/dakika/mg doku* olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND'nin önemli oranda ($p < 0.05$) artırdığı CAT aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan RAN ve 200 mg/kg ALA sağlıklı ile neredeyse aynı seviyeye getirmiş, 200 mg/kg ALA ise dahada aşağıya düşürmüştür ($p < 0.05$). CAT aktivitesi üzerine hem referans ilaçlar RAN (103.6) ve LAN (107.5) hemde ALA'nın bütün dozları pozitif yönde etki göstererek kontrol (%100) seviyesine yaklaştırmıştır (Tablo 3. , Şekil 12.). Diğer yandan, ALA'nın tüm dozlarının CAT aktivitesini doz artışına bağlı olarak kontrol seviyesine azalttığı ($p < 0.05$) da oldukça dikkat çekicidir. Bu bulgular ALA, RAN ve LAN'ın CAT aktivitesi üzerine inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	CAT aktivitesi (mmol/dakika/mg doku)	% Aktivite
IND+ALA	6	50	105.3±0.6h	130.0*
IND+ALA	6	75	101.2±0.2g	124.9*
IND+ALA	6	100	97.2±0.5f	120.0*
IND+ALA	6	150	91.9±0.3e	113.5*
IND+ALA	6	200	85.5±0.6c,d	105.6*
IND+ALA	6	300	78.9±0.5a	97.4*
IND+RAN	6	25	83.9±0.4c	103.6*
IND+LAN	6	30	87.1±0.9d	107.5*
IND	6	25	115.9±0.4i	143.1
Sağlıklı	6	-	81.0±0.8b	100.0*

ALA'nın altı; RAN ve LAN'ın ise tek dozu ratlara verilmiş ve sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$). IND grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan farklı gruplar ($p<0.05$) * ile gösterilmiştir.



Şekil 12. Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.2.3. GST aktivitesi üzerine alfa lipoik asit (ALA)'in etkileri: ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GST aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 13'de gösterilmiştir. GST aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *nmol/dakika /mg doku* olarak tarif edilmiştir.

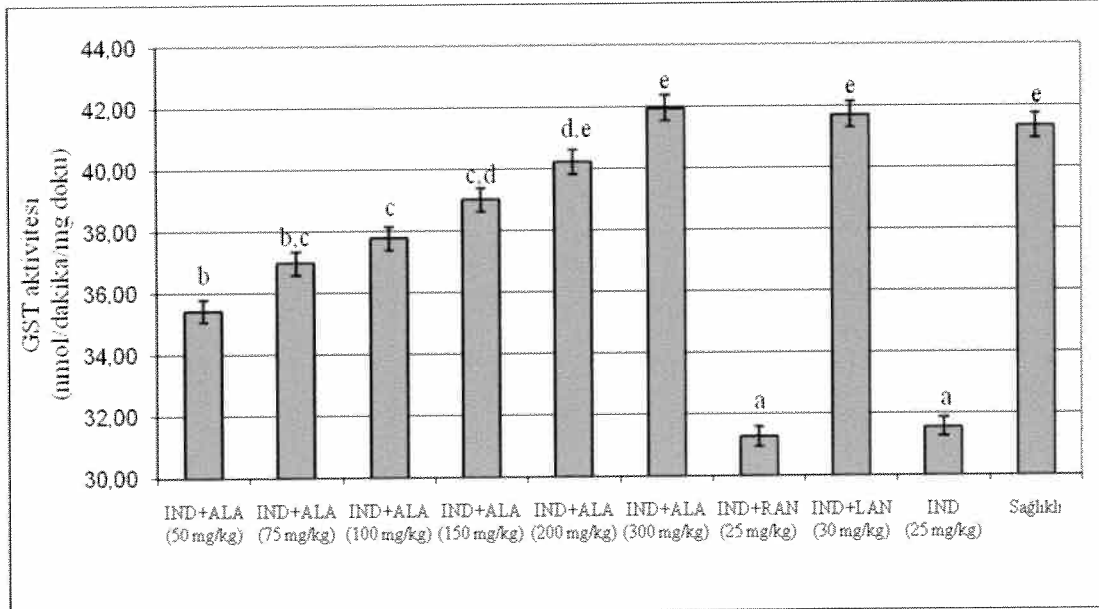
Tablo 4'den görüldüğü üzere GST aktiviteleri kontrol grubunda 41.33 ± 0.91 , IND grubu midelerinde 31.57 ± 0.88 , RAN grubunda 31.27 ± 1.18 , LAN grubunda 41.70 ± 1.21 ve IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 35.43 ± 0.61 , 36.97 ± 0.39 , 37.77 ± 0.37 , 39.00 ± 0.32 , 40.20 ± 0.31 ve 41.93 ± 0.39 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND'nin önemli ($p < 0.05$) düzeyde azalttığı GST aktivitesini ALA'nın 50, 75, 100 ve 150 mg/kg dozlarının değişen seviyelerde önemli ($p < 0.05$) artışlar sağladığı 200 ve 400 mg/kg dozlarının ise kontrol seviyesine artırdığı belirlendi ($p \leq 0.05$). İlaveten referans ilaç olarak kullandığımız pozitif kontrollerden LAN'da ALA'ya benzer şekilde GST aktivitesini sağlıklı kontroller seviyesine ($p \leq 0.05$) çıkardığı fakat ilginç bir şekilde de RAN'ın ise GST aktivitesi üzerine hiç etki göstermediği ($p > 0.05$) de kaydedeğer olarak not edilmelidir.

Tablo 4 ve Şekil 13'dan da görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GST aktivitesinde ki inhibisyon ($p < 0.05$) IND ile birlikte uygulanan 200 ve 300 mg/kg ALA ve LAN tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($p \leq 0.05$). Bu bulgular ALA'nın IND ile birlikte uygulandığında GST aktivitesini artırıcı etkisinin olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon *s*-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GST aktivitesi (nmol/dakika/mg doku)	% Aktivite
IND+ALA	6	50	35.43±0.61b	85.72*
IND+ALA	6	75	36.97±0.39b,c	89.45*
IND+ALA	6	100	37.77±0.37c	91.39*
IND+ALA	6	150	39.00±0.32c,d	94.36*
IND+ALA	6	200	40.20±0.31d,e	97.27*
IND+ALA	6	300	41.93±0.39e	101.45*
IND+RAN	6	25	31.27±1.18a	75.66
IND+LAN	6	30	41.70±1.21e	100.90*
IND	6	25	31.57±0.88a	76.39
Sağlıklı	6	-	41.33±0.91e	100.0*

ALA'nın altı; RAN ve LAN'ın ise tek dozu ratlara verilmiş ve sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farksızdır ($\alpha=0.05$). IND grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan farklı gruplar ($p<0.05$) * ile gösterilmiştir.



Şekil 13. Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon *s*-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farksızdır ($\alpha=0.05$).

4.2.4. MPO aktivitesi üzerine alfa lipoik asit (ALA)'in etkileri: ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MPO aktivitesinin miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 14.'da gösterilmiştir. Numunelerin MPO aktiviteleri $\mu\text{mol/dakika/mg doku}$ olarak tarif edilmiştir.

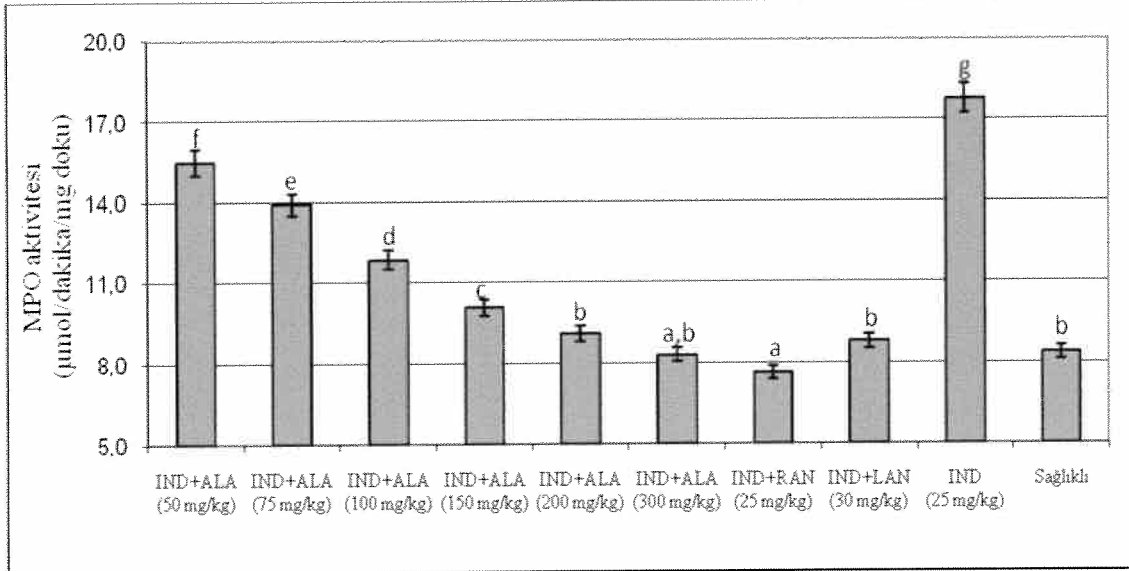
Tablo 5.'da görüldüğü üzere MPO aktivitesi kontrol grubunda 8.37 ± 0.08 , IND grubu midelerinde 17.77 ± 0.25 , RAN grubunda 7.64 ± 0.34 , LAN grubunda 8.80 ± 0.08 ve IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 15.47 ± 0.26 , 13.90 ± 0.35 , 11.85 ± 0.35 , 10.07 ± 0.33 , 9.11 ± 0.17 ve 8.31 ± 0.29 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin önemli oranda ($p<0.05$) artırdığı MPO aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan ALA'nın bütün dozlarda inhibe ettiğini ($p<0.05$) ve 200 (% 108.8) ile 300 (% 99.3) mg/kg dozlarda kontrol seviyesine ($p\leq 0.05$) azalttığını göstermektedir. Sağlıklı gruptaki MPO seviyesinin 100 olarak kabul edildiği skala göz önüne alındığında referans olarak kullanılan ilaçlardan RAN ve LAN'ın sırasıyla % 91.6 ve 105.1'lik bir aktivite seviyesi ölçüldüğü bu oranın IND ile muamele edilen dokularda % 212.3 seviyesi ile belirlenmiştir.

Tablo 5 ve Şekil 14'de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen MPO miktarındaki artışın ($p<0.05$) IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 200 ve 300 mg/kg dozlarının yanı sıra RAN ve LAN tarafından da net bir şekilde ortadan kaldırıldığı ve kontrol grubundaki seviyeye getirildiği görülmektedir ($p<0.05$). Bu bulgular ALA, RAN ve LAN'ın IND ile birlikte uygulandıklarında MPO enziminin miktarını azalttığını göstermektedir.

Tablo 5. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	MPO aktivitesi ($\mu\text{mol/dakika/mg doku}$)	% Aktivite
IND+ALA	6	50	15.47 \pm 0.26f	184.8*
IND+ALA	6	75	13.90 \pm 0.35e	166.1*
IND+ALA	6	100	11.85 \pm 0.35d	141.6*
IND+ALA	6	150	10.07 \pm 0.33c	120.3*
IND+ALA	6	200	9.11 \pm 0.17b	108.8*
IND+ALA	6	300	8.31 \pm 0.29a,b	99.3*
IND+RAN	6	25	7.64 \pm 0.34a	91.6*
IND+LAN	6	30	8.80 \pm 0.08b	105.1*
IND	6	25	17.77 \pm 0.25g	212.3
Sağlıklı	6	-	8.37 \pm 0.08a,b	100.0*

ALA'nın altı; RAN ve LAN'ın ise tek dozu ratlara verilmiş ve sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farksızdır ($\alpha=0.05$). IND grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan farklı gruplar ($p<0.05$) * ile gösterilmiştir.



Şekil 14. Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farksızdır ($\alpha=0.05$).

4.2.5. GSH aktivitesi üzerine alfa lipoik asit (ALA)'in etkileri:

ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GSH miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 15.'de gösterilmiştir. Numunelerin GSH miktarları, *nmol/mg doku* olarak tarif edilmiştir.

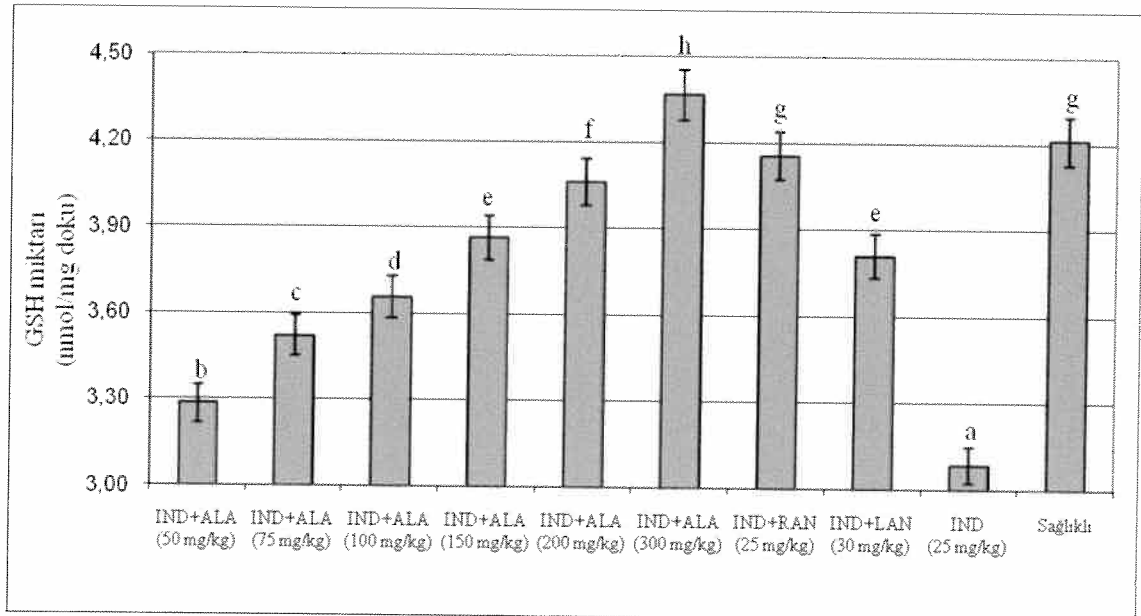
Tablo 6'den görüldüğü üzere GSH miktarları kontrol grubunda 4.21 ± 0.05 , IND grubu midelerinde 3.09 ± 0.03 , RAN grubunda 4.16 ± 0.01 , LAN grubunda 3.81 ± 0.02 ve ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 3.28 ± 0.01 , 3.52 ± 0.01 , 3.66 ± 0.03 , 3.87 ± 0.02 , 4.06 ± 0.02 ve 4.37 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin azalttığı GSH miktarını, IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 50, 75, 100, 150 ve 200 mg/kg dozlarının artırdığını ($p < 0.05$), 300 mg/kg dozunun kontrol seviyesinin de üzerine çıkardığı ($p < 0.05$) belirlendi. Referans ilaçlarımızdan LAN GSH miktarını ALA'ya benzer şekilde artırırken ($p < 0.05$) RAN kontrol seviyesine çıkarmıştır ($p \leq 0.05$).

Tablo 6 ve Şekil 15'de de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GSH miktarındaki azalma ($p < 0.05$) IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 200 ve 300 mg/kg dozları ve referans ilaçlarımız RAN ve LAN tarafından kontrol seviyesine artırılmıştır.. Bu bulgular ALA, LAN ve RAN'ın IND ile birlikte uygulandıklarında GSH miktarını artırdığını göstermektedir.

Tablo 6. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutatyon (GSH) miktarları üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GSH miktarı (nmol/mg doku)	% Aktivite
IND+ALA	6	50	3.28±0.01b	77.9*
IND+ALA	6	75	3.52±0.01c	83.6*
IND+ALA	6	100	3.66±0.03d	86.9*
IND+ALA	6	150	3.87±0.02e	91.9*
IND+ALA	6	200	4.06±0.02f	96.4*
IND+ALA	6	300	4.37±0.01h	103.8*
IND+RAN	6	25	4.16±0.01g	98.8*
IND+LAN	6	30	3.81±0.02e	90.5*
IND	6	25	3.09±0.03a	73.4
Sağlıklı	6	-	4.21±0.05g	100.0*

ALA'nın altı; RAN ve LAN'ın ise tek dozu ratlara verilmiş ve sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$). IND grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan farklı gruplar ($p<0.05$) * ile gösterilmiştir.



Şekil 15. Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutatyon (GSH) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram. sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.2.6. LPO miktarı üzerine alfa lipoik asit (ALA)'in etkileri:

ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MDA miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 16' de gösterilmiştir. Numunelerin LPO miktarları, *nmo/ g doku* olarak tarif edilmiştir.

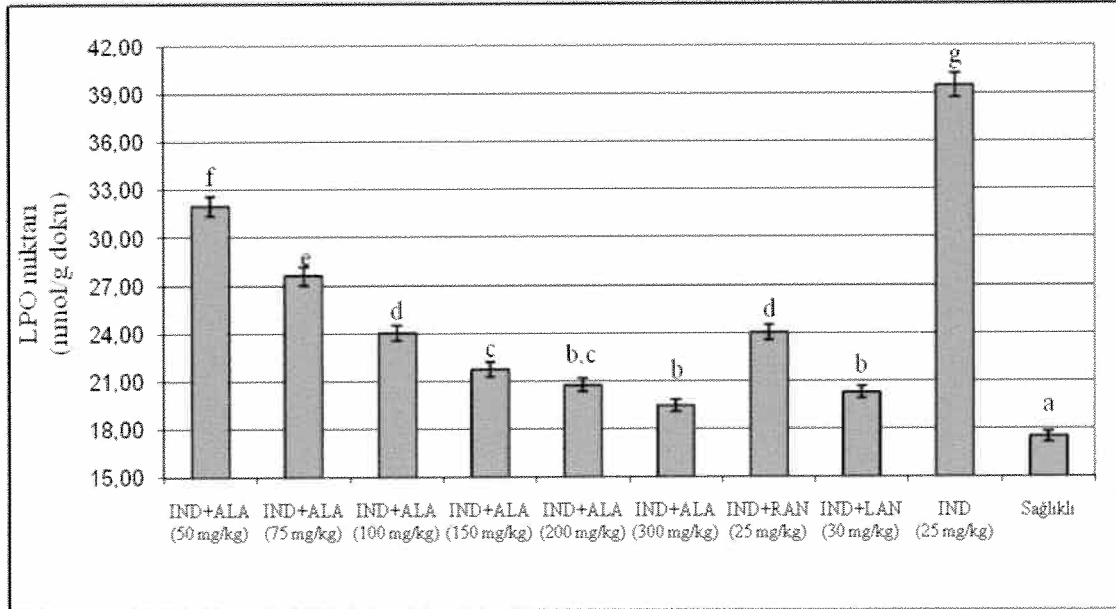
Tablo 7'de görüldüğü üzere LPO'nun göstergesi olan MDA miktarları kontrol grubunda 17.48 ± 0.71 , IND grubu midelerinde 39.49 ± 0.43 , IND ile birlikte uygulanan RAN grubunda 24.00 ± 0.59 , LAN grubunda 20.25 ± 0.28 ve ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 31.99 ± 0.28 , 27.59 ± 0.28 , 24.10 ± 0.43 , 21.72 ± 0.28 , 20.74 ± 0.28 ve 19.43 ± 0.59 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin önemli oranda ($p < 0.05$) artırdığı LPO miktarını, IND ile birlikte uygulanan ALA'nın tüm dozları tarafından doz artışına bağlı olarak önemli ($p < 0.05$) oranda azaltıldığını göstermektedir. Referans ilaçlarımızda benzer şekilde RAN (%137.3) ve LAN (%115.9)'lik oranlarda LPO miktarını azaltmışlardır. Bu oranlar kontrol için %100 ve IND için % 225.9 olduğu dikkate alındığında oldukça yüksek olarak kabul edilebilir.

Tablo 7 ve Şekil 16'de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen LPO miktarındaki artış ($p < 0.05$) IND ile birlikte uygulanan ALA tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve 300 mg/kg doz uygulandığında da kontrol grubundaki seviyeye yaklaştırmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular ALA, RAN ve LAN'un IND ile birlikte uygulandıklarında LPO miktarını azalttığını göstermektedir.

Tablo 7. Alfa lipoik asit (ALA) ile pozitif kontrol ilaçları olarak kullanılan ranitidin (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipit peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	LPO miktarı (nmol/g doku)	% Aktivite
IND+ALA	6	50	31.99±0.28f	183.01*
IND+ALA	6	75	27.59±0.28e	157.84*
IND+ALA	6	100	24.10±0.43d	137.87*
IND+ALA	6	150	21.72±0.28c	124.26*
IND+ALA	6	200	20.74±0.28b,c	118.65*
IND+ALA	6	300	19.43±0.59b	111.16*
IND+RAN	6	25	24.00±0.59d	137.30*
IND+LAN	6	30	20.25±0.28b	115.85*
IND	6	25	39.49±0.43g	225.92
Sağlıklı	6	-	17.48±0.71a	100.0*

ALA'nın altı; RAN ve LAN'ın ise tek dozu ratlara verilmiş ve sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farksızdır ($\alpha=0.05$). IND grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel açıdan farklı gruplar ($p<0.05$) * ile gösterilmiştir.



Şekil 16. Ranitidine (RAN) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; alfa lipoik asit (ALA)'in ise altı dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipit peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram. sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [\pm standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farksızdır ($\alpha=0.05$).

5. TARTIŞMA

Alfa-lipoik asit (ALA), 'B grubu vitaminler' den birisidir. Hem suda hem de yağda çözünebildiği için hücre içinde, hücre dışında ve membran yapısında da etkisini sürdürebilir. Günlük besinlerimizle kolayca ve bol miktarda alınabilir. ALA 1950'de sığır karaciğerinden daha sonra da patatesten izole edilmiştir. ALA diyetten kolayca emilir, nakledilir, beyini de içerisine alan çeşitli dokularda hücrelerin sitoplazmasında bulunan glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz tarafından NADPH 'ın varlığına bağlı olarak dihidrolipoik asite (DHLA) dönüştürülür^{62-64,68}. Biyokimyasal proseslerdeki rolü dikkate alındığında, başlangıçta vitamin B komplekslerine dahil edilmiştir. Bununla birlikte şimdilerde araştırmacıların çoğu lipoik asidin bir vitamin olmadığına inanmaktadır. Sülfürün kaynağı olan sistein ve oktanoik asit lipoik asidin direkt prokürsör (başlangıç molekülü)'ü dürler ve bakteri ve bitkilerdekine benzer olarak insan ve hayvanlardaki mitokondrilerde sentezlendiği farz edilmektedir⁶¹.

ALA'nın bu moleküler özellikleri son yıllarda onun antioksidant özelliklerinin keşfedilmesinden sonra doğrudan reaktif oksijen sınıfları (ROS) ve onların sebep oldukları metabolik hastalıklar üzerine çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. ALA'nın hücre içi ROS'ların pek çoğunun radikalik etkisini süpürerek oksidatif stresle savaştığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir⁶¹⁻⁶⁵. ROS'lerin radikalik etkilerinin süpürülerek ortadan kaldırılması bir tarafa vitamin C, vitamin E ve glutatyon (GSH) gibi diğer hücrel antioksidantların rejenere edilerek yeniden kullanılabilir forma getirilmesini de ALA'nın sağladığı belirlenmiştir^{66,67,259}. ALA ve DHLA'nın hem prooksidant hemde antioksidant özelliklere sahip olduğu bazı çalışmalarda^{119,259,260} gösterilmiş olmasına rağmen hem ALA hem de DHLA güçlü antioksidant aktivite gösterir^{261,262} ve hücre içi GSH seviyesini artırmak için glutatyon disülfiti veya

dehidroaskorbati redüksiyona uğratar. En önemli tiyol yapısındaki antioksidant olan GSH, sistemik olarak uygulandığında kan-beyin bariyerini aşamadığı için beyinde sentezlenmek zorundadır. Bu yüzden DHLA hücre içi ve hücre dışı alanda beyin antioksidant potansiyelini artırmak için oldukça enteresan bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Son 50 yılda lipoik asidin farmakolojik özelliklerine ilişkin araştırmalarda enteresan bir yükselişe tanık oluyoruz⁶⁸. Diabet, ateroskleroz, nöronlardaki dejeneratif prosesler, eklem hastalıkları ve AIDS gibi pek çok hastalığın tedavisinde lipoik asidin faydalı etkilerini doğrulayan yayınların sayısında çok büyük bir artış vardır. Çağdaş tıbbın bu moleküle merakı aslında lipoik asidin redüktif (indirgeme) gücünden kaynaklanmaktadır. Lipoat/dihidrolipoat sisteminin düşük redoks potansiyelinden dolayı diğer antioksidantların okside formlarının redüksiyonunda olduğu gibi ROS'leri nötrleştiren reaksiyonlara oldukça etkili bir şekilde katılır. Antioksidantlar arasında yağda olduğu gibi suda da çok iyi bir şekilde çözünebilen yegâne molekül ALA'dır⁷⁸. Bu yüzden alfa lipoik asit antioksidantların antioksidantı olarak adlandırılır⁶⁸.

ALA'nın antiülserojen etkisinin incelendiği çalışmalar olsa da oluşan antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında mevcut araştırmanın bu konuda bir boşluğu dolduracağı inancını taşımaktayız. Bu amaçla ticari ambalajı içerisinde satılmakta olan bir ürün olarak piyasadan aldığımız ALA'nın değişik dozlarda gastroprotektif etkisi ve antioksidan sistem üzerine olan etkisi araştırıldı. ALA'nın antiülserojenik aktivitesinin olup olmadığı sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modeli kullanarak belirlenmeye çalışılırken gastroprotektif etkinin mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutabilmek için de gastrik hasarlı dokularda SOD, CAT, GST ve MPO enzim aktiviteleri ile GSH ve

LPO miktarları ölçülerek ALA'nın bu antioksidant sistemleri nasıl etkilediği belirlenmeye çalışıldı.

Araştırmamızda indometazin (IND) ile muamele edilen rat midelerinde meydana gelen ülserli doku hasarını (Tablo 1, Şekil 9), ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozlarda IND'e göre sırasıyla % 88.2, 89.9, 91.4, 93.5, 95.1 ve 96.1 ($p<0.05$) azalttığı gözlenmiştir. Sağlıklı (kontrol) grupta ülser alanı oluşmazken IND ile oluşturulan ülseri; RAN'ın % 72.3 oranında ($p<0.05$), LAN'ın da % 95.3 oranında ($p<0.05$) azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 1 ve Şekil 9). ALA'nın uygulanan dozları arasında en etkili doz 300 mg/kg olarak uygulanan doz olup RAN ile mukayese edildiğinde ülser önleyici etkisinin çok daha fazla, LAN ile karşılaştırıldığında ise bu etkinin 200 mg/kg dozuyla hemen hemen eşit, 300 mg/kg dozda ise daha etkili olduğu görülmektedir. Mevcut bulgular doğrultusunda ALA'nın her dozda güçlü bir antiülserojenik ajan olduğunu ortaya koymaktadır.

IND'nin gastrik hasar oluşturmasının sebepleri arasında; mide dokusundaki sitoprotektif prostaglandinlerin sentezini inhibe etmesi^{17,24,25,278,279} LPO'yu artırması^{18-20,23-27,48,280}, doku glukoz seviyesini azaltması²⁸¹, MPO aktivitesini ve NOS aktivitesini artırması^{18,19,23,282-284} sayılabilir. IND, etanol ve diğer ajanlar ile oluşturulan mukozal hasarların, reaktif oksijen molekülleri ile ilişkili olduğu da literatürde kaydedilmiştir^{20,23,24,26,27,285-289}. Literatürde rapor edilmiş çok sayıda araştırmada IND gibi antienflamatuar ilaçların hem prooksidan hem de lipit peroksidit oluşturucu etkilerinin olduğu ve bu tür ilaçların mukozal hücrelerin antioksidan sistemlerini süratle bloke ederek ROS oluşumuna ve bu ROS oluşumunun da lipit peroksidasyonuna neden olabileceği öne sürülmüştür^{20,23-27,57,286}. Oksidatif hasarlar nedeni ile kontrol edilemeyen

lipit peroksidasyonu bir süre sonra proteinlerde oksidasyona ve sonunda da hücre ölümüne yol açabilmektedir.

Deneysel sonuçlarımızın ışığında bir nonsteroidalantiinflamatuvar ilaç olan IND tarafından ratların midelerinde oluşturulan ülserlerin çok büyük oranda önlendiği tespit edilmiş bu etkinin hangi mekanizma ile olabileceği konusuna ışık tutmak amacı ile antioksidant enzimlerden SOD, CAT ve GST aktiviteleri, travma halinde dokulara yönelen nötrofillerin belirteci olan miyeloperoksidaz enziminin aktivitesi ile antioksidant sistemin önemli bileşeni olan total glutatyon (GSH) düzeyi belirlenmiştir. Yine dokularda hasar seviyesinin bir markörü olarak MDA seviyeleri ölçülmek suretiyle hücresel seviyede oluşabilecek lipit peroksidasyon düzeyi belirlenmek suretiyle hasarın düzeyi izlenmeye çalışılmıştır.

Organizmalar ROS'ların toksisitesine karşı hem enzimatik hem de enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptirler^{287,288}. ROS'lara karşı (özellikle de $[O_2^{\cdot-}]$ süperoksit anyonuna karşı) savunmada önemli süpürücü enzimlerden biri de SOD'dir. SOD'ler (sitoplazmik Cu / Zn SOD, Mitokondrial Mn-SOD), $O_2^{\cdot-}$ anyonunun H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizlerken CAT ise H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşümünü katalizler^{20,23-27,289}. IND ile ülser oluşturulmuş dokularda bazı antioksidan enzim aktiviteleri (SOD ve CAT)'nin azaldığı konusunda pekçok literatür kaydına rastlanmıştır^{20,23-27,271,280,290}.

Araştırmamızda IND ile muamele edilen rat midelerinde belirlenen SOD aktivitesi (Tablo 2 ve Şekil 11) sağlıklı gruba göre önemli oranda azalmıştır ($p<0.05$). IND ile muamele edilen ratlarda ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg dozlarda uygulanması ile SOD aktivitesi önemli oranda artarak kontrol (sağlıklı) grubu seviyesine gelmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde RAN ve LAN'ın de SOD aktivitesini kontrol grubu seviyesi ve üzerine çıkardığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Diklofenak sodyum, meloksikam ve ketoprofenil gibi çeşitli NSAID'ler ve IND ile muamele edilen rat mide dokularında SOD aktivitesinin azaldığına ilişkin bulgularımız daha önce yapılmış olan çok sayıda çalışma^{18,20,21,23-27,207,208,280,291,292} ile uyum içerisindedir. Fakat IND'nin hangi mekanizma ile SOD aktivitesini inhibe ettiği henüz kesin olarak açıklığa kavuşturulamamış olup bu konuyu aydınlatabilmek amacıyla bazı izahlar yapılmaktadır.

Antioksidanların inhibisyonu ROS birikimine yol açar. ROS'ların üretildiği yerde SOD'yi de içine alan antioksidanların varlığı, IND ile uyarılan patojenezin kontrol edilmesinde koruyucu bir faktör olarak davranır^{20,23-27,291}. Araştırmamızda IND etkisi ile azalan SOD aktivitesinin, ALA'nın tüm dozları, RAN ve LAN tarafından yeniden artırıldığı ve bunun da oksidatif hasarı kısmen engelleyerek gastrik hasarın giderilmesinde rol oynadığı düşünülebilir. Cu, Zn ve Mn kompleksleri ile yapılan çalışmalarda SOD aktivitesi ile prostaglandin sentezi arasında bir ilişkiye işaret edilmekte ve IND ile oluşturulan ülser modelinin olası mekanizmalarından birisi olarak kabul edilmektedir^{2,290,293}. Bu araştırmalar ışığında ele alındığında mevcut araştırma çerçevesinde elde ettiğimiz bulgular prostaglandin seviyeleri üzerine de ALA'nın etkili olabileceği izlenimini vermektedir.

IND ile muamele sonucu prostaglandin konsantrasyonu azalsa da Mn ve Cu komplekslerinin gastrik korumadaki katkıları önemlidir. Bunun yanı sıra Cu ve Mn kompleksleri tarafından sağlanan gastrik korumaya sadece prostaglandinler değil serbest radikal süpürücüler gibi diğer faktörler de katkıda bulunurlar²⁹⁰. SOD veya SOD'ye benzer etki gösteren antioksidantlar tarafından süperoksitlerin elimine edilmesi, gastrik koruma prosesinde önemli bir faktördür. Nitekim etanol ile uyarılan gastrik

hasarlı dokularda SOD aktivitesinin azaldığı ve serbest radikallerin gastrik mukozal hasarın patojenezine katıldığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir^{290,294}.

SOD inhibitörü olan dietilditiyokarbamat (DDC) verilen IND ile uyarılmış ülserli rat dokusunda SOD aktivitesinin azaldığı, bunun sebebinin ise mukozal asidifikasyonun yol açtığı bikarbonat salgılanmasındaki artışın DDC tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir²⁹⁵. DDC'nin bikarbonat salgılanması üzerindeki inhibisyon etkisi SOD ilavesiyle tersine döndürülebilir²⁹⁶. Bu bilgilerden yola çıkarak SOD'nin bikarbonat salgılanması prosesinde de rol aldığı söylenilebilir.

Bütün bu verilerden yola çıkarak RAN, LAN ve ALA'nın tüm dozlarının gastroprotektif etki göstermesinde, SOD aktivitesini artırmasının önemli bir paya sahip olduğunu düşünmekteyiz (Şekil 11).

Araştırmamızda kontrol ve muamele gruplarında tespit edilen CAT aktiviteleri Tablo 3 ve Şekil 12 'de sunulmuştur. IND tarafından önemli oranda artırılan CAT aktivitesi üzerine hem referans ilaçlar RAN (103.6) ve LAN (107.5) hemde ALA'nın bütün dozları pozitif yönde etki göstererek kontrol (%100) seviyesine yaklaştırmıştır (Tablo 3, Şekil 12). Bu bağlamda ALA'nın mevcut çalışmada belirlenen gastroprotektif etkisinin CAT aktivitesi ile ilişkili olduğu öne sürülebilir.

Mide dokusunda indometazin vasıtasıyla CAT aktivitesinin artırıldığı literatürlerde belirtilmiştir^{20,23-27,280,291,297}. Bizim bulgularımızda da IND tarafından CAT aktivitesinin artırıldığı tespit edilmiştir. Bir başka açıdan değerlendirilecek olursa CAT aktivitesindeki artışın diğer antioksidant bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GPO) ile ilgisi olduğu değerlendirilebilir. Hem CAT hemde GPO enzimleri hidrojen peroksid (H_2O_2)'i kullanma hususunda yarış halinde olabilir¹⁸⁸. Bu durum proses esnasındaki enzimatik ilginin yönü ile alakalıdır. Şayet bu araştırmada GPO aktivitesi

araştırılabilmiş olsaydı bu durum hakkında bir açıklama getirilebilirdi. Diğer yandan başka araştırmalarda bu durum literatürlerde kaydedilmiştir^{186,207,208}. CAT ve GPO enzimleri H₂O₂'yi H₂O'ya dönüştürerek zayıf radikalik etkisini ortadan kaldırırlar. Çünkü H₂O₂ ortaklanmamış bir elektron içermediği için kendi başına güçlü bir radikal değildir^{298,299}. Bununla beraber, hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. H₂O₂, Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturabilir^{186,207,208}. Bu yüzden H₂O₂'nin suya dönüştürülmesi zorunludur. Gastrik hasara uğramış olan dokularda CAT aktivitesinin artması ikinci planda gastrik korumaya yardımcı olması açısından da oldukça önemlidir ve bu tür araştırma çalışmalarında GPO enziminin değerlendirilmeside araştırmaya olumlu yönde katkı sağlar diye düşünüyoruz.

Gastrik mukozal dokuların içerisindeki nötrofil salınımı MPO enzimi ile kontrol altında tutulmaya çalışılır. MPO deneysel olarak oluşturulmuş çeşitli gastrik yaralarda nötrofil salınımının bir göstergesi olarak kullanılır³⁰⁰⁻³⁰⁴. Gastrik mukozal dokuların içerisindeki nötrofil salınımı çeşitli gastrik lezyonların patolojisinde tehlikeli bir oluşumdur^{19,23,27,258,302-306}. Son zamanlarda yapılan çalışmalar mide dokusunda oluşan gastrik mukozal hasarların MPO aktivitesini artırdığını göstermektedir^{23,27,258,303,304}.

Araştırmamızda saf su içerisinde çözülerek uygulanan ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MPO aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 14.'de gösterilmiştir. Tablo 5 'den görüldüğü üzere kontrol grubunda ki MPO aktivitesi 8.37±0.08, IND grubu midelerinde 17.77±0.25, RAN grubunda 7.64±0.34, LAN grubunda 8.80±0.08 ve IND ile birlikte uygulanan ALA'nın 50, 75, 100, 150, 200 ve

300 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 15.47 ± 0.26 , 13.90 ± 0.35 , 11.85 ± 0.35 , 10.07 ± 0.33 , 9.11 ± 0.17 ve 8.31 ± 0.29 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin önemli oranda ($p < 0.05$) artırdığı MPO aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan RAN ve LAN'ın yanı sıra ALA'nında tüm dozlarda MPO aktivitesini azalttığını ($p < 0.05$) göstermektedir. Bu sonuçlar ALA'nın MPO aktivitesi üzerinde önemli oranda etkin olduğunu göstermektedir.

Şekil 15 ve Tablo 6'dan görülebileceği gibi GSH miktarı IND tarafından önemli oranda azaltılmıştır ($p < 0.05$). IND ile birlikte uygulanan ALA'nın bütün dozlarda GSH miktarını artırmış 300 mg/kg dozda ise daha da artırarak kontrol seviyesinin üzerine çıkarmıştır ($p < 0.05$). LAN hemen hemen ALA'nın 150 mg/kg dozu ile aynı oranda GSH miktarını kontrol düzeyine artırırken ($p < 0.05$) RAN ise kontrole eşit düzeyde artış sağlamıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular IND tarafından meydana getirilen gastrik hasarın temel sebeplerinden birisinin gastrik GSH düzeyinin azaltılması olduğunu göstermektedir. Bulgularımız literatürlerdeki bulgular ile tam bir uyum içerisindedir^{24-27,271,290,305}

Araştırmamızda saf su içerisinde çözülerek uygulanan ALA'nın farklı dozları (50, 75, 100, 150, 200 ve 300 mg/kg), RAN, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GST aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 13'da gösterilmiştir. Tablo 4'den görüldüğü üzere kontrol grubunda ki GST aktivitesi 41.33 ± 0.91 olup, IND ile muamele edilen grupta 31.57 ± 0.88 'lik seviyeye düşmüştür. Referans ilaçlar ile muamele sonrası GST aktivitesi LAN grubunda % 100.9 olarak sağlıklı grup seviyelerinde kaydedilirken RAN'ın aktiviteyi etkilemediği (31.27 ± 1.18) tespit edilmiştir. IND ile muamele sonrası GST aktivitesinde meydana gelen azalma ALA ile muamele sonrasında artırılmış ve 200 (% 97.3) ile 300 ((% 101.5) mg/kg

dozlarda da tamamen kontrol seviyesine getirilmiştir. Bu sonuçlar ALA'nın 200 ve 300 mg/kg dozlarının GST aktivitesi üzerinde önemli oranda etkin olduğunu göstermektedir.

Çeşitli kimyasal ajanların çoğu GSH ve GSH-bağlı enzimlerin konsantrasyonunu artırarak etki gösterirler^{19,24-26,258,306-308}. Diğer yandan bazı kemopreventif ajanların çeşitli dokularda GSH ve GSH-bağlı enzimleri uyardığı da belirlenmiştir³⁰⁹. Özellikle GPO ve GST gibi faz II enzimlerinin uyarıcıları potansiyel kemopreventif ajanlar olarak düşünülmektedir^{19,26,258,310}. Çeşitli dokulardaki GSH ve GSH-bağlı enzimler (GPO ve GST) antioksidan ve detoksifikasyon özelliklerinden dolayı kemoprevensiyon biomarkırları olarak da dikkate alınırlar^{19,24-26,258,311,312}. Bu açıdan bakıldığında, GST aktivitesinde meydana getirdiği artış nedeniyle ALA'ya potansiyel bir kemopreventif ajan gözüyle bakılabilir.

IND ile oluşturulan gastrik hasarlı dokularda LPO miktarının arttığı çok sayıda literatürde kayıtlıdır^{19-21,24-26,38,43,63,207,208,258,313}. Bizim bulgularımızda da IND ile muamele sonrası LPO miktarı önemli oranda artmıştır ($p<0.05$). IND ile birlikte uygulanan ALA'nın bütün dozlarda önemli oranda LPO miktarını azalttığı ($p<0.05$) belirlenmiştir (Tablo 7 ve Şekil 16). Benzer şekilde RAN ve LAN da önemli oranda LPO miktarını azalttığı ($p<0.05$) gözlenmiştir.

IND vasıtasıyla oluşturulan gastrik hasarın en önemli sebebi olarak prostaglandin sentezinin engellenmesi gösterilmektedir^{2,278,290,314}. Prostaglandin sentezini gerçekleştiren prostaglandin H sentaz, hem COX hem de hidroperoksidaz aktivitesine sahiptir. İndometazinın gastrik toksisitesinin COX enzimini inhibe etme yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Fakat prostaglandin H sentazın gastrik toksisite ile ilgili olan aktivitesinin COX aktivitesinin yanı sıra peroksidaz aktivitesine bağlı olabileceği de göz ardı edilmemelidir³¹³. Zira indometazin ortamda mevcut olan

bir peroksidaz enzimi vasıtasıyla H_2O_2 ile reaksiyona girerek süperoksit oluşturabilir, süperoksit ise membranlarda hasara yol açabilir^{20,21,207,208}.

Prostaglandin H sentaz, H_2O_2 varlığında IND tarafından inhibe edilmez, prostaglandin H sentazın peroksidaz aktivitesi göstermesi IND tarafından inhibe edilmediğine işaret eder³¹⁵. IND, H_2O_2 varlığında lipit peroksidasyonunu uyaracak şekilde³¹³ aksiyon göstererek ülser oluşturabilir. Bu bilgiler indometazin ile rat midelerinde ülser oluşumunun mekanizmasının COX enzimleri inhibisyonunun yanı sıra lipit peroksidasyonu yoluyla da olabileceğinin göz ardı edilmemesi gerektiğini doğrulamaktadır. Bu nedenle indometazinin lipit peroksidasyonuna yönelmemesi için ortamdaki H_2O_2 'in harcanması gerekir. H_2O_2 , CAT, GPO ve yine bir peroksidaz enzimi olan MPO enzimlerinin substratı olduğu için CAT, GPO ve MPO aktivitesinde meydana gelen artış daha fazla H_2O_2 'nin harcanması anlamına gelecek ve ortamda harcanacak H_2O_2 olmadığı için indometazin lipit peroksidasyonuna yönelmeyecektir. Bağlı olarak IND ile muamele sonrası mide dokusunda CAT ve MPO aktivitelerinde bir artış kaydedilmiştir. Bu bağlamda ALA'nın SOD enzimi, LPO ve GSH miktarları üzerine üzerine modülatör etkileride dikkate alındığında, ülserin önlenmesinde ALA'nın pozitif etkileri kayda değerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada,

1. Eczanelerde 'alfa lipoik asit' adı ile satılan ilaç, lokal bir eczaneden temin edildi.
2. Alfa lipoik asit'in IND ile oluşturulan ülseri önemli oranda önlediği belirlendi.
3. Alfa lipoik asit'in SOD, CAT, GST, MPO enzim aktiviteleri ile GSH ve LPO miktarları üzerine etki ederek dokuların lehine olacak şekilde modülatör etkiye sahip olmasının gastroprotektif etkisi ile ilişkili olduğu şeklinde değerlendirildi.
4. Alfa lipoik asit'in diğer ülser modellerinde denenmesinin, onun ülser koruyucu ve antiülserojenik etkisi hakkında daha detaylı bilgilere ulaşabilmek açısından faydalı olacağı kanaatine varıldı.
5. Bu çalışmadan elde edilen bulguların "IND ile oluşturulan ülserlerde ROS'lar etkin rol oynar" hipotezini desteklediği belirlendi.

Mevcut araştırmada alfa lipoik asidin anti-ülserojenik etkilere sahip olduğu belirlenmiş ve bu etkinin antioksidant sistem ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda antiülserojenik süreçte önemli diğer parametreler olan "NOS, PGE ve COX seviyeleri ile mide asit ve mukus salgısı üzerine etkileri de araştırılmalıdır. Bu suretle alfa lipoik asit 'gastroprotektif yeteneği olan yeni bir ilaç' olarak tespit edilerek ilaç sanayinde değerlendirilebileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Philadelphia: WB Saunders Co 6th ed. 2002: 604-615.
2. Whittle BJR. Temporal relationship between COX inhibition, as measured by prostaglandin biosynthesis and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in rat. *Gastroenterol* 1981; 80: 94–98.
3. Kauffman G. Aspirin induced gastric mucosal injury: lessons learned from animal model. *Gastroenterol* 1989; 96: 606–614.
4. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PD, Howley CJ. Mechanism of gastric and duodenal damage and protection. *Hepatogastroenterol* 1992; 39 (Suppl. 1): 31–36.
5. Ito S, Lacy ER. Morphology of rat gastric mucosal damage, defence and restitution in the presence of luminal ethanol. *Gastroenterol* 1985; 88: 250–260.
6. Hudson N, Everitt S, Edwards T. Elevation of gastric mucosal leukotriene B4 levels of patients on long-standing NSAID therapy. *Gastroenterol* 1991; 100: A86.
7. Lau ATS, Graham GG, Day RO, Perry MA. Effect of aspirin on ulcer site blood flow in cat stomachs. *American J Physiol* 1992; 263 (26): G155–160.
8. Lanza LL, Walker AM, Bortnichak EA, Dreyer NA. Peptic ulcer and gastrointestinal haemorrhage associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use in patients younger than 65 years. *Arc Int Med* 1995; 155: 1371–1377.

9. Taha AS, Sturrock RD, Russel RI. Mucosal erosions in long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug users: predisposition to ulceration and relation to *Helicobacter pylori*. *Gut* 1995; 36: 334–336.
10. Isenberg JI, Mc Quaid KR, Laine L, Walsh JH. Acid peptic disorders. In: Yamada, T. (Ed.), *JB Lippincott, Philadelphia: Text Book of Gastroenterol* 2nd ed., PA. 1995; pp: 1347–1430.
11. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biol Med* 1997; 23: 8–18.
12. Takuji M, Sato H, Hirose F, Doteuchi M. Effects of antioxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci* 1987; 41: 755–763.
13. Hung CR, Neu SL. Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. *J Nutr* 1997; 127: 630–6.
14. Tarnasky PR, Livingston EH, Jacobs KM, Zimmerman BJ, Guth PH, Garrick TR. Role of oxyradicals in cold water immersion restraint-induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 173–7.
15. Hye Kyung J, Kyung Eun L, Sang Hui C, Sun Young Y. *Helicobacter pylori* infection reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1336–1340.
16. Itoth M, Guth PH. Role of oxygen derived free radicals in hemorrhagic shock induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterol* 1985; 88: 1165–1167.

17. Suleyman H, Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Karagoz Y, Gocer F, Halici M, Bayir Y. Antiinflammatory and antiulcer effects of aqueous extract of *Lobaria pulmonaria*. *Phytomedicine* 2003; 10 (6-7): 552-557.
18. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C.. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2006a; 103 (1): 59-65.
19. Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Aygun H, Suleyman H, Cadirci E, Atalay F. Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and α -tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *Eur J Pharm* 2008; 591 (1-3), 300-306.
20. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine* 2005;12: 656-662.
21. Halici M. Bazı likenlerden izole edilen maddelerin sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde antiülserojen mekanizmalarının araştırılması. *Fen Bil Enst-Kimya ABD, Doktora Tezi, Erzurum, 2007.*
22. Halici M, Kufrevioglu OI, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aslan A. The ethanol-water extract of *Ramalina capitata* has gastroprotective and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with indomethacin-induced gastric injuries. *J Food Biochem* 2009. (In Press).
23. Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine* 2006a; 13 (8): 584-590.

24. Dengiz GO, Odabasoglu F, Halici Z, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y. Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Arch Pharm Res* 2007a; 30 (11): 1426–1434.
25. Dengiz GO, Odabasoglu F, Halici Z, Cadirci E, Halici M, Gastroprotective and antioxidant effects of montelukast on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Pharmacol Sci* 2007b; 105: 94–102.
26. Koc M, Imik H, Odabasoglu F, Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. *Biol Trace Elem Res* 2008;126 (1-3): 222-236.
27. Karakus B, Odabasoglu F, Cakir A, Halici Z, Bayir Y, Halici M, Aslan A, Suleyman H. The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species on indomethacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress, and neutrophil infiltration. *Phytother Res* 2009; 23: 635-639.
28. Banerjee S, Hawksby C, Dahill S, Beattie D, Mc Coll KEI. Effect of *H. pylori* and its eradication on gastric juice ascorbic acid. *Gut* 1994; 335: 317–322.
29. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvalo N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS. *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut* 1994; 32: 179–185.
30. Silva MIG, Moura BA, Aquino Neto MR, Tomé AR, Rocha NFM, Carvalho AMR, Macêdo DS, SMM Vasconcelos, Sousa DP, Barros Viana GS & Sousa FCF. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2009; 380: 233–245.

31. Bilici M, Ozturk C, Dursun H, Albayrak F, Saglam MB, Uyanik A, Gulaboglu M and Tekin SB. Protective Effect of Mirtazapine on Indomethacin-Induced Ulcer in Rats and Its Relationship with Oxidant and Antioxidant Parameters. *Dig Dis Sci* 2009; 54:1868–1875.
32. Rahimi R, Mozaffari S and Abdollahi M. On the Use of Herbal Medicines in Management of Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review of Animal and Human Studies. *Dig Dis Sci* 2009; 54:471–480.
33. Nandi J, Saud B, Zinkievich JM, Palma DT and Levine RA. 5-Aminosalicylic Acid Improves Indomethacin-Induced Enteropathy by Inhibiting iNOS Transcription in Rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53:123–132.
34. Zamora Z, González R, Guanche D, Merino N, Menéndez S, Hernández F, Alonso Y and Schulz S. Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflamm Res* 2008; 57: 39–43.
35. Das D, Banerjee RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol Cell Biochem* 1993; 125: 115–125.
36. Hetil O. Mechanism of free radicals in gastrointestinal and liver diseases. *J Clinical Biol* 1993; 134: 675– 683.
37. Lutnicki K, Wrobel J, Ledwozyw A, Trebas-Pietras E. The effect of ethylalcohol peroxidation processes and activity of antioxidant enzymes in rat's gastric mucosa. *Arc Vet Pol* 1992; 32: 117–123.
38. Sandip K, Bandyopadhyay S, Pakrashi C, Pakrashi A. The role of antioxidant activity of *Phyllanthus emblica* fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer. *J Ethnopharmacol* 2000; 70: 171–176.

39. Mc Carthy DM. Mechanism of mucosal injury and healing: the role of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: Suppl 208: 24–9.
40. Villegas I, Martín MJ, La Casa C, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. *Inflamm Res* 2000; 49: 361–366.
41. Sánchez S, Martín MJ, Ortiz P, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Effects of dipyrrone on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa. Comparison with acetaminophen and diclofenac. *Dig Dis Sci* 2001; 47(6): 1389–1398.
42. Van der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Rad Biol Med* 1992; 12: 499–513.
43. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Iimura S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahashi S, Kondo M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 1993; 34: 732–737.
44. Ukawa H, Yamakuni H, Kato S, Takeuchi K. Effects of cyclooxygenase-2 selective and nitric-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs on mucosal ulcerogenic and healing responses of the stomach. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2003–11.
45. Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat. *Eur J Pharmacol* 1987; 142: 23–30.

46. Yamasaki K, Ishihara H, Imaizumi T, Kabe T, Yabuuchi Y. Effect of OPC-12579, a novel antiulcer agent, on chronic and acute experimental gastric ulcer and gastric secretion in rats. *Jpn J Pharmacol* 1989; 49: 441–8.
47. Sakurai K, Yamasaki K. Protective effect of rebamipid against hydrogen peroxide-induced hemorrhagic mucosal lesions in rat stomach. *Jpn J Pharmacol* 1994; 64: 229–234.
48. Naito Y, Yoshikawa T, Yanigawa T, et al. Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: Electron paramagnetic resonance study. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 117–123.
49. Pohle T, Brzozowski T, Becker JC, Van Der Voort IR, Markmann A, Konturek SJ, Momiczewski A, Domschke W, Konturek JW. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 677–687.
50. Tanaka J, Yuda Y. Lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rat. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 716–20.
51. Anderson D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 1996; 350 (1): 103–108.
52. Bast A, Haenen GRM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991; 91 (3): 1–13.
53. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274–277.
54. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995; 33 (7): 601–617.

55. Özdemir G. Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP). İstanbul Roche Bilimsel Eserler Serisi, 1993; S: 20–26.
56. Matersson JA, Mehta T, Krauss AN, Auld PA, Meister A. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects of lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. USA, Proc Natl Acad Sci 1991; 89: 5093–5097.
57. Yoshikawa T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Takahashi S, Naito Y, Kondo M. Role of lipid peroxidation and antioxidants in gastric mucosal injury induced by the hypoxanthine- xanthine oxidase system in rats. Free Radic Biol Med 1997; 23: 243–250.
58. Hirashi H, Terano A, Ota S et al. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathion. Gastroenterol 1994; 106: 1199–207.
59. Strubelt O, Hoppenkamps R. Relations between gastric GSH and the ulcerogenic action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Arch Int Pharmacodyn 1983; 262: 268–278.
60. Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martín MJ, Nieto A, Barranco MD, Cabeza J. Protective effect of melatonin on indomethacin-nduced gastric injury in rats. J Pineal Res 1999; 26: 101–107.
61. Alarcón de la Lastra C, López A, Martín MJ, La Casa C, Motilva V. Cinitapride protects against ethanol-induced gastric mucosal damage: Role of 5-hydroxytryptamine, prostaglandins and sulphydryl compounds. Pharmacol 1997; 54: 193–202.

62. Bjarnason I, Zanelli G, Smith T et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterol* 1987; 93: 480–489.
63. Mizoguchi H, Ogawa Y, Kanatsu K, Tanaka A, Kato S, Takeuchi K. Protection by drugs of experimental intestinal lesions; Protective effect of rebamipide on indomethacin-induced intestinal damage in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1112–1119.
64. Suleyman H, Altinkaynak K, Gocer F, et al. Effect of nimesulide-on the indomethacin- and ibuprofen-induced ulcer in rat gastric tissue. *Pol J Pharmacol* 2002a; 54 (3): 255–259.
65. Suleyman H, Akcay F, Altinkaynak K. The effect of nimesulide on the indomethacin- and ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol Res* 2002b; 45 (2): 155–158.
66. Bilici D, Suleyman H, Banoglu ZN, et al. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 2002c; 47 (4): 856–861.
67. Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselvam C. Effect of DL- α -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria of aged rats. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 2-6.
68. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 227-250.
69. Santhrani Thaakur and Himabindhu G. Effect of alpha lipoic acid on the tardive dyskinesia and oxidative stress induced by haloperidol in rats. *J Neural Transm* 2009; 116: 807–814.

70. Yamasaki M, Kawabe A, Nishimoto K, Madhyastha H, Sakakibara Y, Suiko M, Okamoto T, Suda T, Uehira K and Nishiyama K. Dihydro-alpha-lipoic acid has more potent cytotoxicity than alpha-lipoic acid. *In Vitro Cell Devel Biol-Animal* 2009; 45: 275–280.
71. Ghibu S, Lauzier B, Delemasure S, Amoureux S, Sicard P, Vergely C, Muresan A, Mogosan C and Rochette L. Antioxidant properties of alpha-lipoic acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated rat heart to reversible ischemia. *Mol Cell Biochem* 2009; 320:141–148.
72. Karakoyun B, Yüksel M, Ercan F, Erzik C and Yeğen BÇ. Alpha-Lipoic Acid improves Acetic Acid-Induced Gastric Ulcer Healing in Rats. *Inflammation* 2009; 32: (1) Baskıda.
73. Jia Z, Zhu H, Vitto MJ, Misra BR, Li Y and Misra HP. Alpha-lipoic acid potently inhibits peroxynitrite-mediated DNA strand breakage and hydroxyl radical formation: implications for the neuroprotective effects of alpha-lipoic acid. *Mol Cell Biochem* 2009; 323: 131–138.
74. Ruktanonchai U, Bejrappa P, Sakulkhu U, Opanasopit P, Bunyapraphatsara N, Junyaprasert V and Puttipipatkachorn S. Physicochemical Characteristics, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity of Three Lipid Nanoparticulate Formulations of Alpha-lipoic Acid. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009: Vol. 10, No. 1 (in press).
75. Long J, Gao F, Tong L, Cotman CW, Ames BN and Liu J. Mitochondrial Decay in the Brains of Old Rats: Ameliorating Effect of Alpha-Lipoic Acid and Acetyl-L-carnitine. *Neurochem Res* 2009; 34:755–763.

76. Kaur H, Mishra D, Bhatnagar P, Kaushik P, Flora SJS. Co-administration of α -Lipoic Acid and Vitamin C Protects Liver and Brain Oxidative Stress in Mice Exposed to Arsenic Contaminated Water. *Water Qual Expo Health* 2010 (in press).
77. Sadi G and Güray T. Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin-induced diabetes: effect of antioxidants. *Mol Cell Biochem.* 2009; 327:127–134.
78. Roy S, Packer L. Redox regulation of cell functions by α -lipoate. *Biofactors* 1998; 8:17-2.
79. Sigel H, Prijs B, McCormick DB, Shih JCH. Stability of binary and ternary complexes of α -lipoate and lipoate derivatives with Mn^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} in solution. *Arch Biochem Biophys* 1978;187: 208-214.
80. Grunert RR. The effect of DL-lipoic acid on heavy-metal intoxication in mice and dogs. *Arch Biochem Biophys* 1960;86: 190-194.
81. Muller L, Menzel H. Studies on the efficacy of lipoate and dihydrolipoate in the alteration of cadmium toxicity in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1052: 386-391.
82. Keith RL, Setiarahardjo I, Fernando Q, et al. Utilization of renal slices to evaluate the efficacy of chelating agents for removing mercury from the kidney. *Toxicology* 1997; 116: 67-75.
83. Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, Pittenger GL. Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 2000; 43: 957-973.

84. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med* 2004;21: 114–121.
85. Kilic F, Handelman GJ, Serbinova E, Packer L, Trevithick JR. Modelling cortical cataractogenesis 17: in vitro effect of α -lipoic acid on glucose-induced lens membrane damage, a model of diabetic cataractogenesis. *Biochem Mol Biol Int* 1995;37: 361-370.
86. Schleicher E, Wagner E, Nehrlich AG. Increased accumulation of the glyoxidation product N-epsilon-(carboxymethyl)- lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; 99: 457-468.
87. Maitra I, Serbinova E, Trischler H, Packer L. Alpha-Lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 823-829.
88. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Meissner HP, Lobisch M, Schutte K, Gries FA. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant α -lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia* 1995;38: 1425-1433.
89. Strodter D, Lehmann E, Lehmann U, Tritschler HJ, Bretzel RG, Federlin K. The influence of thioctic acid on metabolism and function of the diabetic heart. *Diabetes Res Clin Pract* 1995;29: 19-26.
90. Faust A, Burkart V, Ulrich H, Weischer CH, Kolb H. Effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced diabetes and insulinitis in non-obese diabetic mice. *Int J Immunopharmacol* 1994;16: 61-66.

91. Jacob S, Henriksen EJ, Tritschler HJ, Augustin HJ, Dietze GJ. Improvement of insulin-stimulated glucose-disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996b;104: 284-288.
92. Jacob S, Ruus P, Hermann R, Tritschler HJ, Maerker E, Renn W, Augustin HJ, et al. Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radic Biol Med* 1999;27: 309-314.
93. Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ, Dietze GJ, Henriksen EJ. The antioxidant α -lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes* 1996a;45: 1024-1029.
94. Hounsom, L, Horrobin DF, Tritschler H, Corder R, Tomlinson DR. A lipoic acid-gamma linolenic acid conjugate is effective against multiple indices of experimental diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1998;41: 839-843.
95. Rosen P, Nawroth PP, King G, et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17: 189-212.
96. Midaoui AE, Elimadi A, Wu L, et al. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 2003;16: 173-179.
97. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endoc Rev* 2002;23: 599-622.

98. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann NY Aca Sci* 2004;1011: 168176.
99. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 2004;279: 42351-42354.
100. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 1997;22: 359-378.
101. Haugaard N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol Rev* 1968;48: 311-373.
102. Prehn JH, Karkoutly C, Nuglisch J, Peruche B, Krieglstein J. Dihydrolipoate reduces neuronal injury after cerebral ischemia. *Cereb Blood Flow Metab* 1992;12: 78-87.
103. Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, Ravindranath V. α -Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1996;717: 184-188.
104. Wolz P, Krieglstein J. Neuroprotective effects of alphas-lipoic acid and its enantiomers demonstrated in rodent models of focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 1996;35: 369-375.
105. Harnett JJ, Auguet M, Viossat I, Dolo C, Bigg D, Chabrier PE. Novel lipoic acid analogues that inhibit nitric oxide synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002;12: 1439-1442.
106. Antkiewicz-Michaluk L, Krygowska-Wajs A, Michaluk J, Romańska I, Szczudlik A, Vetulani J. Plasticity of extrapyramidal dopamine system in Parkinson's disease - post mortem study. *Neurosci Res Commun* 1999;25: 97-109.

107. Jenner P, Brin MF. Levodopa neurotoxicity: experimental studies versus clinical relevance. *Neurology* 1998;50: 39-43.
108. Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. β -Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200: 710-715.
109. Kowalska A. Genetic basis of neurodegeneration in familial Alzheimer's disease. *Pol J Pharmacol* 2004;56: 171-178.
110. Hager K, Marahrens A, Kenklies M, Riederer P, Munch G. Alpha-Lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. *Arch Gerontol Geriatr* 2001;32: 275-282.
111. Frölich L, Götz ME, Weinmüller M, Youdim MBH, Barth N, Dirr A, Gsell W, Jellinger K, Beckmann H, Riederer P. (r)-, but not (s)-alpha lipoic acid stimulates deficient brain pyruvate dehydrogenase complex in vascular dementia, but not in Alzheimer dementia. *J Neural Transm* 2004;111: 295-310.
112. Van Dam PS. Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* 2002;18: 176-184.
113. Patrick L. Nutrients and HIV: part three- N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, Lglutamine, and L-carnitine. *Altern Med Rev* 2000;5: 290-305.
114. Packer L. Alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects oxidative injury. *Drug Metab Rev* 1998;30: 245-275.

115. Korkina LG, Afanas'ef IB, Diplock AT. Antioxidant therapy in children affected by irradiation from the chernobyl nuclear accident. *Biochem Soc Trans* 1993;21: 314.
116. Demir U, Demir T, Ilhan N. The protective effect of α -lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica* 2005;219: 49-53.
117. Beitner H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. *Br J Dermatol* 2003;149: 841-849.
118. Odabasoglu F, Yıldırım ÖS, Bayır Y, Halici Z, Okumuş Z, Aksakal B, Aslan A, Cakır A, Halici M, Suleyman H ve Kazaz C. Usnik asit ve difraktaik asidin titanyum alaşımli implantların konak dokulardaki kaspaz enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması. II. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi. Zonguldak-TÜRKİYE (Çağrılı Konuşma). 2006b
119. Cakatay U, Kayali R, Sivas A, Tekeli F. Prooxidant activities of alpha-lipoic acid on oxidative protein damage in the aging rat heart muscle. *Arch Gerontol Geriatr* 2005a;40: 231-240.
120. Cakatay U, Kayali R. Plasma protein oxidation in aging rats after alpha-lipoic acid administration. *Biogerontology* 2005b;6: 87-93.
121. Dicter N, Madar Z, Tirosh O. α -Lipoic acid inhibits glycogen synthesis in rat soleus muscle via its oxidative activity and the uncoupling of mitochondria. *J Nutr* 2002;132: 3001-3006.
122. Gorolska M, Dackor R, Holley B, McGahyan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 2003;76: 241-248.

123. Sen CK, Roy S, Packer L. Fas mediated apoptosis of human Jurkat T-cells: intracellular events and potentiation by redox-active α -lipoic acid. *Cell Death Diff* 1999;6: 481-491.
124. Pack RA, Hardy K, Madigan, MC, Hunt NH. Differential effects of the antioxidant α -lipoic acid on the proliferation of mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes and leukaemic T cells. *Mol Immunol* 2001;38: 733-745.
125. Mark KVD, Chen JS, Steliou K, Perrine SP, Faller DV. α -Lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. *J Cell Physiol* 2003;194: 324-340.
126. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. α -Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant $O_2^{\cdot-}$ -generation. *Apoptosis* 2005;10: 359-368.
127. Chan WH, Wu HJ, Hsuuw YD. Curcumin inhibits ROS formation and apoptosis in methylglyoxal-treated human hepatoma G2 cells. *Ann NY Acad Sci* 2005;1042: 372-378.
128. Izeradjene K, Douglas L, Tillman DM, Delaney AB, Houghton JA. Reactive oxygen species regulate caspase activation in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2005;16: 7436-7445.
129. Rayner BS, Duong TT, Myers SJ, Witting PK. Protective effect of a synthetic anti-oxidant on neuronal cell apoptosis resulting from experimental hypoxia reoxygenation injury. *J Neurochem* 2006;97: 211-221.
130. Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chereau C, Laurent A, Guillevin L, Weill B, Goldwasser F. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for

- paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2006;119: 41- 48.
131. Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE, Buist-Homan M, Havinga R, Jansen PL, Moshage H. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol* 2005;44: 918-929.
132. Pirlich M, Kiok K, Sandig G, Lochs H, Grune T. Alpha-lipoic acid prevents ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurosci Lett* 2002;328: 93-96.
133. Wirtschafter ZT, Smith FW. Effect of lipoic acid on the normal rat liver. *J Lab Clin Med* 1962;60: 649-654.
134. Cohen MR, Turco S, Davis NM. Amanita (phalloides group) mushroom poisoning. Treatment methods including use of thioctic acid. *Drug Intell. Clin. Pharmacol* 1971;5: 207-209.
135. Steyn DG. The treatment of cases of Amanita phalloides and Amanita capensis poisoning. *SA Med J* 1996;40: 405-406.
136. Floersheim GL. Treatment of humanamatoxin mushroom poisoning. Myths and advances in therapy. *Med Toxicol* 1987;2: 1-9.
137. De Champlain J, Wu R, Girouard H, Karas M, El Midaoui A, Laplante MA, Wu L. Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2004;26:593-601.
138. Vasdev S, Gill V, Parai S, Gadag V. Dietary lipoic acid supplementation attenuates hypertension in Dahl salt sensitive rats. *Mol Cell Biochem* 2005;275:135-141.

139. Lee EY, Lee CK, Lee KU, Park JY, Cho KJ, Cho YS, Lee HR, Moon SH, Moon HB, Yoo B. Alpha-lipoic acid suppresses the development of collagen-induced arthritis and protects against bone destruction in mice. *Rheumatol Int* 2006; [Epub ahead of print].
140. Evans JL, Goldfine ID. α -Lipoic acid: A multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with Type II diabetes. *Diabetes Tech Therap* 2000;2: 401-413.
141. Rahnau KJ, Meissnert HP, Finn JR, Reljanovic M, Lobisch M, Schütte K, Nehrdich D, Tritschler HJ, Mehnert H, Ziegler D. Effects of 3-week oral treatment with antioxidant thioctic acid (α -lipoic acid) in symptomatic diabetic polyneuropathy. *Diabet Med* 1999;16: 1040-1043.
142. Odabasoglu F, Halici Z, Aygun H, Halici M, Cakir A, Suleyman H, Cadirci E. Anti-inflammatory effect of the alpha-lipoic acid on carrageenan-induced paw edema in rats and its relation with some antioxidant enzymes. Abstracts from the 6th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Istanbul, July 8-11, *Drugs of the Future* 2007;32 (Suppl. A): 137-138.
143. Odabasoglu F, Halici Z, Aygun H, Cakir A, Bayir Y, Halici M, Atalay F, Cadirci E, Suleyman H. Alpha-lipoic acid has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. *Int J Vitam Nutr Res* 2009; (In Process).
144. Cadirci E, Altunkaynak BZ, Halici Z, Odabasoglu F, Uyanik H, Gundogdu C, Suleyman H, Halici M, Albayrak M, Unal B. Alpha-lipoic acid as a potential

- target for the treatment of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats 2009; Shock (Yayına kabul edildi).
145. Arıncı K, Elhan A. Anatomi I Cilt . Ankara,Güneş Kitabevi, 2001; 241-245.
146. Junquiera L-C, Corneiro J, Keley RO. Basic Histology. İstanbul: Barış Kitabevi, 1993; 356.
147. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi fizyoloji. TÜRKİYE: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 1013s.
148. Karataş C. Klasik ve çapraz gastrojejunostomi yapılan ratlarda mide boşaliminin karşılaştırılması. TC Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 1. Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi İstanbul, 2006.
149. Sen T, Abdul Salam CA, Pal S, Sen S, Chaudhuri AKN. Effect of dothiepin on gastric ulceration mediated by lipid derived eicosanoids. Life Sci 2000; 66 (23): 325–330.
150. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Feryal Matbaacılık Sanayi ve Tic Ltd Şti 3. Cilt, 7 Baskı, 1997; 2818-2856.
151. Schmassmann A. Mechanisms of ülcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 1998; 104: 43–51.
152. Mozsik G, Jovar T. Biochemical and pharmacological approach to the genesis of ulcer disease. Dig Dis Sci 1988; 33: 92–105.
153. Song-Ze D, Shiu-Kum L, Siu-Tsan Y, Benjamin Chen-Yu W, Wei-Mo H, Joanna H, Xin G, Chi-Hin C. Prostaglandin, tumor necrosis factor a and neutrophils: causative relationship in indomethacin-induced stomach injuries. Eur J Pharmacol 1998; 348: 257–263.

154. Sullivan M, Yool DA. Gastric disease in the dog and cat. *The Vet J* 1998; 156: 91-106.
155. Vatn S, Sjaastad OV, Ulvund MJ. Histamine in lambs with abomasal bloat, hemorrhage and ulcers. *J Vet Med* 2000; 47: 251–255.
156. Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K, Maity P, Banerjee RK. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radical Biol Med* 2006; 40: 1397–1408.
157. Özden A. İşte *Helicobacter pylori*, gastrit, peptik ülser. Türk Gastroenteroloji Derneği Yayını, 1996.
158. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, et al. Cyclo-oxygenase isoenzymes. *Drugs* 1997; 53: 563–82.
159. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PD, Howley CJ. Mechanism of gastric and duodenal damage and protection. *Hepatogastroenterol* 1992; 39 (Suppl. 1): 31–36.
160. Lau ATS, Graham GG, Day RO, Perry MA. Effect of aspirin on ulcer site blood flow in cat stomachs. *American J Physiol* 1992; 263 (26): G155–160.
161. Taha AS, Sturrock RD, Russel RI. Mucosal erosions in long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug users: predisposition to ulceration and relation to *Helicobacter pylori*. *Gut* 1995; 36: 334–336.
162. Lee S, Simon MD. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 1999; 106: 37–42.

163. Maricic N, Ehrlich K, Gretzer B, Schuligoi R, Respondek M, Peskar BM. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors aggravate ischemia-reperfusion injury in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1659–1666.
164. Burke A, Smyth E, Fitz Gerald GA. In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Laurence L. Brunton, Ed. Mc Graw. New-York: Hill Companies 2006;11: 671–717.
165. Suleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 2007b; 59: 257–268.
166. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15: 801–820.
167. Laine L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *J Pain Symptom Manage* 2003; 25: 32–40.
168. Takeuchi K, Kagawa S, Mimaki H, Aoi M, Kawauchi S. COX and NOS isoforms involved in acid-induced duodenal bicarbonate secretion in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2116–2124.
169. Brendan JRW. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 427–439
170. Villegas I, La Casa C, La Lastra CA, Motilva V, Herrerias JM, Martin MJ. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response. *Life Sci* 2004; 74: 873–884.
171. Takuji M, Sato H, Hirose F, Doteuchi M. Effects of antioxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci* 1987; 41: 755–763.

172. Tamasky PR, Livingston EH, Jacobs KM, Zimmerman BJ, Guth PH, Garrick TR. Role of oxyradicals in cold water immersion restraint-induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 173–7.
173. Hung CR, Neu SL. Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. *J Nutr* 1997; 127: 630–6.
174. Jung H, Kyung Eun L, Sang Hui C, Sun Young Y. Helicobacter Pylori infection reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol and Hepatol* 2001; 16: 1336–1340.
175. Jainu M, Devi CSS. Gastro protective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chemico-Biol Interac* 2006; 161: 262–270.
176. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291–295.
177. Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanol extract. *J Ethnopharmacol* 2005; 96: 171–176.
178. Jain A, Mehta T, Krauss AN, Auld PA, Meister A. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects of lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 5093–5097.
179. Hirashi H, Terano A, Ota S et al. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathion. *Gastroenterol* 1994; 106: 1199–207.

180. Fornai M, Natale G, Colucci R, Tuccori M, Carazzina G, Antonioli L, Baldi S, Lubrano V, Abramo A, Blandizzi C, Del Tac M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAİİ-induced gastric mucosal damage. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005; 372: 79–87.
181. Bayır Y. *Usnea longissima* ACH. Liken türünden izole edilen difraktaik asitin indometazin ülseri üzerine koruyucu etkisi ve in-vivo antioksidan özelliklerinin araştırılması. Sağ Bil Enst Ecz Fak Biyokimya ABD, Yüksek Lisans tezi Erzurum. 2004.
182. Sandor V, Cuparencu B, Dumitrascu DL, Birt MA, Krausz TL. Protective effects of amphetamine on gastric ulcerations induced by indomethacin in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7168–7171.
183. Berenguer B, Sanchez LM, Quilez A, Lopez-Barreiro M, Haro O, Galvez J, Martin MJ. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAİİ- induced gastric ulcers. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 194–200.
184. Barros MP, Sousa JPB, Bastos JK, Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 567–571.
185. Monteiro MVB. Ana Karine Rocha de Melo Leite, Luciana Medeiros Bertini, Selene Maia de Moraes, Diana C'elia Sousa Nunes-Pinheiro. Topical antiinflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves, *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 378–382.
186. Odabaşoğlu F. Antioksidan Vitaminler, Atatürk Üniersitesi Eczacılık Fakültesi Erzurum: Konferans Kitapçığı, 8 Mart 1999.
187. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatoljik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995; 1-80.

188. Odabaşoğlu F, Küfrevioğlu Öİ. Effects of the Treating with Pesticides and Plant Hormones on Catalase, Peroxidase, and Polyphenol Oxidase Activities in Spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Bull Pure Appi Sci* 2001; 20B(2): 79–88.
189. Rucker RB, Steinberg F. Vitamin C. *Encyclopedia of Biol Chem* 2004; 4: 367-371
190. Kanfer JG, Ashwell JJ, Burns JJ. Formation of L-lyxonic and L-xylonic acids from L-ascorbic acid in rat kidney. *J Biol Chem* 1960; 235: 2518–2521.
191. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *J Nutr* 2003; 2: 1-10.
192. Tuncer ŞD. Vitaminler: Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Ankara: Pozitif yayıncılık, 2006; 117-118.
193. Fox PF, McSweeney PLH. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Yhomson Science Pres,Blackie Academic & Professional. 1998; 289-291.
194. İmik H, Fidancı UR, Sel T. Ankara Keçisi oğlaklarında C ve E vitaminlerinin metabolik strese karşı etkisi. *Vet Bil Derg* 1999; 15: 47-53.
195. Padayatty SJ, Katz A,Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am College of Nutr* 2003; 22: 18–35.
196. Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal rush border Membrane Vesicles. *J Nutr* 2000; 130: 63–69.
197. Rose RC, Choi JL. Intestinal absorption and metabolism of ascorbic acid in rainbow trout. *Am J Physiol* 1990; 258: 1238- 41.
198. Olson JA, Hodges RE. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin C in humans. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 693- 703.

199. Huges DA. Dietary antioxidants and human immune function. *Founda British Nutr* 2000; 25: 35-41.
200. McCorkle F, Taylor R, Stinson R, Day EJ, Glick B. The effects of a mega level of vitamin C on the immune response of the chicken. *Poultry Sci* 1980; 59: 1324-1329.
201. Wu CC, Dorairajan T, Lin TL. Effect of ascorbic acid supplementation on the immune response of chickens vaccinated and challenged with infectious bursal disease virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 74: 145-152.
202. Perdue SL, Thaxton JP, Brake J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *J Applied Physiol* 1985; 58: 1511- 1516.
203. Iqbal K, Khan A, Khattak MMAK. Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health – A review. *Pakistan J Nutr* 2004; 3: 5- 13.
204. Halpern SL. Quick reference to clinical nutrition a guide for physicians. America, 1979; 175-176.
205. Belaiche J, Burette A, De Vos M, Louis E, Huybrechts M, Deltenre M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. *Acta Gastroenterol Belg* 2002; 65: 65-73.
206. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 1999; 106: 37- 42.
207. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Aslan A, Cakir A, Gocer F, Yucel O, Bayir Y. An investigation on the effects of water extract of usnea longissima on the antiulcerogenic, and some antioxidant enzymes activities on the model of indomethacine-induced ulcer in rats. Kusadası (Poster Presentation): 13th Balkan Biochemical Biophysical Days, 2003a.

208. Halici M. Ratlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde "usnea longissima" dan elde edilen su ekstresinin antiülserojenik ve bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması. Sağ Bil Enst Ecz Fak Biyokimya ABD, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2003b.
209. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon: AKÜ Yayın, 2000; 1-35.
210. Halliwell BJ, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Pres, 1989.
211. Weis SJ, LoBuglio AF. Biology of disease: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. Lab Invest 1982; 47: 5-18.
212. Odabasoglu F. Antioksidan vitaminler. Pharma Şark 2006b; 1 (1): 19–21.
213. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. Seminars in Fetal & Neonatal Med 2007; 1-9.
214. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoat K, Xin W. Nutritional aspects of free radicals. Pro Nutr Soc 1987; 46: 1-12.
215. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. J Free Rad Biol Med 1985; 1: 3-25.
216. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41(12): 1819-1828.
217. Szabo S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. Scand J Gastroenterol 1987; 127: 21-8.
218. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. Mol Biotechnol 2007; 37: 2–4.

219. Auroma O. Free radicals, antioxidants and international nutrition review. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1999; 8: 53- 63.
220. Halliwell B. Tell me about radicals, doctor: a review. *J Royal Society of Med* 1989; 82: 747-752.
221. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 7915-7922.
222. Robison TW, Murphy JK, Beyer LL, Richters A, Forman HJ. Depression of stimulated arachidonate metabolism and superoxide production in rat alveolar macrophages following in vivo exposure to 0.5ppm NO₂. *J Toxicol Environ Health* 1993; 38: 273-92.
223. Aslan R, Dündar Y. Bir fizyolojik eleman ve radikal olarak azot oksit. *Hay Araş Derg* 1998; 8: 34-38.
224. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Med Sci Monit* 1998; 4: 1089-1095.
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>.
225. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37: 1932-7.
226. Georgieva NV. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – A Review. *Bulgarian J Vet Med* 2005; 8: 1:11.
227. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
228. Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Biochem Biophys* 1978; 191: 351-357.

229. Halici Z, Karaca M, Keles ON, Borekei B, Odabasoglu F, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y, Unal B. Protective effects of amlodipine on ischemia-reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertility Sterility* 2008;90 (6): 2408-2415.
230. Karaca M, Odabasoglu F, Kumtepe Y, Albayrak A, Cadirci E, Keles ON. Protective effects of erythropoietin on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144(2):157-62.
231. Kumtepe Y, Odabasoglu F, Karaca M, Polat B, Halici MB, Keles ON, Altunkaynak Z, Gocer F. Protective effects of telmisartan on ischemia/reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertility and Sterility* 2009;(In Press).
232. Tanas S, Odabasoglu F, Halici Z, Aygun H, Aslan A, Cakir A, Suleyman H. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species on acute and chronic inflammation models. *J Natural Med* 2009 ;(In Press).
233. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Office J Turk Nephrol Assoc* 1997; 3-4: 92-95.
234. Prichard M, Ducharme NG, Wilkins PA, Erb HN, Butt M. Xanthine oxidase formation during experimental ischemia of the equine small intestine. *Can J Vet Res* 1991; 55: 310-314.
235. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free Radicals: The Pros and cons of antioxidants. *J Nutr* 2004; 134: 3143–3163.

236. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. *J Biol Chem* 1999; 274: 4985–4994.
237. Doctor RB, Mandel LJ. Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1: 959-969.
238. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England J Med* 1985; 312: 159-163.
239. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 -dioxygenase reaction. *J Biol Chem* 1971; 25: 7825.
240. Hung-Hai K, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med* 1993; 15: 621-627.
241. Ersoy A, Dilek K. Hemodiyaliz Hastalarında Eritrosit Membran Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidatif Homeostazis Değişiklikleri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg* 1999;1:1-4.
242. Jana AK, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by ultrasound: Mechanism and implications. *J Biosci* 1990; 15: 211–215.
243. Li JM, Shah AM. ROS Generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 221–226.
244. Comporti M. Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 599- 623.
245. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letter* 1991; 281: 9-19.

246. Panduri V, Weitzman SA, Chandel NS, Kamp DW. Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: 1220–1227.
247. Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 1987; 262: 8220-8226.
248. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Ann Emerg Med* 1986; 15: 1075-83.
249. Goulart M, Batoreú MC, Rodriguez AS, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagen* 2005; 20: 311–315.
250. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424: 83–95.
251. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-25.
252. Long CA, Bislskl HJ. Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species *J Phys Chem* 1980; 84: 555- 557.
253. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrah Paşa Tıp Derg* 2004; 35: 140-149.
254. Dalle-Donne Í, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chem Acta* 2003; 329: 23–38.
255. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Gebicki JM, Dean RT. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem J* 1992; 282: 621-624.

256. Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Cadirci E, Suleyman H. Gastroprotective effect of vegetable oils and alpha-tocopherol on indomethacine-induced gastric ulcer in rats and its relation with myeloperoxidase and glutathione s-transferase activities. Antalya, TURKEY: 3rd International Meeting on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry 2007b, October 16-21; P: 73.
257. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J* 1998; 335: 85-94.
258. Odabasoglu F. Alfa-lipoik asit. *Pharma Sark* 2006;1 (4): 12–15).
259. Moini H, Packer L, Saris NEL. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;182: 84–90.
260. Perricone N, Nagy K, Horvath F, Dajko G, Uray I, Zs-Nagy I. Alpha lipoic acid (ALA) protects proteins against the hydroxyl free radical-induced alterations: rationale for its geriatric topical application. *Archives Gerontol Geriatr* 1999;29: 45–56.
261. Bast A, Haenen GRMM. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1988 963: 558-561.
262. Scholich H, Murphy ME, Sies H. Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on alpha-tocopherol. *Biochim Biophys Acta* 1989;1001: 256–261.

263. Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effect of α -lipoic acid and α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 1999;27: 1114-1121.
264. Tiechert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preib R. Investigations on the pharmacokinetics of α -lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharm Th* 1998;36: 625-628.
265. Hermann R, Niebch G, Borbe HO, Fieger-Büschges H, Ruus P, Nowak H, Riethmüller H, Peukert M, Blume H. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur J Pharm Sci* 1996;4: 167-174.
266. Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA. α -Lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocr Diab* 1999;107: 421-430.
267. Lodge JK, Youn HD, Handelman GJ. Natural sources of lipoic acid: determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J Appl Nutr* 1997;49: 3-11.
268. CCAC. Guide to the care and use of experimental animals, Vol I, 2nd Ed. Canadian Council on Animal Care. Ottawa, ON, Canada: Bradda Printing Services Inc, 1993.
269. Guidobono F, Ticozzi PC, Sabilia BF, et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 581-586.

270. Abdel-Wahab MH, Arafa HMM, El-Mahdy MA, Abdel-Naim AB. Potential protective effect of melatonin against dibromoacetonitrile-induced oxidative stress in Mouse stomach. *Pharm Res* 2002; 46: 287-293.
271. Alarcon de la lastra C, Barranco MD, Martin MJ, Herrerias J, Motilva V. Extra-virgin olive oil-enriched diets reduce indomethacin-induced gastric oxidative damage in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47 (12): 2783–2790.
272. Sun Y, Larry WO, Ying LA. simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3): 497–500.
273. Aebi H. Catalase. *Method Enzymol* 1984; 105: 121-126.
274. Habig WH, Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. *Methods Enzymol* 1981; 77: 398–405.
275. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206–209.
276. Sedlak J, Lindsay RHL. Estimation of total and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192–205.
277. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
278. Tegeder I, Neupert W, Gühring H, Geislinger G. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostenoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 1161-1168.
279. Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nishimura S, Yagi N, Kondo M. Effects of free radical scavengers on indomethacin-induced aggravation of gastric ulcer in rats. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2019–2021.

280. Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1969; 4: 265–267.
281. Filaretova L, Tanaka A, Miyazowa T, Kato S, Takeuchi K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *Am J Physiol* 2002; 283: 1082-1090.
282. Whittle BJR, Laszlo F, Evans SM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in rat jejunum provoked by indomethacin. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2286–2290.
283. Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, Takeuchi K. Roles of entero bacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol Res* 1999; 40: 517–524.
284. Jansson EA, Petersson J, Reinders C, Sobko T, Björne H, Phillipson M, Weitzberg E, Holm L, Lundberg JO. Protection from nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers by dietary nitrate. *Free Radical Biology Med* 2007; 42: 510–518.
285. Eliot SN, Wallace JL. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can J Gastroenterol* 1998; 12: 559–568.
286. Takeuchi K, Ueshima K, Hironaka Y, Fujioka Y, Matsumoto J, Okabe S. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. Relation to gastric hypermotility. *Digestion* 1991; 49: 175–184.
287. Verspaget HW, Mulder TPJ, van der Sluys Veer A, Pena AS, Lamers CBHW. Reactive oxygen metabolites and colitis; a dsiturbed balance between damage end protection. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 44–51.

288. Smith SM, Kviety PR. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Crit Care Med* 1988; 16: 892–898.
289. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481–493.
290. El-Missiry MA, El-Sayed IH, Othman AI. Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 694–700.
291. Basivireddy J, Jacob M, Ramamoorthy P, Pulimood AB, Balasubramanian KA. Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. *Biochemical Pharmacol* 2003; 65: 683–695.
292. Alarcon C, Nieto A, Martin MJ, Cabre F, Herrieras J, Motilva V. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rats: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm Res* 2002b; 51: 51–57.
293. Franco L, Velo GP. A copper-complex reduced gastric damage caused by acetyl salicylic acid and ethanol. *Prostaglandins* 1996; 51: 331–338.
294. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 1395-1401.
295. Takeuchi K, Takehara K, Ohuchi T. Diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor, reduces indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Digestion* 1996; 57: 201–209.
296. Takeuchi K, Nishiwaki H, Niida H, Ueshima K, Okabe S. Duodenal ulcers induced by diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor in the rat: role of antioxidative system in teh pathogenesis. *Jpn J Pharmacol* 1991; 57: 299–310.

297. Konjeti R, Sekhar, Spitz DR, Harris S, Nguyen TT, Meredith MJ. Et al. Redox-sensitive interaction between KIAA0132 and Nrf2 mediates indomethacin-induced expression of γ -glutamylcysteine synthetase. *Free Radical Biol Medicine* 2002; 32(7): 650–662.
298. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049–6055.
299. Hemler ME, Cook HW, Lands WE. Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys* 1979; 193: 340–345.
300. Nishida K, Ohta Y, Kobayashi T, Ishiguro I. Involvement of the xanthine–xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *Digestion* 1997a; 58: 340–351.
301. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthases in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997b; 236: 275–279.
302. Yoshida M, Fukumura D, Wakabayashi G, Otani Y, Oshima A, Shimazu M, Kubota T, Kumai K, Kurose I, Miura S. Gastric microcirculatory disturbance and behavior of leukocytes after thermal-injury-intravital observation of arteriovenous shunting channels in the gastric submucosal layer. *J Gastro Hepatol* 1995; 10: 365–370.
303. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett* 1998; 425: 243–248.

304. Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001; 43: 535–541.
305. Yukgunja G, Shin H.M. Anti-oxidative herbs and indomethacin-induced rat gastric mucosal lesions. *Am Jou Chinese Med* 2001; 29: 101.
306. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matasuura H, and Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 1994; 60: 417–420.
307. Stadler RH, Turesky RJ, Muller O, Markovic J, Leong Morgenthaler PM. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat Res* 1994; 308: 177–190.
308. Presteria T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak C, Talalay P. The electrophilic counter attack responses: protection against neoplasia and toxicity. *Adv Enzyme Regul* 1993; 33: 281–296.
309. Van Lieshout EMM, Peters WHM, Jansen JBMJ. Effect of oltipraz, α -tocopherol, β -carotene and phenyl isothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1439–1445.
310. Aruna K, Sivaramakrishnan VM. Plant products as protective agents against cancer. *Ind J Exp Biol* 1990; 28: 1008–1011.
311. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione S-transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988; 202: 343–361.

312. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family; regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445–600.
313. Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. Lipid peroxidation induced by indomethacin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: involvement of indomethacin radicals. 2002; 63: 2069–2074.
314. Robert A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterol* 1975; 69: 1045–1047.
315. Harvison PJ, Egan RW, Gale PH, Christian GD, Hill BS, Nelson SD. Acetaminophen and analogs as cosubstrates and inhibitors of prostaglandin H synthase. *Chem Biol Interact* 1988; 64: 251–266.