

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

**USNEA LONGISSIMA ACH. LİKEN TÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN
DİFRAKTAİK ASİT'İN İNDOMETAZİN ÜLSERİ ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİSİ VE *İN-VİVO* ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yasin BAYIR

**Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU**

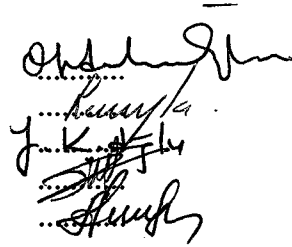
**Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2004**

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

**USNEA LONGISSIMA ACH. LİKEN TÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN
DİFRAKTAİK ASİT'İN İNDOMETAZİN ÜLSERİ ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİSİ VE *İN-VİVO* ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yasin BAYIR

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09 / 07 / 2004
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 30 / 07 / 2004
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU
Jüri üyesi : Prof. Dr. Leyla YILDIZ
Jüri üyesi : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Jüri üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ali ARSLAN
Jüri üyesi : Yrd. Doç. Dr. Halis Süleymanoğlu



Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Adnan TEZEL



Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2004

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
TABLolar LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET.....	IX
SUMMARY.....	X
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	5
1.1. LİKENLER.....	5
1.1.1. USNEA LONGISSIMA.....	7
1.1.1.1. DİFRAKTAİK ASİT.....	9
1.2. ÜLSER.....	9
1.2.1. İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN ÜLSERLER.....	13
1.2.2. LİKENLER VE ÜLSER.....	15
1.3. ANTİOKSİDANLAR.....	16
1.3.1. SERBEST RADİKALLER.....	16
1.3.1.1. SERBEST RADİKAL ÇEŞİTLERİ.....	18
1.3.1.2. SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI.....	22
1.3.1.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ.....	27
1.3.1.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	31
1.3.1.4.1. ENDOJEN (DOĞAL) ANTİOKSİDANLAR.....	32
1.3.1.4.1.1. PRİMER ANTİOKSİDANLAR.....	32
1.3.1.4.1.1.1. KATALAZ.....	32
1.3.1.4.1.1.2. GLUTATYON PEROKSİDAZ.....	33
1.3.1.4.1.1.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ.....	34
1.3.1.4.1.1.4. GLUTATYON REDÜKTAZ.....	36
1.3.1.4.1.1.5. GLUTATYON S- TRANSFERAZ.....	37
1.3.1.4.2. SEKONDER ANTİOKSİDANLAR.....	38
1.3.1.4.2.1. GLUTATYON.....	38
1.3.1.4.2.2. DİĞER SEKONDER ANTİOKSİDANLAR.....	40
1.3.4.2. EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR.....	41

1.3.4.3. GIDA ANTİOKSİDANLARI.....	41
1.3.5. ANTİOKSİDAN ETKİ TİPLERİ.....	42
2. MATERYAL METOD.....	43
2.1. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR.....	43
2.2. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR.....	43
2.3. DENEYLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI.....	44
2.4. DENEY BİTKİLERİ.....	46
2.5. <i>USNEA LONGISSIMA</i> 'DAN DİFRAKTAİK ASİT'İN İZOLASYONU..	47
2.5.1. KOLON KROMATOGROFİSİ.....	47
2.6. DENEY HAYVANLARI.....	48
2.7. RATLARDA İNDOMETAZİN-ÜLSERİNİN OLUŞTURULMASI VE DA'NIN VERİLMESİ.....	49
2.7.1.MİDE DOKUSUNUN MAKROSKOBİK İNCELENMESİ.....	50
2.7.2. MİDE DOKUSUNUN BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ.....	50
2.7.2.1. DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI.....	50
2.7.2.2. KATALAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	51
2.7.2.3. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	52
2.7.2.4. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	53
2.7.2.5. TOTAL GLUTATYON MİKTARI ÖLÇÜMÜ.....	54
2.7.2.6. LİPİT PEROKSİDASYON MİKTARI ÖLÇÜMÜ	56
2.7.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	57
3. BULGULAR.....	58
3.1. DA'NIN SPEKTRAL VERİLERLE YAPISININ AYDINLATILMASI.	58
3.2. MAKROSKOPİK BULGULAR.....	67
3.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	69
3.3.1. CAT AKTİVİTESİ ÜZERİNE DA'NIN ETKİLERİ.....	69
3.3.2. GPx AKTİVİTESİ ÜZERİNE DA'NIN ETKİLERİ.....	71
3.3.3. SOD AKTİVİTESİ ÜZERİNE DA'NIN ETKİLERİ.....	73
3.3.4. GSH MİKTARI ÜZERİNE DA'NIN ETKİLERİ.....	75
3.3.5. LPO MİKTARI ÜZERİNE DA'NIN ETKİLERİ.....	77
4. TARTIŞMA.....	80
5. KAYNAKLAR.....	89

TEŞEKKÜR

İnsanların hayatlarında dönüm noktaları vardır. Bu dönüm noktalarında hayatları anlam ve değer kazanır. Hayatta hiçbir işin tatmin edemeyeceğini düşündüğüm o günlerde beni bilimle tanıştıran, hayatıma apayrı bir boyut kazandırıp, gerçek beni bulmamı sağlayan, ihtiyaç duyduğum her anda şefkat, alaka ve maddi-manevi hiçbir desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU'na ve tabi ki tüm bunlara vesile olan, kaderden başka bizi hiçbir şeyin asla ayıramayacağı can yoldaşım, kardeşim ve meslektaşım Araş.Gör.Mesut B.HACILI'ya sonsuz şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında çok büyük emekleri olan, her türlü sıkıntıda yanımda olan ve bilimin ne derece meşakkatli ve bir o kadar da keyifli olduğunu bana öğreten, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR'a, bir çok zorluklara katlanarak dağ, bayır topladığı likenlerle çalışmama hüviyet kazandıran sayın Yrd. Doç. Dr. Ali ASLAN'a, çalışmalarım esnasında hayvanlarla çalışmayı öğreten, kıymetli hocam; sayın Yrd. Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN'a, varlığı ile bizi onurlandıran değerli hocam, Yrd.Doç.Dr.Ömer S.YILDIRIM'a ve NMR laboratuvarındaki katkılarından dolayı sayın hocam, Yrd.Doç.Dr.Cavit KAZAZ'a

Çalışmalarım esnasında kapılarını sonuna kadar açan 'Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi müdürü Doç.Dr. Zafer OKUMUŞ, Farmakoloji A.B.D. Başkanı sayın Prof. Dr. Fatma GÖÇER ve nezdinde tüm Farmakoloji A.B.D. ekibine,

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde gerçekleştirilen bu çalışmanın ortaya çıkmasında bütün imkanlarını seferber eden Fakültemiz Dekanı sayın Prof. Dr. Yunus KARA, Temel Bilimler Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU, Fakülte Sekreteri İsa İNÖNÜ ve nezdinde tüm Eczacılık Fakültesi personeline,

Yine tüm imkan ve desteklerini esirgemeyen Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümündeki bütün hocalarıma ve personeline,

Yüksek Lisans eğitimim esnasında verdiği eşsiz maddi destekler için EMBİL İlaç San.A.Ş.'den Mr.Edis EMBİL ve Dr.Koral EMBİL'e ve Abdi İbrahim İlaç San.A.Ş.'ye

Tez çalışmam sırasında ihmal etmek zorunda kalmama rağmen beni asla yalnız bırakmayan; meslektaşım, Gültekin OSMANOĞLU, canım kardeşim A. Özgür GÜVENÇ'e, gösterdiği alaka ve yaptığı fedakarlıklardan dolayı sevgili Fatma DEMİRKAYA'ya

Hayatımın her anında ve her alanında yanımda oldukları için canım aileme de sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

ŞEKİLLER LİSTESİ	Sayfa No :
Şekil 1. <i>Usnea longissima</i> 'nın doğal ortamında çekilmiş resimleri.....	7
Şekil 2. Difraktaik asidin yapısı.....	9
Şekil 3. Mide, özofagus ve duodenum ülserlerini gösteren resim.....	10
Şekil 4. Çeşitli kimyasalların oluşturduğu gastrik erozyon ve ülserlerin patojenezinde vasküler hasarın önemi.....	15
Şekil 5. Araşidonik asit metabolizması esnasında üretilen serbest radikaller.....	25
Şekil 6. GSH'nin molekül yapısı.....	38
Şekil 7. Araştırmada kullanılan Wistar ratları gösteren fotoğraf.....	48
Şekil 8. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	55
Şekil 9. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	57
Şekil 10. DA'nın UV spektrumu (CHCl ₃).....	59
Şekil 11. DA'nın IR spektrumu	59
Şekil 12. DA'nın gaz kromatografisi (GC) spektrumu.....	61
Şekil 13. Difraktaik asitin EI-kütle (MS) spektrumu.....	61
Şekil 14. DA'nın ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	64
Şekil 15. DA'nın ¹ H-NMR integrasyon spektrumu (CDCl ₃).....	64
Şekil 16. DA'nın ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	65
Şekil 17. DA'nın APT ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	65
Şekil 18. DA'nın DEPT ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	66
Şekil 19. İND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasarlı dokudan (A) ve DA (200 mg/kg) ile muamele edilmiş gruptan alınan (B) rat mideleri.....	67
Şekil 20. İND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasar üzerine farklı dozlarda uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg) ve CMC (% 1)'nin etkilerinin karşılaştırılmamı gösteren diyagram.....	68
Şekil 21. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg),RAN (50 mg/kg) CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki CAT aktivitelerinin karşılaştırılmamı gösteren diyagram.....	70
Şekil 22. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki GPx aktivitelerinin karşılaştırılmamı gösteren diyagram.....	72

Şekil 23. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki SOD aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	74
Şekil 24. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki GSH miktarlarının karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	76
Şekil 25. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki LPO miktarlarının karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	78



TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No :

Tablo 1. Difraktaik asitin ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR ve APT ¹³ C-NMR verileri.....	63
Tablo 2. İND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasar üzerine farklı dozlarda uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg) ve CMC (% 1)'nin etkilerini gösteren ölçüm sonuçları.....	68
Tablo 3. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki CAT aktivitelerini gösteren sonuçlar.....	70
Tablo 4. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GPx aktivitelerini gösteren sonuçlar.....	72
Tablo 5. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki SOD aktivitelerini gösteren sonuçlar.....	74
Tablo 6. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GSH miktarlarını gösteren sonuçlar.....	76
Tablo 7. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki LPO miktarlarını gösteren sonuçlar.....	78

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin di fosfat
AMP	: Adenozin mono fosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT	: Katalaz
CCl ₄	: Karbontetraklorür
CCl ₃	: Triklorometil
CMC	: Karboksi metil selüloz
COX	: Siklooksijenaz enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DA	: Difraktaik asit
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-Transferaz
GC	: Gaz kromatografisi
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HSV	: Herpes simplex virüs
OH·	: Hidroksil radikali
HO ₂ ⁻	: Peroksil
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MPx	: Miyeloperoksidaz
MS	: Kütle spektroskopisi

VIII

NMR	: Nükleer magnetik rezonans
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
RNA	: Ribonükleik asit
RO·	: Alkoksil radikalleri
ROO·	: Peroksil radikalleri
ROS	: Reaktif Oksijen türleri
RSO·	: Sülfenil
RSO ₂ ·	: Tiyol peroksil
SOD	: Süperoksit dismutaz
UV	: Ultra viyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Bu çalışmada, *Usnea longissima Ach.* liken türünden izole edilen difraktaik asit (DA)'ın ratlarda indometazin (İND) ile oluşturulan ülser modelindeki koruyucu etkisi (*in vivo*) araştırıldı. Her bir deney grubu 6'şar rattan oluşturuldu. 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda DA, 50 mg/kg dozda ranitidin (RAN, pozitif kontrol) ve 25 mg/kg dozda İND (negatif kontrol) oral yolla verildi. DA'yı süspansiyon haline getirmek için kullanılan (%1'lik CMC) çözeltisi İND ile birlikte ayrı bir grup olarak deneye alındı. DA'nın olası etkilerini gözlemek için bir deney grubu da İND uygulamaksızın yalnızca 100 mg/kg dozda DA verildi. Çalışmalarda kontrol grubu olarak kullanılmak üzere bir gruba da musluk suyu verildi.

İND ile muamele edilen grupta meydana gelen ülserin, uygulanan DA'nın her dört dozu vasıtasıyla önemli oranda ($p<0.05$) azaltıldığı belirlendi. Diğer yandan, antioksidant savunma sistemlerinin ülser gelişimindeki rolünün belirlenmesi amacıyla, rat mide dokularında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerinin aktiviteleri ile total glutatyon (GSH) ve lipit peroksidasyon (LPO) miktarları belirlendi. Bulgular, kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. İND uygulanan dokularda GSH miktarı ile SOD ve GPx enzim aktiviteleri azalırken, CAT aktivitesiyle LPO miktarının arttığı tespit edildi.

Elde edilen sonuçlar, gastrik hasar oluşumunda serbest radikallerin üretildiğini ve İND'nin antioksidan savunma sistemini olumsuz etkileyerek ülser oluşumuna katkı sağladığını göstermektedir. *Usnea longissima Ach.*'dan saflaştırılan DA ve RAN ile muamele edilmiş dokularda, bu maddelerin İND'nin aksine antioksidan savunma sistemini olumlu yönde etkilediğini ve gastrik mukozada üretilen reaktif oksijen (ROS) radikallerinin ülser oluşumundaki olumsuz etkilerinin azaltıldığı bulunmuştur.

SUMMARY

An investigation on the protective effects of diffractaic acid isolated from *Usnea longissima* Ach. on the indomethacine-induced ulcer model in rats, and its in vivo antioxidant properties.

In this study, the gastro-protective effect of diffractaic acid (DA) isolated from a lichen species, *Usnea longissima* Ach. in indomethacin induced ulcer model in rats was investigated, *in vivo*. Each of the experimental groups consisted from 6 rats. DA at 25, 50, 100 and 200 mg/kg doses, ranitidine at 50 mg/kg dose (positive control) and indomethacin at 25 mg/kg dose (negative control) administrated per orally. %1 CMC solution, used to prepare homogeneous suspension of DA, with indomethacin is taken under control as another group. 100 mg/kg of DA is administrated to healthy rats without indomethacin to understand the effects of DA.

It is determined that ulcers occurred in indomethacin administrated tissues were decreased significantly by all doses of DA ($p < 0.05$). In order to discuss the role of antioxidant defence systems on ulcer progress, activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), and total glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO) amounts were determined in rat stomach tissues. Results appreciated by comparing with control groups. In indomethacin administrated tissues, increased CAT activity and LPO amount in contrast to decreased activities of SOD and GPx and GSH amount were fixed.

These results suggested that free radicals are produced in the gastric mucosal damage and indomethacin also effects negatively to the antioxidant defence systems that contribute ulcer formation. It is appeared that, in DA, isolated from *Usnea longissima*, and ranitidine administrated- tissues, antioxidant defence system was affected affirmative in contrast to indomethacine-administrated tissues, and negative effects of reactive oxygen (ROS) radicals, produced in gastric mucosa were reduced.

GİRİŞ VE AMAÇ

Ülser; mide ve duodenumun multifaktöriyel-kronik inflamatuvar 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 ilaç)'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. NSAİD'ler tarafından uyarılan gastrik mukozal ülserasyon temel olarak sitoprotektif prostaglandinlerin eksikliğine bağlanır. Bu prostaglandinlerin eksikliği midede gastrik asitlerin, safra tuzlarının ve etil alkolün tahrip edici etkilerini artırmaktadır. Aspirin ve indometazin'in siklooksijenaz (COX) enzim sistemini inhibe ederek antiinflamatuvar aktivite gösterdikleri düşünülmektedir. Aspirin ve indometazin gibi antiinflamatuvar 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 hidroperoksieikozatetraenoik asidin oksijeninden türetilen gastrik mukozada tahribata sebep olan radikallerin aşırı üretimi ile sonuçlandığı kaydedilmiştir²⁻⁶.

Daha önce de belirtildiği gibi ülser midedeki koruyucu ve saldırgan faktörlerin etkileşimi sürecindeki düzensizlikten meydana gelmektedir. İndometazin uyarmalı ülser oluşumunun COX inhibisyonuyla ilişkili olduğu ve COX inhibisyonunun da prostaglandin

biyosentezini baskılayarak gastrointestinal hasara karşı bir savunma faktörü olan mukus oluşumunu engellediği rapor edilmiştir⁷⁻⁹. Bununla beraber indometazin uyarımlı mide ülserlerinin oluşum mekanizması ayrıntılı olarak henüz aydınlatılamamıştır. Bu konuda alternatif sebepler üzerine tartışmalar hala devam etmektedir. Prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışının azalması, topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi bu sebeplerden bazılarıdır¹⁰⁻¹⁴.

Son zamanlarda indometazin gibi NSAİD'ler tarafından uyarılan akut gastrik deneysel lezyonlarda oksijenden türetilen serbest radikallerin (ROS) de önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar yayımlanmıştır¹⁵⁻²². Bu çalışmalarda önemli miktarlarda üretilen oksijen metabolitlerinin ise dokuyu dejenere ederek ülsera sebep oldukları bildirilmiştir^{5,6}. 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^{23,24-39}. 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 azaltılır⁴⁰⁻⁴⁴. Şayet süperoksit ($O^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS üyeleri aşırı üretilirse, membran lipidlerinin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve ekstraselüler matriks glikozaminoglikanlarının zarar görmesine bağlı olarak doku hasarı olayı başlayabilir. Gastrik ülser oluşumunu tetikleyen mekanizmalardan birisinin de bu mekanizma olabileceği pek çok araştırmacı tarafında öne sürülmüştür^{15-17,20,25,31,37}. Serbest radikalleri etkisizleştiren sekonder moleküllerden

biri olan GSH, gastro intestinal dokuları makro molekül içeren lipitlerin oksidatif hasarlarından korumada önemli görev üstlenmiştir^{17,20,37,45-47}.

Bu gün bilinen pek çok etken maddenin indometazin ile uyarılan gastrik hasar üzerine pozitif etkileri gösterilmiştir^{17,21,27-29,32,36,37,48-56}. Diğer yandan çok sayıda bitki ekstralarının antiülserojen etkileri de rapor edilmiştir⁵⁷⁻⁷⁴.

Likenler, mantar ve alglerin bir araya gelerek teşkil ettikleri simbiyotik (ortak yaşayan) bir bitki grubudur. Günümüzde 20000 den fazla türe sahip olduğu bilinen likenlerin, ülkemizdeki florası henüz tamamlanmamış olup bölgemiz ile ilgili yapılan çalışmalar ise son derece azdır⁷⁵⁻⁷⁷. Likenlerin çok sayıda madde sentezlemekte oldukları ve bu maddelerin çoğunun biyolojik aktivitelere sahip oldukları tespit edilmiştir⁷⁸⁻⁸³. Liken ve liken metabolitlerinin gösterdiği aktivitelere bir kısmı; antiviral⁸⁴, antibakteriyel⁸⁵⁻⁹⁰, antitümör⁹¹⁻⁹³, allerjen⁹⁴, bitki büyüme inhibitörü⁹⁵, antiherbivor⁹⁶, enzim inhibitörü⁹⁷⁻¹⁰³ şeklinde sıralanabilir. Parfüm sanayinde⁸⁰, kozmetik krem sanayinde¹⁰⁴, hava kirliliğinin belirlenmesinde¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ faydalanan likenler pek çok ülkede insanlar ve hayvanlar tarafından besin kaynağı olarak da kullanılmaktadır⁸¹. Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri çok özel moleküllerden ileri gelmekte⁸⁰ ve yapılan biyolojik aktivite ölçümlerinde liken metabolitlerinin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmektedir. Üstelik bu maddelerin genellikle sitotoksik özelliklerinin az olması, ilaç özelliklerinin araştırılmasında önemli yer tutmaktadır.

Literatürde liken ekstralarının ve liken metabolitlerinin antiülserojen etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırmaya rastlanmıştır¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında bu çalışma ülserin önlenmesinde oksidatif süreç üzerinde bir liken metaboliti olan

diffraktaik asit (DA)'in etkili olup olmadığının tespit edilmesi açısından önemli bir eksikliği tamamlayacaktır. Bu araştırmada; sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modeli kullanarak bir liken türü olan *Usnea longissima ach*'dan izole edilen DA'nın invivo ülser koruyucu etkisi ve mide dokularında antioksidan etkisi; (CAT, GPx ve SOD enzimleri, GSH ve lipit peroksidasyon (LPO) düzeyleri tespit edilmeye çalışıldı.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. LİKENLER

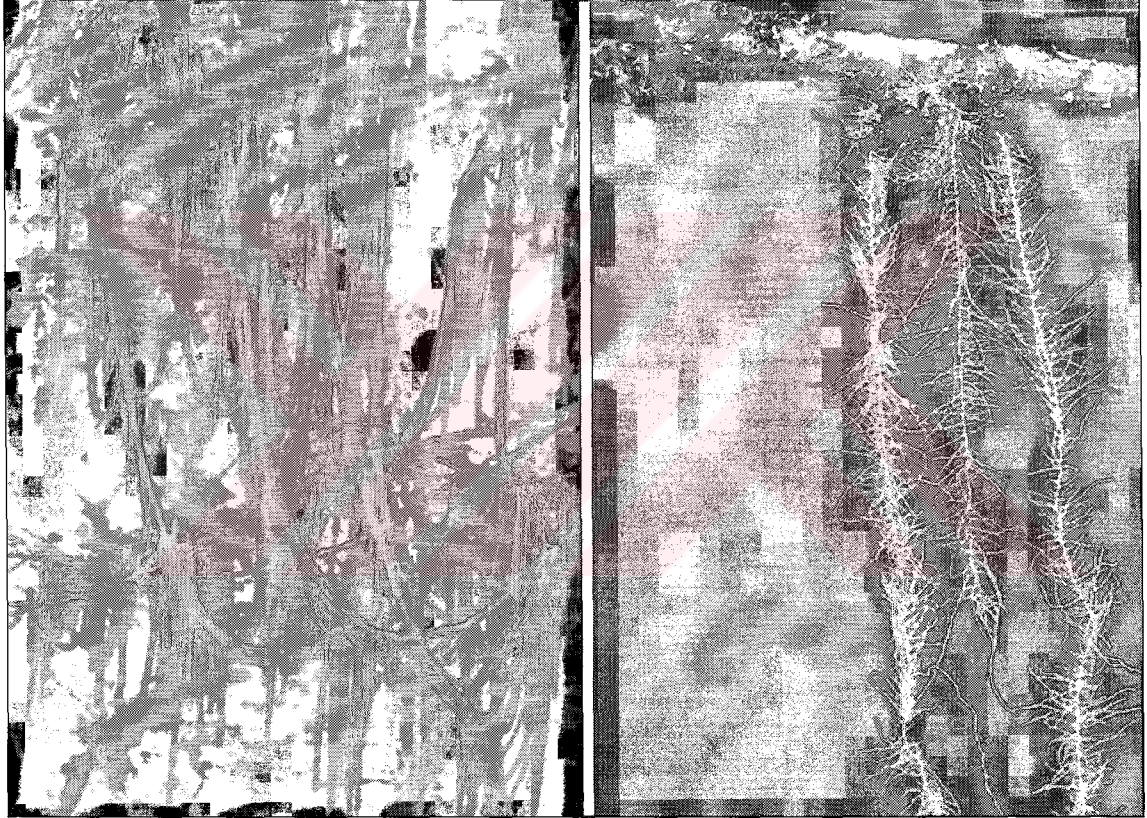
Likenler, en az iki organizmadan (fungus ve alg) oluşan bitkilerdir. Fungus, kendi karbonhidratını üretemez, fotosentez partneri olan alg ve cyanobakterilerden hazır olarak alırlar. Bunlar da ekosistem için çalışır ve fungus için glukoz üretirler. Cyanobakteriler ise azot üretir. İki organizma da tek başlarına yaşayamayacakları yerlerde beraber kolonize olup yaşayabilirler. Likenler, dünyada ve ülkemizde çok eski zamanlardan beri halk hekimliğinde bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bir çok ülkedeki yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre, dünyada tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam tür sayısı 20 000 civarındadır⁷⁵⁻⁷⁷. Ülkemizde 9000'e yakın bitki türünün doğal olarak yetiştiği ve bunların kimyasal içerikleri hakkındaki çalışmaların yok denecek kadar az olduğu da vurgulanmaktadır¹¹¹. Bitkisel organizmalar içerisinde incelenen likenler de antik çağlardan beri tıbbi özellikleri itibariyle değerlendirilmişlerdir¹¹². Fungus (mycobiont) ve alg (phycobiont) partnerlerinin oluşturduğu simbiyotik bitkiler olan likenler, yavaş üremelerinden kaynaklanan rekabette zayıf kalma dezavantajlarını, ürettikleri özel maddeler sayesinde telafi ederler. Özellikle aromatik yapılı sekonder metabolitler, onların en güçlü antagonistik maddelerini oluşturmaktadır. Diğer taraftan likenlerin boya ve parfümeri sanayisinde ham madde olarak^{80,113,114} ve hava kirliliği indikatörü olarak^{105-107,115,116} kullanıldıkları da kaydedilmiştir. Her ne kadar likenlerin global krizlerde besin kaynağı olarak kullanılabileceği teklif edilmişse de, doğal yolla üremeleri çok yavaş olduğundan, bu tür bir değerlendirmenin ekonomik olmadığı ifade edilmiştir¹¹⁷.

Likenler, yeterli nemin bulunduğu kızgın çöllerde, arktik ve antartik bölgelerde yüksek dağların dondurucu soğuklarında, diğer bitkilerin yaşayamadığı taşlar, verimsiz topraklar, kuru ağaç kabukları ve kiremitler üzerinde dahi yetişebilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı dünyanın hemen her yerinde yayılış gösterdikleri rapor edilmiştir⁸³. Türkiye florası likenler bakımından oldukça zengin olmasına rağmen taksonomik, floristik ve kimyasal liken metabolitleri üzerinde çalışmalar son yıllarda başlamıştır. Avrupa ülkelerinde, likenlerin 16.yüzyıldan beri, çeşitli hastalıkların tedavisinde dekoksasyon veya infüzyon şeklinde kullanıldığına dair bir çok kayıt bulunmaktadır^{89,91}. İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra mevcut antibiyotiklerin azlığı üzerine, likenler üzerinde antimikrobiyal araştırmaların yapılmasına yol açmıştır. Likenlerde bulunan antimikrobiyal etki, yapılarında bulunan asitlerden ileri gelmektedir. Farklı liken türlerinden izole edilmiş protolikesterinik asit, pulvinik asit türevleri, depsid grubundan evernik, olivetorik asit, tridepsid grubundan giroforik asit, depsidon grubundan fisodik, lobarik, fumarprotosetrarik asitler ile dibenzofuran türevlerinden usnik asitin antimikrobiyal etkileri saptanmıştır¹¹⁸.

Likenlerde bulunan maddelerin çoğu asit özelliği gösterdiği için bunlara karakteristik liken asitleri denilmektedir. Likenlerin kayaları parçalama özelliğini sentezledikleri bu asitler vasıtası ile gerçekleştirdiklerine inanılmaktadır. Likenlerin bu asidik maddeleri %1-5 oranında, çoğu zaman da %25 oranında içermeleri bu maddelerin izolasyonunu kolaylaştırmakta, dolayısıyla da likenlerin bu yönüyle tohumlu bitkilerden daha fazla önem kazanmasına neden olmaktadır⁷⁷. Uzun zamandır hastalıkların önlenmesinde kullanılan likenlerin iyileştirici özelliklerinin, yapılarında bulunan asitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir¹¹⁹. Liken primer metabolitleri yalnız algler tarafından fotosentezle sentezlenmektedir. Likenlere özgü çeşitli polisakkaritlerin yanı

sıra çeşitli amino asit, amin ve proteinler de likenlerden izole edilmiş primer metabolitlerdir¹²⁰. Likenler tarafından sentezlenen bulunan alifatik ve aromatik bileşikler ise sekonder metabolitler olup günümüze kadar 300'den fazla sekonder metabolitin saflaştırılarak yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak karakterize edilmiştir^{79,80,121}.

1.1.1. *Usnea longissima*



Şekil 1. *Usnea longissima*'nın doğal ortamında çekilmiş resimleri.

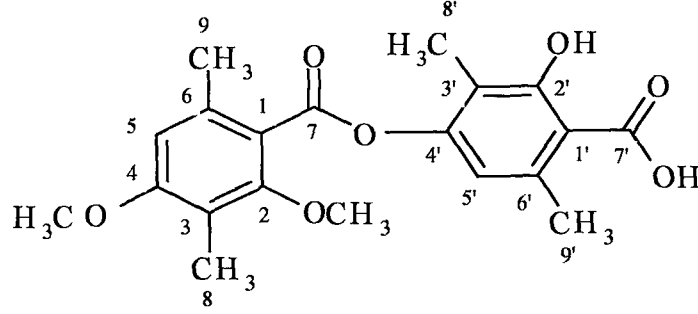
Usnea longissima Ach. tallusu asılı durur, oldukça uzundur(Şekil 1). Ağaçlar üzerinde bulunur (epifit). Genellikle gölge ve nemli bölgeleri sever, kirliliğe en duyarlı likenlerden biridir. Varlığı saf havaya delalet ettiği gibi, yokluğu da hava kalitesinin düştüğünü gösterir. Konifer yağmur ormanları gibi bolca bulunduğu bölgelerde geleneksel olarak çocuk bezi imalatında kullanılmıştır. Ayrıca, kadınlara yönelik hijyen

ürünlerinin yapımında ve çeşitli ilaçların terkinbinde yer almıştır. Çin ve Hindistan'da ekspektoran, Avrupa'da ise saçları güçlendirmek için kullanılmıştır¹²².

Hindistan'da yerliler tarafından bazen astım oluşturdukları düşünölen yastık ve minderlerin doldurulmasında kullanılan maddelere alternatif olarak kullanılmışlardır¹²³. Ayrıca İngiliz Kolombiyası'nda Queen Charlotte Adaları yerlileri tarafından sıcak katranın ilaç olarak kullanılmadan önce safsızlıklarının giderilmesi amacıyla da kullanmışlardır¹²⁴ ve mevsimlik kamplarda hijyenik yatak olarak kullanılmıştır¹²⁵. Vancouver Adası'nın batı kıyısındaki Nitinaht yerlileri tarafından absorban özellikleri dolayısıyla bebek bezi, kadınlar için sağlık ürünleri (hijyenik ped), ve som balığının temizlenmesinde¹²⁶, Hindistan'da ise kemik kırıklarının tedavisinde kullanıldıkları rapor edilmiştir¹²³. Bir liken türü olan *Usnea longissima Ach.* terlemeyi, baş dönmesini, üşümeyi, ağrıyı ve balgamı önlemek amacıyla kullanılmasının yanı sıra üriner sistem için de faydalı olduğu ve dişi genital sistemi şişmesini önlediği bilinmektedir¹²⁷. Ekspektoran olarak kullanımının yanı sıra ülserle karşıda kullanılmıştır^{119,128}.

Bu likenden izole edilen bazı bileşikler usnik asit, barbatik asit, difraktaik asit, 4-O-dimetilbarbatik asit(\pm), evernik asit, β -orsinol, β -orsinolkarboksilik asit, squamatic asid (\pm), atranorin (\pm) ve yağ asitleri (\pm)^{129,130}, ve likenin¹²¹ olarak sıralanabilir.

1.1.1.1. Difraktaik Asit (C₂₀H₂₂O₇)



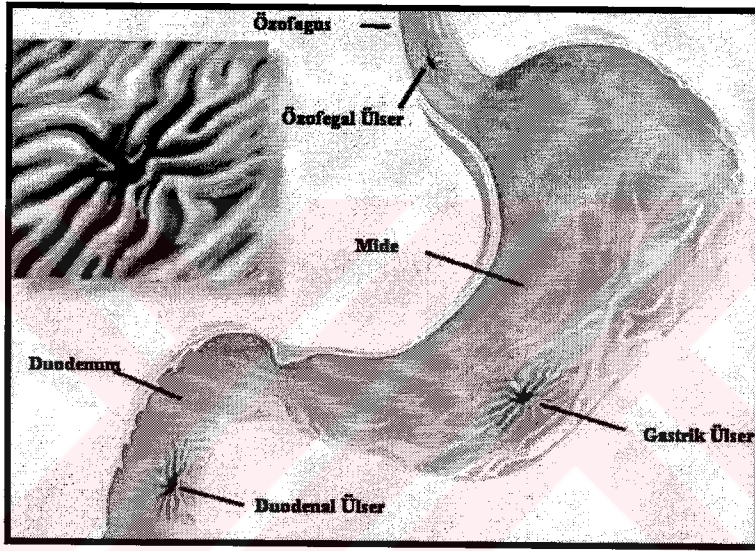
Şekil 2. Difraktaik asitin molekül yapısı

DA, liken metabolitleri içerisinde depsitler sınıfına dahil edilen bir didepsittir. Daha önce yapılan çalışmalar da *Usnea*, *Alectoria*, *Parmelia*, *Cetraria* cinslerinde bulunduğu rapor edilmiştir (Şekil 2)^{78,80}. Literatürde, yapılan araştırmalarda DA'nın analjezik ve antipiretik¹³¹, antiviral¹³², antitümör¹³³, antiproliferatif¹³⁴ ve lökotrien biyosentez inhibitörü¹³⁵ özellikleri rapor edilmiştir. Bu araştırmada *Usnea longissima*'dan izole edilip saflaştırılan difraktaik asitin ülser koruyucu ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen veriler dünya literatüründe ilk kez yer alacaktır.

1.2. ÜLSER

Sindirim sisteminin en geniş yerini teşkil eden mide, iç yüzü mide mukozası ile kaplı kastan (düz kas) yapılmış, oldukça geniş bir torbadır. Kendisinden sonra onikiparmak barsağıyla (duodenum) devam eder. Yukarıda yemek borusu ile birleşir. Torba şeklinde olduğundan şekli; doluluk derecesine, kasının kasılma durumuna (tonus), solucanvari hareketlerine, vücut yapısına, ayakta yada yatar vaziyette oluşuna, komşu organların durumuna göre değişir. Midenin 2 ucu vardır. Her iki ucu da sfinkter

dediğimiz birer büyük(kapak) ile içindekileri içinde tutmağa çalışır. Diyafram ile göğüs boşluğundan ayrılır. Midenin başlıca 2 fizyolojik aktivitesi vardır; 1- Midenin hareketi (motilite); Yiyilen yiyeceklerin depo edilmesi, öğütülmesi, birbirleriyle ve mide sıvısıyla karışmalarını sağlayarak oluşan materyalin 12 parmak barsağına, düzenli bir şekilde geçirilmesi. 2- Midenin asit ve pepsin salgılaması; Besinlerin parçalanmasını ve birbirine iyice karışmasına yardımcı olması¹³⁶.



Şekil 3. Mide, özofagus ve duodenum ülserlerini gösteren resim

Peptik ülser mide ve duodenumda (ince barsakların ilk parçası) oluşan enflamasyonlardır(Şekil 3). Peptik ülser; travma, stres, sepsis, hemorajik şok, yanıklar, pulmoner ve karaciğer hastalıkları, rezerpin, epinefrin, steroidler, sigara kullanımı, NSAID ve alkol gibi iyi bilinen pek çok faktörün sebep olduğu bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık %60-80'ninde etiyolojik faktör bilinmemektedir^{1,137}. Stres¹, etanol^{138,139}, NSAID'ler^{138,140} ve özellikle de iskemi reperfüzyon¹⁴¹ ile ilişkili gastrik mukozal hasarda oksijen kökenli serbest radikaller patojen faktörler olarak kabul edilmektedirler¹⁴². Etanolle oluşturulan gastro duodenal hasarlarda serbest radikal

oluşumunun patojenik faktörlerden biri olduğu birçok araştırmacı tarafından da doğrulanmıştır^{138, 141,143, 144}.

İnsanlarda tüm aerobik hücrelerde üretilen oksijen türevli serbest radikaller olan süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil (OH^{\cdot}) radikalleri ile bu radikallerin kaynakları veya ürünü olan singlet oksijen (1O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) pek çok zararlı etkiye sahiptir. Eğer hemen ortamdan uzaklaştırılmazlarsa, biyolojik sistemlere toksik etki yaparlar. Toksik etki protein inaktivasyonuna, DNA hasarına ve lipit peroksidasyonuna sebep olarak hücrenin yapısal ve fonksiyonel aktivitelerini oksidatif hasara uğratar. Bu hasarı önlemek üzere SOD, CAT, GPx ve GR gibi enzimler radikal süpürücü olarak görev yaparlar¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Dokularda normalde de az miktarda oluşan serbest radikallere karşı korunmak için SOD, CAT, GR, MPx ve GPx gibi enzimler mevcuttur¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Fakat bu enzimler ekstraselüler sıvıda fazla miktarda bulunmadığı için insan ve diğer tüm memeli hücreleri in vitro olarak ekstraselüler oksijen kökenli radikallere maruz kaldığından tahrip olurlar. Respiratuar ve gastrointestinal kanalı döşeyen hücreler oksijen kökenli radikallere sıkça maruz kalırlar. Askorbat ve demir tuzları gibi maddelerin aşırı tüketimi veya akciğerlerin birkaç yıl sigara içimine maruz kalması ile gözlenebilen bir hasar oluşması için yıllar geçmesi gerekir. Oysa oksijene maruz kalmış izole hücrelerde benzer hasarlar birkaç dakika veya birkaç saatte oluşabilmektedir. Bu farklılığı açıklayacak faktörlerden birisi de epitelyal hücre hasarından sonra yüzey epitelinin in vivo olarak hızla çoğalabilmesidir. Bu süre zedelenmiş gastrik mukozada birkaç saatten az bir süredir.

Diğer taraftan oksijen radikallerinin sebep olduğu büyük gastrik mukozal hasarların mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Oksidan maddeler, polidoymamış yağ asitleri, kükürt içeren amino asitli proteinler ve nükleik asitlerle kolayca reaksiyona girerler¹⁴⁷. Bu durum membranın vital özelliklerini değiştirerek, epitelin ve endotelin bariyer özelliğini tahrip edebilir. Oksijen radikalleri, araşidonik asit metabolizmasının ürünleri ile de etkileşerek tromboksan oluşumunu sitümüle (uyarma) eder ve gastrik mukozayı sekonder mekanizmalar aracılığı ile tahrip eder. Tromboksan ise mukozal ve submukozal damarları kontrakte ederek gastrik mukozal kan akımını durdurur^{148,149}.

Oksijen radikallerinin diğer bir kaynağı da polimorfo nükleer (PMN) lökosit'lerdir. Nötrofillerin süperoksit'e bağlı birikim ile nötrofil kökenli oksidanların sebep olduğu mikro vasküler rezistanstaki artış da gastrik mukozada oksijen radikallerinin sebep olduğu hasarların patojenik faktörlerinden biridir¹⁴⁸⁻¹⁵².

Bu nedenle, akut gastrik mukozal hasarların gelişmesine karşı korunmada endojen antioksidan savunma mekanizmaların oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir. Tripeptit yapısında olan GSH, özellikle insan ve sıçan gastrik mukozasında yüksek konsantrasyon da bulunan endojen bir antioksidandır^{138,142,153}. Glutatyon'un doğal bir süperoksit radikali toplayıcısı olduğu ve sellüler bütünlüğün devamı için gerekli olan protein-tiol gruplarını oksidasyona karşı koruduğu bilinmektedir¹⁴².

Gastrointestinal mukusun da fizyolojik bir antioksidan olduğu düşünülmektedir. Çünkü mukus epitel hücrelerini tamamen kapatarak lümen ile epitel arasında fizyolojik bir bariyer oluşturur¹⁴⁵ mukus, OH• radikali ve H₂O₂ ile reaksiyona girerek alttaki epiteli oksidatif hasardan korur.

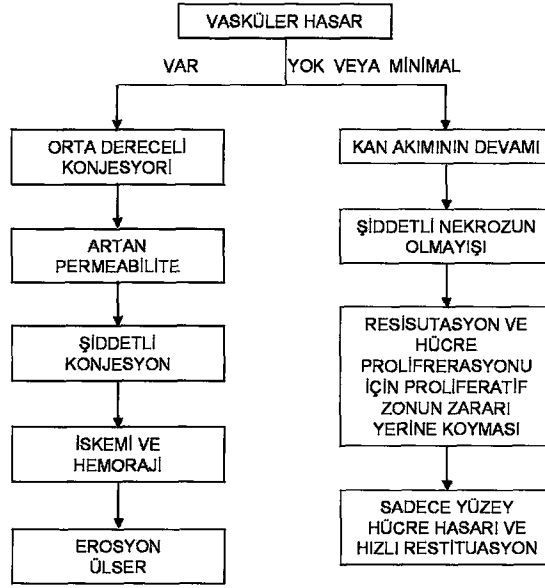
Ülsere en büyük nedenlerden biride "*Helicobacter pylori*" adlı bir etkenidir. Birçok ülser *Helicobacter pylori* mikrobuunun varlığı ile meydana gelir. Bu bakteri midede mukus tabakası ile mide epitelini arasına yerleşerek yaşamını sürdüren kıvrık veya spiral şekilli bir bakteridir. *Helicobacter pylori* mide asidini nötralize eden enzimler salgılayarak asidik mide ortamında yaşayabilme yeteneğine sahiptir. Bu mekanizma ile bakteri koruyucu mukus tabakasına kadar ulaşan bakteri spiral şekilli olmasından dolayı kıvrılarak mukus tabakası boyunca ilerler, ve koruyucu mukus tabakasını zayıflatarak mide asidinin duyarlı alt tabakalara geçmesine olanak sağlar. Böylece mide asidi ve bakterinin kendisi birlikte bu tabakada doku hasarı meydana getirerek ülser oluşumuna neden olur^{5,20,65,68}.

1.2.1. İndometazinle Oluşturulan Ülseler

İndometazin, diğer nonsteroidal antiinflamatuar ilaçlar gibi siklooksijenaz enzimini inhibe ederek prostaglandin sentezini azaltır. Siklooksijenaz enziminin vücutta iki izoenzimi vardır. Bunlar COX-1 ve COX-2'dir. Vücutta en fazla bulunan tip COX-1 olup, fizyolojik uyarılarla aktive olan formdur. COX-1 damar endoteli, mide mukozası, böbrek, kalp ve trombositlerde bulunur. COX-2 ise enflamatuar uyarılarla aktive olan formdur. Makrofajlarda ve diğer enflamatuar hücrelerde bulunur ve iltihap etkenleri ile indüklenebilir. Aspirin ve indometazin, COX-1'i daha fazla inhibe ederken COX-2 üzerine etkileri nispeten daha azdır. Halbuki flurbiprofenin COX-1'e olan inhibitör etkisi COX-2 ye göre daha düşüktür. COX-2 üzerine olan inhibitör etkileri COX-1'e göre daha fazla olan NSAİD'lerden meloksikam, tenoksikam ve nabumeton halen tıbbi kullanımı yaygın olan ilaçlardır. Gastrik bikarbonat ve mukus sekresyonunun azalması indometazinin hasarlaştırıcı etkisine yardım eder. Vasküler hasar etanol veya

indometazin tarafından uyarılan şiddetli gastrik mukozal lezyonların patojenizinde hız sınırlayıcı bir basamak gibi görünmektedir^{154,155}.

Eğer vasküler hasar mevcutsa, süperfisyal mukozal kapiller kan akımı düşer 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 oluşur (Şekil 4). Eğer 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 etanolla yıkıldığı halde hasardan 15-60 dakika sonra derindeki küboidal 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. Böylece vasküler endotel, gastrik lezyonları önlediği veya azalttığı düşünülen yeni ilaçlar için terapötik bir hedef olarak gösterilmektedir¹⁵⁶.



Şekil 4. Çeşitli kimyasalların oluşturduğu gastrik erozyon ve ülserlerin patojenezinde vasküler hasarın önemi.

1.2.2. Likenler ve Ülser

Likenler yapılanmaları, yaşadıkları çevre koşulları, temizliğine, tutundukları kayanın minerallerine ve iklim koşullarına kadar birçok etkiye göre renk ve gelişme gösterdiklerinden, meraklı bakışlara kendileri ile birlikte çevrelerinin sınırlarını da açığa vururlar. Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri çok özel moleküllerden ileri gelmekte⁷⁸⁻⁸⁰ ve yapılan biyolojik aktivite ölçümlerinde liken maddelerin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmekte, üstelik bu maddelerin sitotoksik özelliklerinin az olması da ilaç özelliklerinin araştırılmasında ön planda tutulmaktadır. Liken ekstraktlarının ve likenlerden elde edilen moleküllerin antiülserojen etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırma vardır^{108,109,157,158}. Antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır.

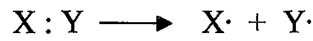
1.3. ANTIÖKSİDANLAR

1.3.1. Serbest Radikaller

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağ yapısına girebilir. Ayrıca iki elektronun zıt spinli olması gerekir. Elektron çiftleri oldukça kararlıdır ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları “elektron çifti” halinde bulunur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (heterolitik parçalanma) ya da ayrılırlar (homolitik parçalanma). Eğer birlikte kalırlarsa kimyasal bağ heterolitik olarak parçalanır, homolitik olarak parçalanır ise *serbest radikaller* oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp onların fonksiyonlarına engel olurlar. Bu özellikleri serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapmaktadır. Bu nedenle, serbest radikaller yaşam için gereklidir ve elektron transferinin de, enerji üretiminde ve pek çok diğer metabolik olaylarda önemli ürünlerdir. Şayet zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bilim adamları 1954'lerden beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bilmektedirler. Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikaller bu elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdururlar. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron serbest radikal olur. Bu tip moleküller ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça aktiftirler ve bu yüzden nüfuz edici özelliğe sahiptirler¹⁵⁹.

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler:

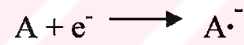
1 - Kovalent bağlı bir molekülün herbir atom, kovalent bağı oluşturan elektron çiftinden birer elektron alır ve genellikle yüksüz atomlar ya da atom grupları oluşur. Bu bölünme şekline homolitik olarak bölünme denir. Bu bölünme sonucunda oluşan atom veya atom gruplarına radikal denir.



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 kalırlar. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



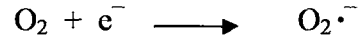
3 - Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



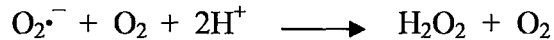
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalleridir¹⁴⁵. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları sonucu genellikle hidroksil radikalleri meydana gelir. Oksijen molekülünün elektronları o şekilde dağılmışlardır ki bu elektronlardan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir di radikal olarak değerlendirilmektedir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise nispeten daha yavaş tepkime vermesini sağlar. Oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu çok sayıda reaktif ürün oluşmasına rağmen son indirgenme ürünü sudur.

1.3.1.1. Serbest Radikal Çeşitleri

Süperoksit Radikali : Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde enerji metabolizmasında, oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucunda oksijenin bir elektron alması sonucu serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir.



Süperoksit bir radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak zarar vermez. Süperoksitin zararlı etkileri çok iyi anlaşılmasına rağmen, yüksek derecede toksik olduğuna dair birçok deliller bulunmaktadır^{160,161}. Oksidatif hasarda nadiren rol almalarının nedeni hızlı bir şekilde süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen perokside (H_2O_2) dönüştürülmeleridir. Buna ilaveten asidik durumlarda H_2O_2 ve peroksil ($HO_2^{\cdot-}$) radikalleri üreten spontan protonasyona da uğrarlar¹⁶¹. Süperoksit radikallerinin asıl zararları, yukarıda da bahsedildiği gibi hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır.



Süperoksit fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana getirir.

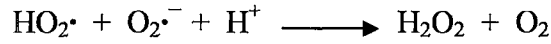


Böylece NO deaktive edilmiş olur. Bununla beraber, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkilerinin yanı sıra azot protoksit (NO_2^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve nitronyum iyonu (NO^+) gibi başka toksik ürünlerin oluşumunu katalizlerler.

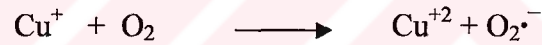
Süperoksit anyonu hem oksitleyici (yükseltgeyici) hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksil amini oksitler, nitrobluetetrazolium

ve sitokrom c'yi indirger. Redükta (indirgeyici) olarak görev yaptığında, ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir¹⁵⁹.

Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir¹⁴⁸.

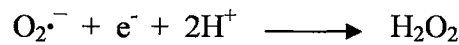


Diğ taraftan indirgenmiş geçiş metallerinin oto oksidasyonu da süperoksit meydana getirebilmektedir¹⁴⁷.



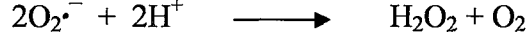
Bu reaksiyonlar geriye dönüşlü redoks reaksiyonları olarak kabul edilmektedir ve serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir¹⁶².

Hidrojen Peroksit : Asidik ortamda moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir^{148,163}.

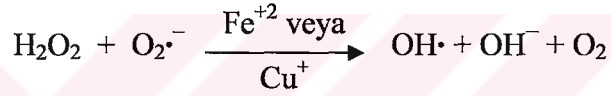


Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. Süperoksit molekülü proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur¹⁴⁷. Bu dismutasyon ya spontandır ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır.

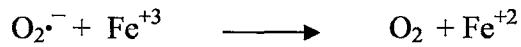
Süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon ise daha geniş bir pH aralığında olur.



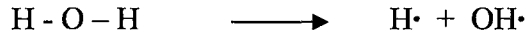
H_2O_2 kendi başına serbest radikal değildir, çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir^{160,164}. Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir¹⁴⁸.



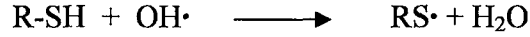
Bu reaksiyona Haber - Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber - Weiss reaksiyonu katalizör varlığında veya katalizörsüz cereyan eder. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten $\text{OH}\cdot$ ve OH^- üretilir¹⁵⁴. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir¹⁴⁷.



Hidroksil Radikali : Suyun hidroliziyle (yüksek enerjili iyonize edici reaksiyona maruz kalması) ya da parçalanmasıyla hidrojen radikalleri ve hidroksil radikalleri oluşturabilir. Hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle de (Fenton reaksiyonu) meydana gelir¹⁴⁸.



Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Oluştuğu yerde büyük hasara neden olur. Hidroksil radikali birçok biyolojik molekülden hidrojen atomu koparır. Bunlardan birisi de tiollerdir.



Meydana gelen sülfür radikali oksijenle birleşerek $\text{RSO}_2\cdot$ ve $\text{RSO}\cdot$ gibi oksisülfür radikallerini meydana getirir. Bu radikaller de biyolojik moleküllerde hasar yapıcı etkiye sahiptir.

Belki de hidroksil radikalının en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu artırmasıdır. Bu durum hidroksil radikallerinin membranlara yakın bir yerde üretilmesi ve membran fosfolipid zincirinin yağ asidi tabakasına atak yapması ile meydana gelir. Bu radikalın araşidonik asit gibi doymamış yağ asitlerine olan ilgisi daha fazladır.

Singlet Oksijen : Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Singlet oksijen elektronlarından birinin enerji alarak ters spinli başka bir orbitale uyarılması sonucu oluşur¹⁵⁹.

Diğer Radikaller : Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($\text{R}\cdot$), peroksil radikalleri ($\text{ROO}\cdot$), alkoksil radikalleri ($\text{RO}\cdot$), tiyol radikalleri ($\text{RS}\cdot$) gibi önemli serbest radikaller de oluşabilir. Bunlardan özellikle polidoymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol

radikalleri ise oksijenle tekrar reaksiyona girerek sülfenil (RSO•) veya tiyol peroksil (RSO₂•) vb. gibi radikalleri oluşturabilirler.

1.3.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik Kaynakları :

- Aktive olmuş fagositler: (Respiratory Burst)^{147,159}.
- Antineoplastik ajanlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin.
- Radyasyon¹⁵¹.
- Bağımlılık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular.
- Çevresel ajanlar : Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler , hiperoksitler, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezipler ve aromatik hidrokarbonlar.
- Stres : Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu olay, stresin hastalıkların patojenezindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

İntrasellüler kaynakları :

- Küçük moleküllerin oto oksidasyonu : Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler^{163,164,165}.
- Enzimler ve proteinler : Ksantin oksidaz, dioksijenaz, hemoglobin. Birçok enzimin katalitik siklusu esnasında serbest radikaller açığa çıkar. Ksantin oksidaz serbest radikal oluşturan enzimler içinde en çok araştırılmış olanıdır¹⁴⁷. Normalde NAD (Nikotinamid adenin dinükleotid) bağımlı dehidrojenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat, in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrojenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep

olur¹⁶³. Aldehit oksidaz da yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksit radikali üretir. Benzer şekilde triptofan dehidrojenaz gibi enzimler de radikal oluşumuna sebep olurlar^{147,166}.

- Mitokondriyal elektron transportu: Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynaklarından biri elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar¹⁴⁷. Böylece NAD^+ bağlı substratlar, süksinat, ADP (Adenozin di fosfat) ve oksijen gibi endojen faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretimine etki ederler.

- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri: (Sitokrom P-450, sitokrom b_5) Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve b_5 , doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları ise okside ederler.

- Peroksizomlar, oksidazlar, flavoproteinler: Peroksizomlar çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Bu organeldeki D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl COA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda H_2O_2 üretimine sebep olurlar. Ancak peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir¹⁴⁷.

- Aktive olmuş fagositler: Bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksit üretirler^{148,151,152}.

- Plazma membranı: Plazma membranı serbest radikal oluşum reaksiyonlarının kritik bir bölgesidir. Ekstraselüler olarak üretilen serbest radikaller diğer hücre bileşenleri ile reaksiyona girmeden önce plazma membranını geçmek zorundadırlar. Bu geçiş

sırasında membranda toksik maddeleri üreten reaksiyonlar başlatabilirler. Membrandaki fosfolipitlerin, glikolipitlerin, gliseridlerin ve sterollerin bünyesinde bulunan ve doymamış yağ asitleriyle okside olabilen transmembran proteinleri serbest radikal hasarından çabuk etkilenirler. Lipit peroksidasyonu veya yapısal olarak önemli proteinlerin oksidasyonunun sebep olduğu artmış membran permeabilitesi; transmembran iyon gradiyentinin bozulmasına, sekretuar fonksiyonlarının kaybına ve intresellüler metabolik olayların inhibisyonuna sebep olur¹⁴⁷.

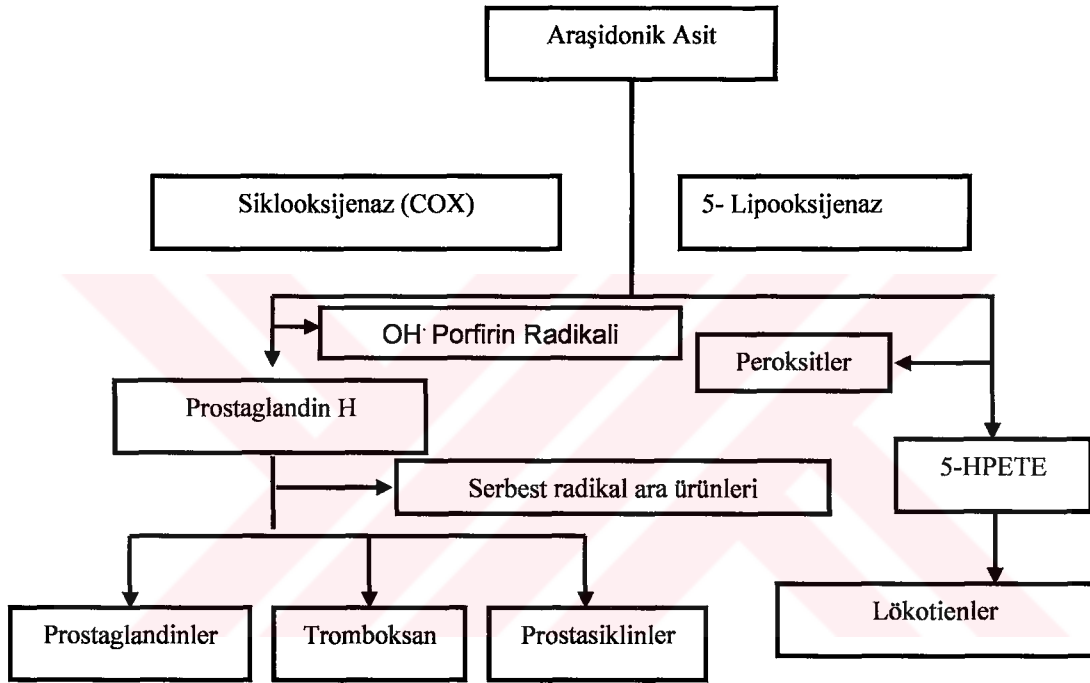
Hidrojen peroksit, membranları neredeyse su kadar kolay geçebilme özelliğine sahiptir. Saldırgan $O_2^{\cdot-}$ radikal anyonu ise membranları ve transmembranal anyon kanallarını geçerek hücreye girer. Aynı zamanda polianyonik hücre yüzeyi, çevre doku sıvısından 2-3 pH daha düşük olduğu tahmin edilen, bir mikro çevre sağlayan, çoğu çözülmüş H^+ den oluşan son derece zıt bir konsantrasyonu çeker. Bu pratik çevre $O_2^{\cdot-}$ nin protonla reaksiyonu sonucu perhidroksil radikalinin oluşumunu sağlar¹⁴⁷.



$HO_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ den daha güçlü bir oksidandır, bu nedenle lipitlerin ve proteinlerin hidrofobik kısımlarını daha iyi parçalayabileceği ve toksik etkisini daha fazla olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple saldırgan oksijen radikallerine karşı bir bariyer oluşturan hücre yüzeyleri, diğer radikal türlerine reaktif bir forma modifiye eden ve daha permeabl bir kapı görevi görür. Serbest radikallerin fagositik hücre plazma membranında, NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat)-oksidaz aracılı üretimi, serbest radikallerin önemli bir biyolojik kaynağıdır¹⁴⁸. Fagosit kökenli serbest radikaller hem oluştukları hücreye, hem de yakınında bulunan hücrelere hasar verirler.

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 anafleksinin slow-reakting substratını içerir (Şekil 5). Son zamanlarda araşidonat metabolizmasında yer alan bu enzimatik olayların otokatalitik lipit peroksidasyonuna öncülük etmesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır¹⁴⁷.



Şekil 5. Araşidonik asit metabolizması esnasında üretilen serbest radikaller

Şekil 5'dende anlaşılacağı gibi araşidonik asit metabolizması reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır¹⁴⁷. Araşidonik asitin biyoaktif ürünlere dönüşümü esnasında geniş spektrumlu oksijen, karbon ve hemoprotein radikalleri oluşur ve bunlar doku hasarına yol açarlar¹⁶⁷. Prostaglandin sentezi esnasında hidroksil radikali veya diğer radikallerin üretimi, siklooksijenazın (COX) feed-back regülasyonuna yol açar, prostaglandin biyosentezinin hız ve süresini modüle eder ve prostaglandin sentezinden sonra ikinci ulak ve sitotoksik etkilerini hızlandırır. COX, ksenobiyotikleri daha toksik türlere metabolize etme yeteneğine de sahiptir^{168,169}.

Trombositlerde tromboksan sentezinin imidazol ve nordihidroguaiaretik asit gibi radikal toplayıcılarla inhibe edilmesi, prostaglandin endoperoksitinin tromboksanlara dönüşümünün bir serbest radikal reaksiyonu sonucu olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir¹⁴⁷. Lipoksijenaz kaynaklı peroksitler oksidan-sensitif siklooksijenaz aktivitesini değiştirebilir¹⁶⁹. Bu sebeple, prostaglandin ve tromboksanların biyosentezi, biyosentetik enzimin kendisi ve diğer hücre komponentleri ile reaksiyon yeteneğine sahip hemoprotein-oksijen ve karbon merkezli serbest radikallerin oluşmasıyla sonlanır.

Yukarıdaki bilgilere dayanarak serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu kolayca söyleyebiliriz. Reaktif oksijen metabolitleri fosfolipaz aktivasyonu yolu ile prostaglandin E₂, F₂, 6-keto PGF_{1α} ve TXB₂ sentezini gerçekleştirirler. PGE₂ ve I₂ adenilat siklazı aktive ederek cAMP sentezini artırır ki, süperoksit de cAMP sentezini artırıcı etkiye sahiptir. Bu bilgiler reaktif oksijen türlerinin prostaglandin sentezi yolu ile cAMP konsantrasyonunu artırdıklarını doğrulamaktadır¹⁵⁹.

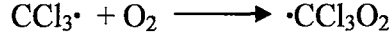
- Hayvan hücrelerinde süper oksitin bir başka kaynağı da askorbik asit, tioller (sistein gibi), adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bileşiklerin oto oksidasyonudur¹⁵⁹.

- Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon¹⁵⁹.

Hücrelerde serbest radikal üretimi bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu tip maddeler dört grupta toplanmıştır¹⁵⁹.

1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit¹⁷⁰ gazını buna örnek verebiliriz. NO₂· gazı radikalik bir madde olup aynı zaman da iyi bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.

2- Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela toksik bir madde olan karbontetraklorür (CCl₄) karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil (CCl₃•) serbest radikale dönüştürülür. Bu radikalın oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de güçlü bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



3- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquat'tır.

4- Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması sonucu oluşan ürün glutatyon ile reaksiyona girer ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

1.3.3. Serbest Radikallerin Etkileri

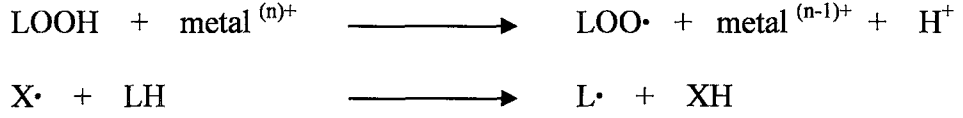
Serbest radikaller; hücre membran proteinlerinin yapılarını bozar, membran lipid ve proteinlerini tahrip ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engeller, nuklear membranı yararak nukleusta ki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirir, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlar ve enzimleri aktifleştirir veya inaktive eder¹⁶⁰. Ayrıca mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozup, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır.

Membran Lipitlerine Etkileri (Lipit peroksidasyonu) : Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenmesine karşın, bunlar arasında en hassas olanı lipitlerdir. Lipit peroksidasyonu bir serbest radikal kaynağıdır, oksijenle karşılaşan lipitlerin peroksidasyona uğraması (oto oksidasyonu) sadece besinlerin bozulmasından (acıma) sorumlu olmayıp aynı zamanda, kanser, yangısal hastalıklar, ateroskleroz,

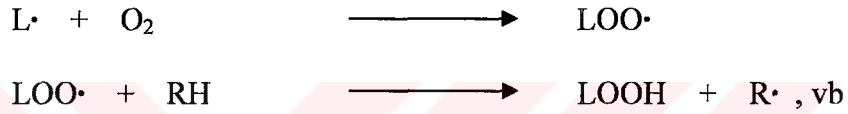
yaşlanma vb. gibi olaylara neden olabilen doku hasarından da sorumludur. Bu yıkıcı etkiler metilenle kesintiye uğramış çift bağlar içeren doymamış yağ asitlerinden, peroksit oluşması sırasında üretilen serbest radikaller ($ROO\cdot$, $RO\cdot$, $OH\cdot$) tarafından başlatılır. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış(çift) bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Bundan da membran permeabilitesi ve mikro vizkozitesi ciddi bir şekilde etkilenir. Polidoymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımı “lipit peroksidasyonu (LPO)” olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü LPO kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve bu oto katalitik reaksiyonu sonucu oluşan lipit peroksit, membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurken lipit, alkol ve aldehitler gibi istenmeyen yan ürünler oluşur^{147,171,172}. Bu ürünlerin ya hücre düzeyinde metabolize edilerek veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak birçok hastalığa ve doku hasarına neden olurlar¹⁷³. Bu ürünlerden en çok bilineni malondialdehittir (MDA)^{174,175}. Serbest radikaller tarafından zar lipitlerine direkt saldırı reversibl ve irreversibl kardiyak etkilerin oluşumuna yol açar. LPO sonucunda, bazıları serbest radikal aktivitesinin göstergeleri olarak kullanılan, birçok ürün oluşur. LPO'nun başlangıç aşamalarında dien konjugatlarının oluşumu ile bir moleküler düzenlenme oluşur. İnsanlarda en sık görülen linoleik asitin 9,11 izomeridir. Daha sonraki yayılma evresinde daha ileri LPO ve fragmentasyon(parçalanma) oluşur. Ortaya çıkan son ürünlerden biri yukarıda bahsedildiği gibi MDA'dır¹⁷⁶.

Olayın tamamı aşağıdaki şekilde özetlenebilir¹⁷² :

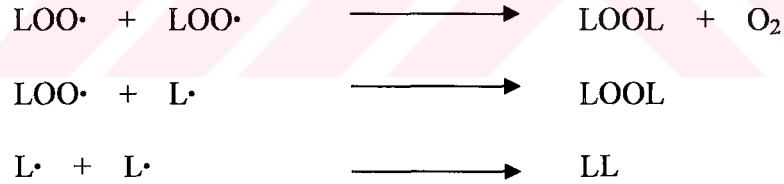
1. Başlama safhası



2. İlerleme safhası



3. Sonlanma safhası



Olayı başlatan moleküler öncüller genel olarak hidroperoksit ürün LOOH olduğundan LPO, potansiyel yıkıcı etkileri olan bir zincir tepkimesidir. Gerek insanlar ve gerek doğada LPO'yu denetlemek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılır. Propil gallat, butillenmiş hidroksianizol (BHA) ve butillenmiş hidroksitoluen (BHT) antioksidan olarak kullanılan gıda katkılarıdır. Doğada görülen antioksidanlar yağda çözünen β -karoten ile E vitaminini (tokoferol), ve suda çözünen C vitaminini kapsar^{159,172}.

Proteinlere Etkileri : Serbest radikallerin çift bağ ve sülfür içeren moleküllerle olan reaktivitesi sebebiyle, triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asit içeren proteinler bu serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Bu etkilenmenin sonucunda da sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur¹⁴⁷. Bu istenmeyen reaksiyonlar sonucu immünoglobulin G ve albümin gibi çok sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki normal metabolik aktivitelerini engeller.

Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri : İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonundan doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır^{146,159}. OH• radikalının hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde, radyasyonun sebep olduğu hücre ölümünden büyük oranda (% 80 oranında) sorumlu bir ajan olduğu düşünülmektedir¹⁴⁷. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ membranlardan kolayca geçtikten sonra hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilen açık bir hedeftir. Süperoksite maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiğinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir. Çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematosuz (SLE) ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikorları bulunur. Süperoksit ve hidrojen peroksite enzimatik toplayıcıları, (OH•) prekürsörlerinin konsantrasyonunu azaltarak DNA'yı korur¹⁵⁹.

Karbonhidratlara Etkileri : Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin oto oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzalaldehyitler meydana gelir. Bu maddeler diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıkların patolojik bulgularında da önemli rol oynarlar¹⁵⁹. Okzalaldehyitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etkiye sahiptirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında da önemli rol oynarlar¹⁵⁹.

1.3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

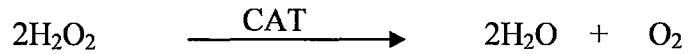
Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar, endojen ve ekzojen kaynaklı olabilmektedirler. Antioksidanlar aynı zamanda serbest radikal oluşumunu engelleyen ve mevcut radikalleri etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılırlar. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılan antioksidanlar hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunurlar.

1.3.4.1. Endojen (Doğal) Antioksidanlar

1.3.4.1.1. Primer Antioksidanlar (Enzimler)

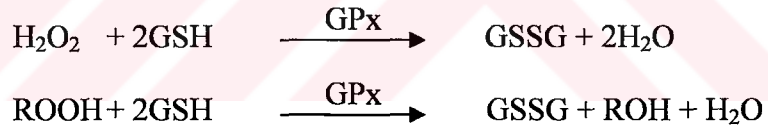
1.3.4.1.1.1. Katalaz (EC 1.11.1.6)

Doğada yaygın bir şekilde mevcut olup, ilk defa 1901 'de O. Leew tarafından bulunmuştur. Yine ilk defa 1937'de Summer ve Dounce tarafından karaciğerden kristal formda izole edilmiştir. Molekül kütlesi 240.000 Daltondur. Dört alt üniteden oluşmuştur. Peroksizomlarda, lizozomlarda ve mitokondride bulunur. Kandaki CAT aktivitesi büyük ölçüde eritrositlerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle insan eritrositleri CAT yönünden çok zengindir. GPx esas olarak mitokondri ve sitozolde bulunurken, CAT peroksizomlarda bulunur. Eritrositlerde mitokondri olmadığı halde yüksek aktivitede CAT ve GPx vardır. CAT, 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksidaz etkinliğine sahip olmasına ek olarak bir molekül H₂O₂'yi elektron verici substrat, diğer H₂O₂'yi ise elektron alıcı substrat olarak kullanabilir. Peroksizomal enzimler, mitokondriyal ve mikrozomal elektron taşıyıcı sistemler ve keza ksantin oksidazın H₂O₂ kaynağı olarak kabul edilmesi zorunludur¹⁷². Büyük moleküllu lipit hidroperoksidlere etki etmezken, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar¹⁵⁶.



1.3.4.1.1.2. Glutatyon Peroksidaz (EC 1.11.1.9)

GPx hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu, tetramerik 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Memeli eritrositlerinden ilk defa Mills ve arkadaşları tarafından karakterize edilmişlerdir. Daha sonra yapılan araştırmalarla enzim hakkındaki bilgiler artırılmıştır. Baskın olarak sitozolik bir enzimdir ve mitokondride düşük düzeylerde bulunur. GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin ve lipid peroksitlerin artmasına ve bu da hücre hasarına yol açar. GPx'in beyin düzeyleri düşüktür. Prostetik grup olarak selenyum (Se) içeren metalloenzimdir. Beyinde, beyin selenyumunun çok az bir kısmını içerdiğinden dolayı diyetle elde edilebilirliğinden çok fazla etkilenmez. GPx sitozolik hasara karşı etkin koruyucu bir mekanizma sağlar. Bu enzim, H₂O₂'i ve lipid peroksitlerini GSH'yi kullanarak redüksiyon yoluyla uzaklaştırır. GPx aşağıdaki reaksiyonları katalize eder¹⁴⁶.



Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz da (PLGPx) monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger^{146,159}. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman, PLGPx membranı peroksidasyona karşı korur.

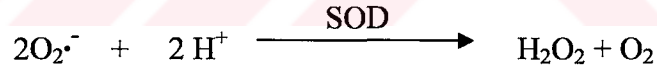
1.3.4.1.1.3. Süperoksit Dismutaz (EC 1.15.1.1)

Süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bu enzim, beyinde yaygın bir şekilde bulunur ve aktivitesi yaş artışıyla beraber artar. İnsanlarda iki tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu,Zn-SOD ile mitokondri de bulunan ve tetramerik Mn ihtiva eden Mn-SOD¹⁴⁶ izomerleridir. Mitokondriyal SOD hemen hemen total SOD' nin % 60 'ini içerir. Zira süperoksit sitozole göre mitokondride hemen hemen iki kat daha fazla oluşur. Tüm SOD'ler fizyolojik şartlarda^{146,147} birbirlerinin izomeridir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri (Fe-SOD) ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunur.

Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu, Zn-SOD dir. Cu, Zn-SOD ilk defa, 1969'da, Mc Cord ve Fridovic tarafından hayvan, bitki dokuları ve mayadan saflaştırılmış ve tanımlanmıştır. Molekül kütlesi 32.000 daltondur. İki alt ünitesi vardır ve bunların her birinde bir Cu ve bir Zn atomu bulunmaktadır. Ayrıca her alt birimde bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir de asetillenmiş terminal amino grubu bulunmaktadır. Cu,Zn-SOD enziminin ayrı formları bulunmaktadır. Mn-SOD mitokondrial bir enzimdir ve prokaryotların sitozolünden elde edilebilmektedir. İlk kez 1970 yılında Keele ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. Buradaki mangan, +3 değerliklidir ve iki alt birimden oluşmuştur. Her alt birimde bir Mn atomu vardır ve 23.000 dalton süperoksite karşı etkin bir koruma sağlarlar¹⁶¹. Her iki enzimin katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu lipid peroksidasyonunu inhibe ederek oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır^{146,147}. Normalde metabolizma sırasında hücreler tarafından fazlaca süperoksit üretilmesine rağmen bu enzim sayesinde intrasellüler düzeyleri düşük tutulur. SOD fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler

öldürülmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla oranda SOD bulunur.

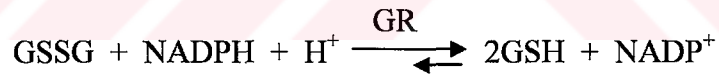
Fagositik hücrelerin solunum patlaması NADPH-Oksidazı kapsar ve bakterilerin öldürülmesine yardım eder, yani nötrofiller ve diğer fagositik hücreler bakterileri yuttuğunda oksijen tüketiminde ani bir artış görülür bu olay solunum patlaması olarak bilinir. Bu hızlı oksijen tüketimi olayı (15-20 saniyelik boş bir aradan sonra) $O_2 \cdot^-$, H_2O_2 , $OH\cdot$, $HOCl$ (hipoklorit iyonu) gibi tepki veren türevlerin büyük miktarda üretilmesi ile kendini gösterir. Bu ürünlerden bazıları güçlü mikrop öldürücü ajanlardır. Solunum patlamasından sorumlu elektron taşıma zincir sistemi bir flavoprotein, NADPH : O_2 - oksidoredüktaz (Çoğunlukla NADPH oksidaz olarak bilinir) ve bir *b*-tipi sitokrom içerir. Bu sistem oksijenin süperoksit anyona tek elektron ile indirgenmesini sağlar. Sistem nötrofiller ve diğer fagositik hücrelerin plazma zarına yerleşiktir. NADPH pentoz fosfat yolu üzerinden üretilir ve bu döngü etkinliği fagositoz sırasında belirgin şekilde artar.



Süperoksit iyonu hücre dışına veya yutulan bakteri ile karşılaşacağı fagolizomlar içine itilir. Bakterilerin fagolizomlar içinde öldürülmesi görüldüğü kadarıyla artmış pH süperoksit iyonu veya daha ileri oksijen türevlerinin (H_2O_2 , $OH\cdot$, $HOCl$) karma etkisine fagositik hücrelerde bulunan bazı bakterisidal peptidlere (defensinler) ve diğer proteinlerin etkisine bağlıdır. Fagositik hücrenin sitozolüne giren herhangi bir süperoksit yukarıda gösterilmiş olan kendiliğinden dismutasyonun aynı olan bir tepkimeyi kataliz eden SOD etkisiyle H_2O_2 'ye çevrilir. H_2O_2 daha sonra miyeloperoksidaz (MPx) tarafından kullanılır veya GPx veya CAT ile yok edilir¹⁷².

1.3.4.1.1.4. Glutasyon Redüktaz (EC 1.6.4.2)

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 FAD'ye transfer edilirler. Daha sonraki alt birimlerdeki 2 sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyonun 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 gerekir¹⁷⁷.



Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu ise , GR'nin GSSG'yi GSH'ye çevrimi için gereken NADPH'ı sağlar¹⁷².

1.3.4.1.1.5. Glutasyon S-Transferaz (EC 2.5.1.18)

GST'ler, sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere glutasyonu aktaran proteinlerdir. GST, bunun yanı sıra hem, bilirubin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve deksametazon gibi hidrofobik bileşiklere de yüksek bir afiniteyle bağlanabilmektedir. *E.coli*'den insana kadar çok çeşitli türlerden GST saflaştırılabilirken en çok da sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır. GST'ler en az 7 alt üiteden oluşan homodimer veya heterodimerlerdirler. Spesifik GST alt üitelerinin fenobarbitol, 3-metilşolantren, *trans*-stilben oksit gibi çeşitli ksenobiyotikler tarafından indüklenmesinden ve dokuya spesifik bir tarzda ekspresye olmasından beri, GST gen ailesi gen ekspresyonunun dokuya özel düzenlenmesi ve indüksiyonunun araştırılmasında yararlı bir model sistemi olmuştur¹⁷⁸.

GST'ler başta araşidonik ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere LPO'lara karşı Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi koruyucu mekanizma oluştururlar¹⁴⁶.

GST'ler antioksidan 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 glisinin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür¹⁴⁶.

Lökotrien C₄ ün sentezi GST tarafından katalizlenmekte olup, GST'ler prostaglandin sentezinde PG izomeraz etkisine de sahiptirler¹⁴⁶.

1.3.4.1.2. Sekonder Antioksidanlar (Enzim Olmayanlar)

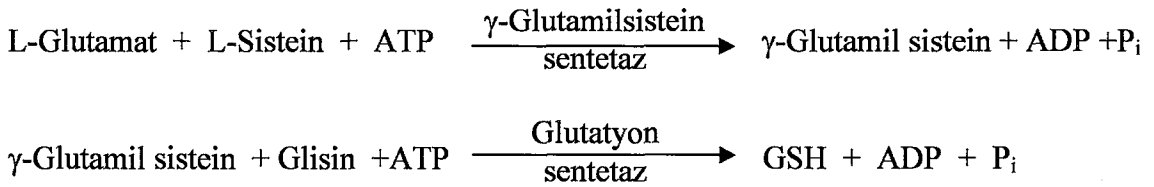
Lipit fazda bulunanlar antioksidanlar $\alpha(-)$ tokoferol (E - vitamini) ve β - karoten'dir. Sıvı fazda (hücre sitozolü veya kan plazmasında) bulunanlar ise askorbik asit, miyoglobulin, melatonin, hemoglobin, üre, ferritin, sistein, metionin, seruloplazmin, albümin, laktoferrin, bilirubin ve glutatyondur.

1.3.4.1.2.1. Glutasyon (GSH)

GSH, birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir: γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin (şekil 6). GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır¹⁷⁹.



Şekil 6. GSH'nin molekül yapısı



GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutasyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki sergiler ve H_2O_2 'yi

alyuvarlardan uzaklaştırır. H_2O_2 birikmesi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azaltabildiğinden bu tepkime çok önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ile süperoksit oluşurken diğer dokularda ise bu sitokrom P 450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşur^{172,179,180}.

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH'yi peptid bağından dolayı düşük enerjili bileşikler arasında kabul edebiliriz¹⁸¹. GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfid-sülfidril değişimi tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan hidrojen peroksidi uzaklaştıran enzim GPx'e substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'ye indirgenerek GSH miktarı düzenlenir¹⁸¹.

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. Örneğin GPx ve CAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden vitamin C, E ve B-karoten gibi diyetle alınan antioksidanlarla ilgilidir¹⁸².

Bir çok 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 antioksidandır. 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 bir çok enzimin aktivitesi düzenlenebilir¹⁸¹.

1.3.4.1.2.2. Diğer Sekonder Antioksidanlar

İnsan vücudunda oldukça az miktarlarda bulunmasına karşın vitaminlerin vücuttaki etkinlikleri oldukça fazladır. Bunların bir bölümü, besinlerle aldığımız karbonhidrat, yağ ve proteinden enerji ve hücrelerin oluşması ile ilgili biyokimyasal olayların düzenlenmesine yardımcı olurlar. A, E ve C vücut hücrelerinin hasarını önleyerek normal işlevlerini sürdürmeleri ve bazı zararlı maddelerin etkilerinin azaltılmasında (Antioksidan etki) yardımcı olurlar. Antioksidanlar, hücremizi, serbest radikalleri nötrleştirerek korurlar. Bunlar uyum içerisinde çalışan bir takım gibi radikalik saldırılara karşı koyarlar. β -Karotenin, askorbik asitin ve tokoferolün antioksidan etkileri yıllardan beri bilinmektedir. β -Karoten organizmada A vitaminin parsiyal oksijen öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidan olarak görev yapar. Bununla beraber, 15 torr'da 150 torr'dan daha iyi antioksidan 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. 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 olur¹⁸³.

1.3.4.2. Ekzojen Antioksidanlar

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 anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, cetiedil ve difenilin iyodonyum
4. *Recombinant süperoksit dismutaz*
5. *Troloks-c* : E vitamini analogu
6. *Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler*: Glutatyon 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*¹⁸⁴.

1.3.4.3. Gıda Antioksidanları

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
- Sodyum benzoat
- Etoksiguin
- Propilgalat
- Fe-süperoksit dismutaz¹⁸⁴.

1.3.5. Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler^{159,183,184}

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 devamlı 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 antioksidanlar hakkında mevcut bilgiler arttıkça bunlara olan ilgi de bilim adamları tarafından her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda hemen her sahada yapılan çalışmaların antioksidan özellikler ile birlikte değerlendirme çalışmaları da ön plana çıkmaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasallar

DeneYlerde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company (Germany)' den temin edilmiştir.

2.2. 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

Saf su cihazı : GFL 2012

Çalkalayıcılı su banyosu : Memmert

Homojenizatör : Ika-Werke

Döner Buharlaştırıcı (Evaporatör) : BSI

Kompresör : Milipore

UV Lambası 254nm - 366nm : Model Mineralight.

2.3. DeneYlerde Kullanılan ÇözeltiYer ve Hazırlanışları

1. *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 7.8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

2. *CAT Ölçüm Karışımı (40 mM pH 7'de H_2O_2 içeren 50 mM Fosfat Tamponu):*

1020 μl H_2O_2 ve 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözüldü ve pH 7'ye ayarlandıktan sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

3. *GPx Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, 30 mM KCl içeren Fosfat Tamponu):*

0,6804 g KH_2PO_4 ve 0.2236 g KCl alınarak 1-2 damla 5 M NaOH ile 90 ml saf suda çözüldü ve pH 7.8'ye ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4. *GPx Ölçüm Karışımı :*

A - 50 mM Fosfat tamponu : 0.6804 g KH_2PO_4 alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

B - 1 mM EDTA : 0.0029 g EDTA alındı ve hacmi 10 ml'ye tamamlandı.
(1 damla 5 M NaOH ile çözünür)

C – 1 mM GSH : 0.0031 g GSH alınarak 10 ml saf suda çözüldü.

D – 0.2 mM B-NADPH : 0.0016 g alınarak 10 ml saf suda çözüldü.

E – 1 mM NaN_3 : 0.0065 g tartıldı ve 100 ml saf suda çözüldü.

F – 1 EU/ml Glutatyon Redüktaz : 5,2 μl Glutatyon Redüktaz alınır 10 ml saf suda çözüldü.

5. *GPx enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.25 mM H_2O_2):*

25,53 μl H_2O_2 alınarak ve hacmi 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

6. *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 ve pH 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

7. *SOD Ölçüm Karışımı:*

A - 0.3 mM Ksantine : 0.0018 g Ksantine alınarak hacmi distile su ile 40 ml'ye tamamlandı.

B - 0.6 mM EDTA : 0.0035 g EDTA alındı ve hacmi distile su 20 ml'ye tamamlandı.(2 damla 5 M NaOH ile çözünür)

C – 150 μM NBT (Nitro blue tetrazolium) : 0.0024 g NBT alınarak 20 ml distile suda çözüldü.

D – 0.4 M Na_2CO_3 : 0.5088 g alınarak 12 ml distile suda çözüldü.

E – 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine) : 0.0061 g tartıldı ve 6 ml distile suda çözüldü.

8. *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.

9. *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 ve 3 ml distile suda çözüldü. (bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı ve soğuk olarak kullanıldı).

10. *SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.8 mM CuCl_2):*

0.0108 g CuCl_2 alındı ve 100 ml distile suda çözüldü.

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

1.514 g Tris-HCl alınarak 200 ml saf suda çözüldü ve pH 7.4 'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

12. *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 ve pH 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

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

0,03963 g DTNB alındı ve 10 ml'ye metanol ile tamamlandı.

14. *LPO Homojenatı Tamponu (% 10 KCl):*

10 g KCl alınarak 100 ml saf suda çözüldü.

15. *LPO Ölçüm karışımı:*

A - % 8 Sodyum lauril sülfat (SLS) : 0,8 gr SLS alınıp distile su ile 10 ml'de çözüldü.

B - % 0,08 Tiyobabütirik (TBA) : 0,48 gr TBA alınarak 1-2 damla 1 M NaOH ilavesi ile hacmi 60 ml'ye tamamlandı.

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

2.4. Deney Bitkileri

Bu araştırmada çalışma materyali olarak bölgemizde yeterli düzeyde elde edebileceğimiz bir liken türü olan *Usnea longissima Ach.* tercih edildi. Liken örnekleri, Gümüşhane ili, Torul ilçesi, Serenay yaylasından 40° 35' 50" enlem, 39° 24' 45" boylamda 14 Temmuz 2003 tarihinde Dr. Ali ASLAN tarafından toplandı ve uluslar arası teşhis yöntemleri kullanılarak tür teşhisi yapıldı¹⁸⁵. Türün herbaryum örneği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Herbaryumu'nda depolanmıştır.

2.5. *Usnea longissima* Ach.'dan Difraktaik Asit'in İzolasyonu

Liken örnekleri toplandıktan sonra yabancı maddelerden temizlendi ve oda sıcaklığında, gölgede kurutuldu. Kuru örnekler bir havanda sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. 250 g öğütülmüş liken örneği çalkalayıcılı bir su banyosunda iki gün süreyle geri soğutucu altında dietileter ile ekstrakte edildi (37 °C, 200 ml x 5). Dietileter evaporatörde uzaklaştırıldı ve 18.75 gram ham ekstre (% verim: 7,5) elde edildi. Ham ekstre ince tabaka kromatografisinde değişik çözücü sistemleri ile kontrol edildi ve ekstrenin major iki bileşik ihtiva ettiği belirlendi. Bu iki major bileşiği saflaştırmak için silika jel kolon kromatografisi yapıldı.

2.5.1. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi için silika jel G-60 (70-230 mesh, 0.063-0.3 mm) kullanıldı.

Kullanılan silika jel miktarı : 210 gr

Kullanılan kolon ebatları : 3 x 80 cm

Kullanılan elüent : CHCl_3 : *n*-Hekzan (80:20 ve 90:10)

Elüent hacmi : 30 ml

Silika jel kolona 18.75 gr ekstre kuru tatbik ile yüklendi. Alınan her fraksiyon preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi ile (Merck silika jel G-60 F₂₅₄, 2 mm) kontrol edildi. İnce tabaka kromatografisinde (İTK) CHCl_3 : *n*-hekzan (90:10, 75:25, 70:30) ve CHCl_3 : MeOH (90:10) yürütücü faz olarak kullanıldı. İTK'daki lekeler UV-254 nm'de görüntülendi. Bu işlemlerin sonucunda 11.25 gr usnik asit ve 3.75 gr difraktaik asit saflaştırıldı. Difraktaik asitin R_f değeri CHCl_3 : metanol çözücü

sisteminde 0.72 olarak tespit edildi. Safılaştırılan difraktaik asitin erime noktası 189-190° olarak belirlendi. Molekül yapısı UV, IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, APT-NMR ve DEPT-NMR spektroskopik yöntemleri ile aydınlatıldı. Aynı zamanda difraktaik asit gaz kromatografisinde de yürütülerek saflığından iyice emin olundu. Böylece, bileşiğin molekül yapısı daha önceki literatür bilgileri ile de doğrularında^{78,79}.

2.6. Deney Hayvanları

Tez çalışmamız için 180-220 g ağırlıktaki toplam 54 adet Wistar erkek rat kullanılmıştır. Deney hayvanları (Şekil 7), Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarından temin edildi ve deneyler Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.B.D. nezdinde yapıldı. Hayvanlar deneye alınmadan önce gruplara ayrılmış ve standart şartlar altında muhafaza edilmiştir.



Şekil 7. Araştırmada kullanılan Wistar ratları gösteren fotoğraf.

2.7. Ratlarda İndometazin-Ülserinin Oluşturulması ve DA'nın Verilmesi

İndometazin ile uyarılan gastrik hasarlı (ülserli) doku üzerine *Usnea longissima*'dan saflaştırılan difraktaik asit'in antiülserojen etkilerini araştırmak üzere yapılan bu çalışma, Guidobono ve arkadaşları¹⁴⁰'nin yöntemi esas alınarak gerçekleştirildi. 6 adet rattan oluşturulan deney grupları bir gün süreyle aç bırakıldıktan sonra; her bir grupta bulunan ratlara sırasıyla 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda DA içeren, % 1'lik CMC (Karboksi metil selüloz) içinde süspansiyon haline getirilerek oral uygulandı. Diğer yandan pozitif kontrol grubuna da saf su içerisinde çözülen ranitidin (50 mg/kg) oral verildi. DA'nın mideler üzerine doğrudan etkisi olup olmadığını öğrenmek amacı ile de DA'nın 100 mg/kg dozda indometazin verilmeksizin direkt olarak ratlara verildi. Negatif kontrol grupları olarak kullanmak üzere bir gruba sadece % 1'lik CMC verildi. Bir gruba ise sadece musluk suyu (kontrol grubu) verilmek suretiyle deneyler gerçekleştirildi.

DA, RAN, CMC ve musluk suyu yukarıda belirtilen doz ve miktarlarda oral olarak verildikten 5 dakika sonra da indometazin 25 mg/kg (Doğrudan etkisi olup olmadığını öğrenmek amacı ile verilen DA 100 mg/kg ve pozitif kontrol grubu hariç) yine aynı şekilde oral yola verildi. Uygulamalardan 6 saat sonra yüksek dozda anestezi madde (thiopental sodium, 50 mg/kg) kullanılarak hayvanlar sakrifiye edildi ve ratların mideleri çıkarıldı. Mideler büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandı ve makroskopik olarak mide incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı. DA'nın antiülserojen etkileri, makroskopik ve biyokimyasal analizlere dayandırılmak suretiyle belirlendi. DA, İND, RAN ve CMC gruplarından elde edilen sonuçlar ve kontrol grubu ile mukayese edildi.

2. 7. 1. Mide Dokusunun Makroskopik İncelenmesi

Gastrik lezyonların belirlenmesi için makroskopik değerlendirmeye alınan rat mideleri, büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra ülser sayısı ve alanları belirlendi. Alan genişlikleri ise mili metrik kağıt kullanılarak bir büyüteç yardımıyla tespit edildi.

2. 7. 2. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi

Rat mideleri makroskopik olarak incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı. Dokuların enzim aktivitelerini ölçmek için üç gün içerisinde mide dokusu homojenatları hazırlandı. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda CAT, GPx, SOD enzim aktiviteleri ve GSH ile LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2. 7. 2. 1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Mide dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildikten sonra mide dokularından 0.5 g tartılarak üzerine 4.5 ml tampon çözeltiler (her parametre için farklı bir tampon sistemi kullanılarak) ilave edildi ve sonra da bir ultra-turraks homojenizatörde 10 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar bir süzgeç kağıdından süzüldükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4 °C'de santrifüj edildi ve üstte kalan berrak kısım da (süpernatant) enzim aktiviteleri tayin edildi^{21,186}.

2.7.2.2. CAT Aktivitesinin Ölçümü

Ölçüm Prensipleri : Aktivite ölçüm ortamındaki H_2O_2 'nin CAT vasıtasıyla H_2O 'ya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Harcanan H_2O_2 miktarından CAT aktivitesi aşağıda bahsedilen yöntemle göre hesaplanmıştır.

CAT Ölçümü : CAT aktivitesi, Aebi (1984) 'nin belirttiği metoda göre ölçüldü¹⁸⁷. 0.5 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7.8) ilave edilerek homojenize edildi²¹. Homojenatlar, 18000 g'de 60 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar CAT aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H_2O_2 çözeltisinden 1,5 ml konularak numune çözeltisinden 1,5 ml ilave edilir edilmez kronometre çalıştırıldı. Alt üst etme sonrası spektrofotometrede 240 nm dalga boyundaki absorbans azalması, 15 saniye aralıklarla 3 dakika süreyle, köre karşı kaydedildi.

CAT Aktivitesi'nin Hesaplanması : Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{H_2O_2}$), 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) hesaplandı¹⁸⁷. 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 $mmol.dakika^{-1}.mg doku^{-1}$ olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekerrür halinde yapıldı.

2.7.2.3. GPx Aktivitesinin Ölçümü

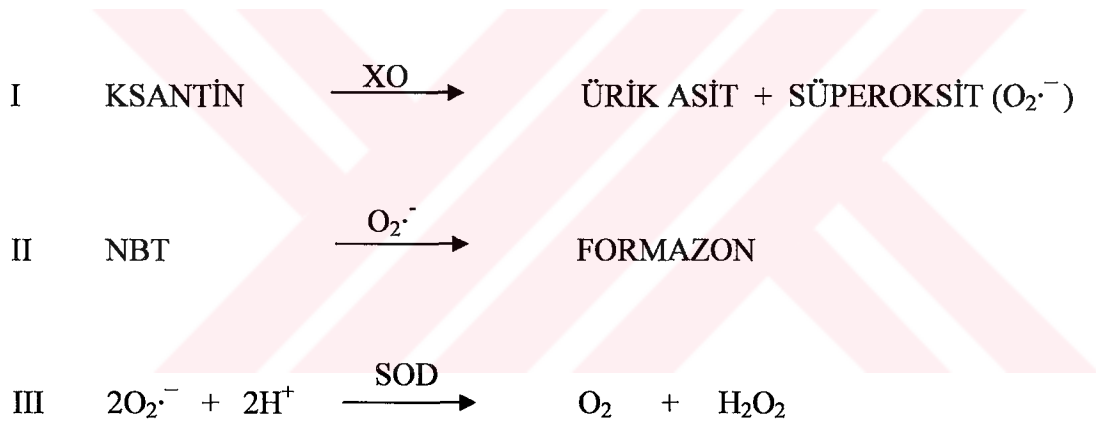
Ölçüm Prensipleri : Aktivite ölçümü GPx ve GR arasındaki dönüşümlü tepkimelere dayandırılmıştır. GPx ortamdaki GSH ve H₂O₂'yi H₂O'ya dönüştürerek GSSG sentezler. GR ise oluşan GSSG'yi pentoz fosfat yolundan gelen NADPH'ı kullanarak tekrar GSH'ye dönüştürür. Bu esnada harcanan NADPH miktarı 340 nm'de belirlenebilir. Absorbans azalması ile GPx aktivitesi arasında doğrudan bağlantı kurulması esasına dayanarak ölçüm yapıldı.

GPx Ölçümü : GPx aktivitesi, Lawrence (1976) 'nin belirttiği metot kullanılarak ölçüldü¹⁸⁸. 0.5 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (30 mM KCl içerir ve pH 7.8) ilave edilerek homojenize edildi²¹. Homojenatlar, 18000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar GPx aktivitesi ölçülümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2400 µl ölçüm karışımı (son konsantrasyonlar 50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 0.2 mM B-NADPH, 1 mM NaN₃ ve 1 EU/ml GR olacak şekilde) ve 300 µl süpernatant konularak birkaç dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra 300 µl 0.25 mM H₂O₂ konularak konulmaz kronometre çalıştırıldı. Alt üst etme sonrası spektrofotometre de 340 nm dalga boyundaki absorbans azalması, 15 saniye aralıklarla 5 dakika süreyle, köre karşı kaydedildi.

GPx Aktivitesi'nin Hesaplanması : Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı (ϵ_{NADPH}), 6.22 (mmol⁻¹ x mm⁻¹) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 340 nm'de, dakikada 1 µmol NADPH'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (EÜ) hesaplandı¹⁸⁸. GPx aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol.dakika}^{-1}.\text{mg doku}^{-1}$ olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekerrür halinde yapıldı.

2.7.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Ölçüm Prensipleri : Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri, şayet ortamda NBT (nitro blue tetrazolium) 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 H_2O_2 '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 ölçüldü¹⁸⁹. Mide dokuları homojenize edildikten sonra 18000 g'de 1 saat santrifüj edildi²¹. Cam bir spektrofotometre küvetine 2450 μ l ölçüm karışımı (0.3 mM Xanthine, 0.6 mM EDTA, 150 μ M NBT, 0.4 M Na_2CO_3 , 1.2 g / L BSA), 500 μ l supernatant, 50 μ l ksantin oksidaz eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkubasyon bırakıldı ve 1000 μ l $CuCl_2$ ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

SOD Aktivitesi'nin Hesaplanması: Oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik quartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EU) elde edildi ve SOD aktivitesi, *mmol.dakika⁻¹.mg doku⁻¹* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekerrür yapılarak verildi.

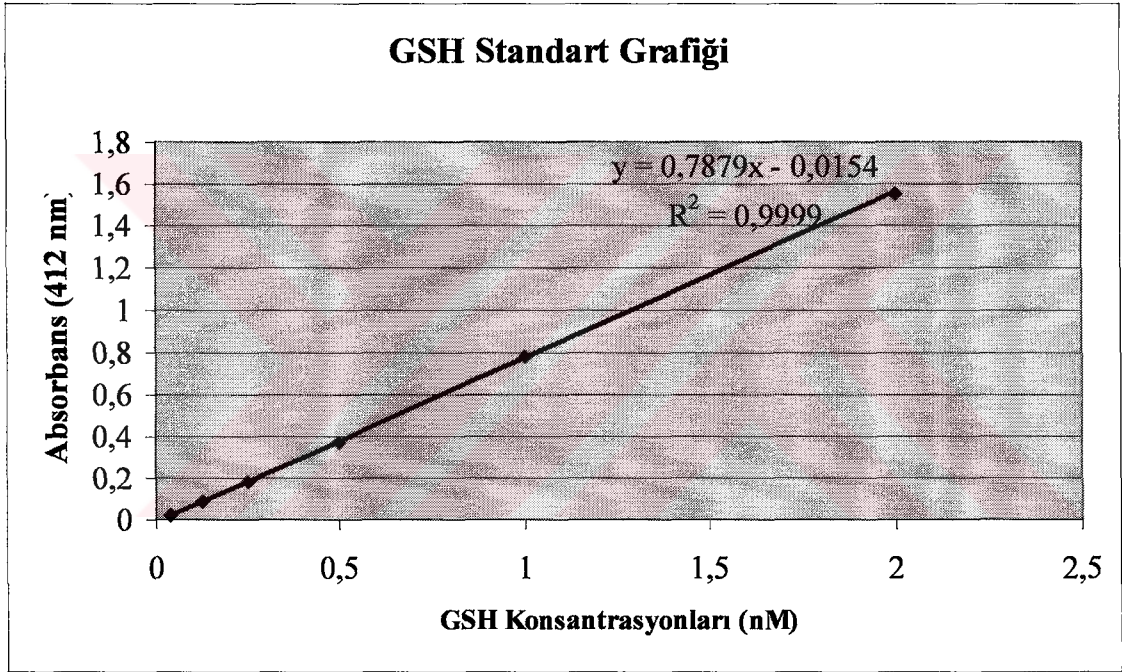
$$EU/mg.doku = 100 - \left(1 - \frac{\Delta A_{Kör} - \Delta A_{numune}}{\Delta A_{Kör}} \right) \times 100$$

2.7.2.5. Total GSH Miktarı Ölçümü

Ölçüm Prensipleri : 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 spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

GSH miktarının ölçülmesi : Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi¹⁹⁰. 0.5 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ilave edilerek homojenize edildi²¹. Homojenatlar, 12000 g'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 quartz 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 tekerrür yapılarak verildi.



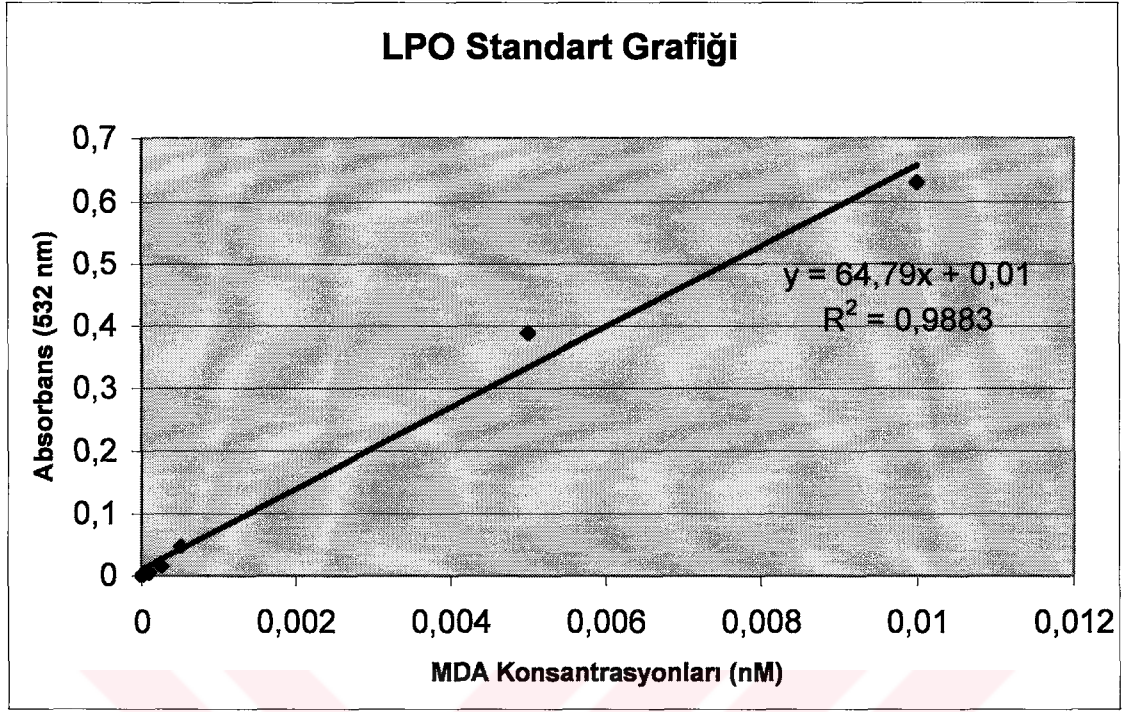
Şekil 8. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

2.7.2.6. LPO Miktarı Ölçümü

Ölçüm Prensipleri : Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA)^{174,175} 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 tiyobarbitürik (TBA) asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı¹⁹¹.

LPO Ölçümü : Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi¹⁹¹. 0.5 g doku üzerine 4.5 ml % 10 KCl ilave edilerek homojenize edildi²¹. Homojenatlar, 5000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl % 8 sodium lauryl sulphate (SLS), 750 µl % 20 asetik asit, 750 µl % 0.08 TBA ve 150 µl saf su pipetlelenerek 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 9). Numunelerin LPO miktarları, *nmol MDA/g doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekerrür yapılarak verildi.



Şekil 9. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

2.7.3. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 12.0 software 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 Scheffe's multiple comparison testi uygulandı.

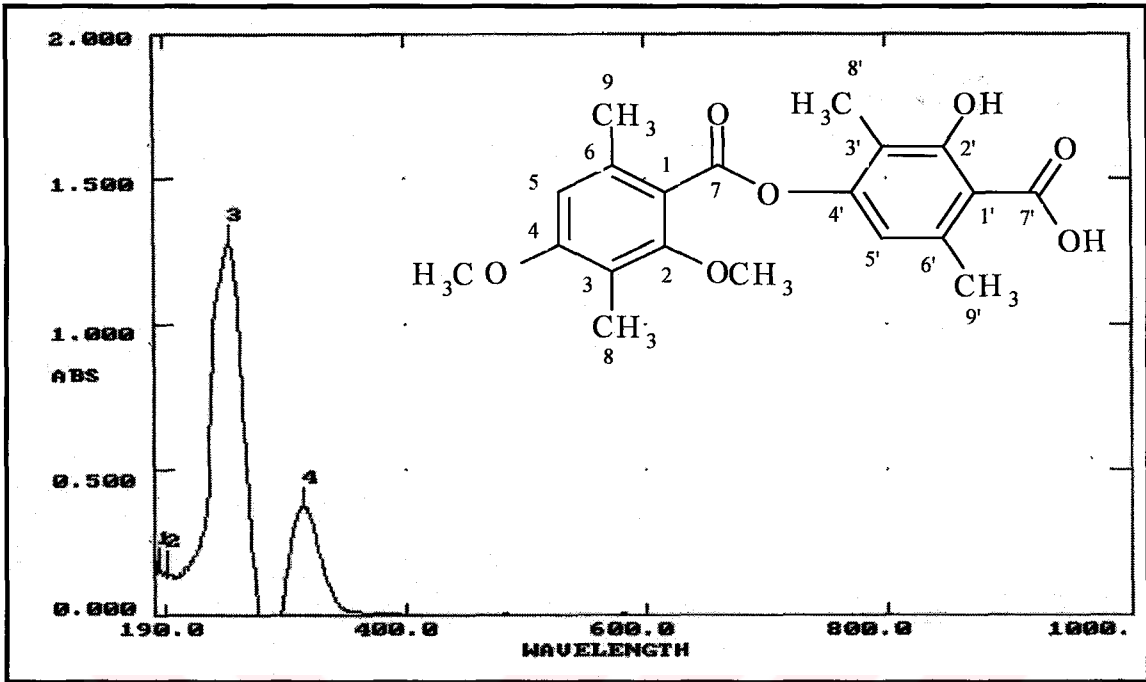
3. BULGULAR

Yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz veriler, bu bölümde tablo ve şekiller ile gösterilmiş, kontrole göre mukayeseler ‘% kontrol’ olarak ifade edilmiştir. Deneylede pozitif kontrol olarak ranitidin, negatif kontrol olarak indometazin kullanılmıştır. DA, hem yalnız hem de muamelelerinde süspansiyon haline getirici olarak kullanılan CMC ile birlikte olmak üzere ayrı birer grup şeklinde ölçüme alınmıştır. Her deneye ait veriler ait tablo halinde ve değişik muamele grupları arasındaki farkın daha iyi görülmesi amacıyla da tablonun hemen altında diyagramlar halinde sunulmuştur.

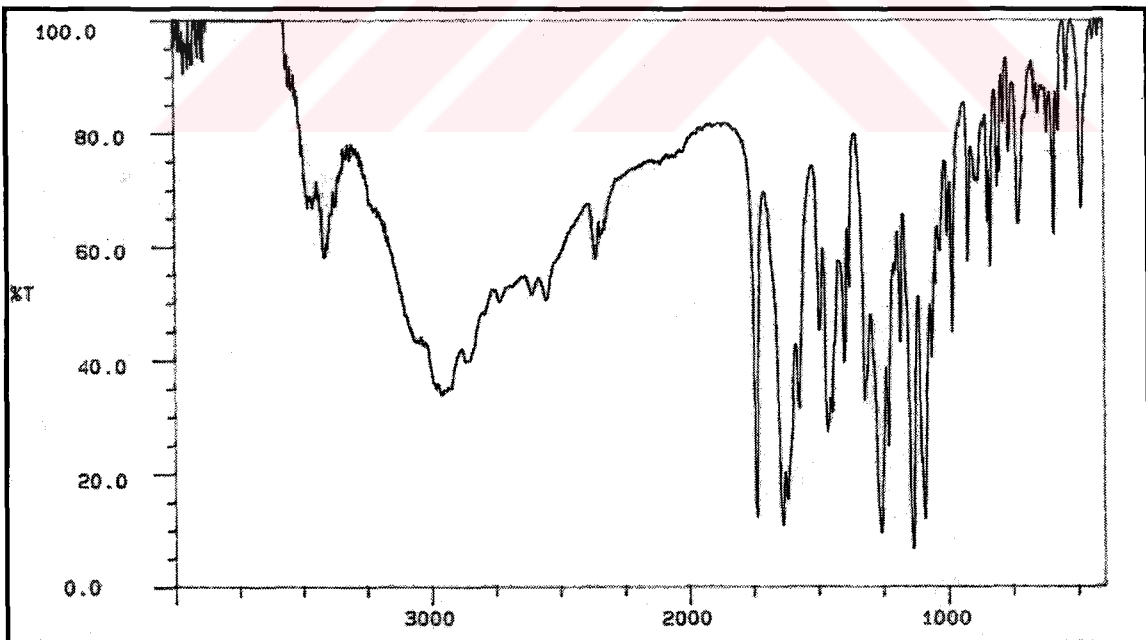
Bulgular kısmında tablo halinde sunulan veriler, 3 tekerrür olarak yapılan deney sonuçlarının ortalaması \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur.

3.1. DA'nın Spektral Verilerle Yapısının Aydınlatılması

DA, *Usnea longissima*'nın dietileter ekstresinden kromatografik yöntemlerle beyaz renkli, toz halinde izole edildi. İzole edilen DA, ince tabakada yürütüldü ve görünür ışıkta renksiz, UV₂₅₄ nm de ise mor renkli olduğu tespit edildi. Bileşiğin CHCl₃ çözeltisi UV-Visible spektrofotometrede geniş bir aralıkta (200-1000 nm) tarandı ve aromatik bileşiklerin spektrumuna uygun olarak 253 ve 315 nm de maksimum absorbanlar verdiği belirlendi. DA'nın UV-Visible spektrumu Şekil 10'da verilmiştir.



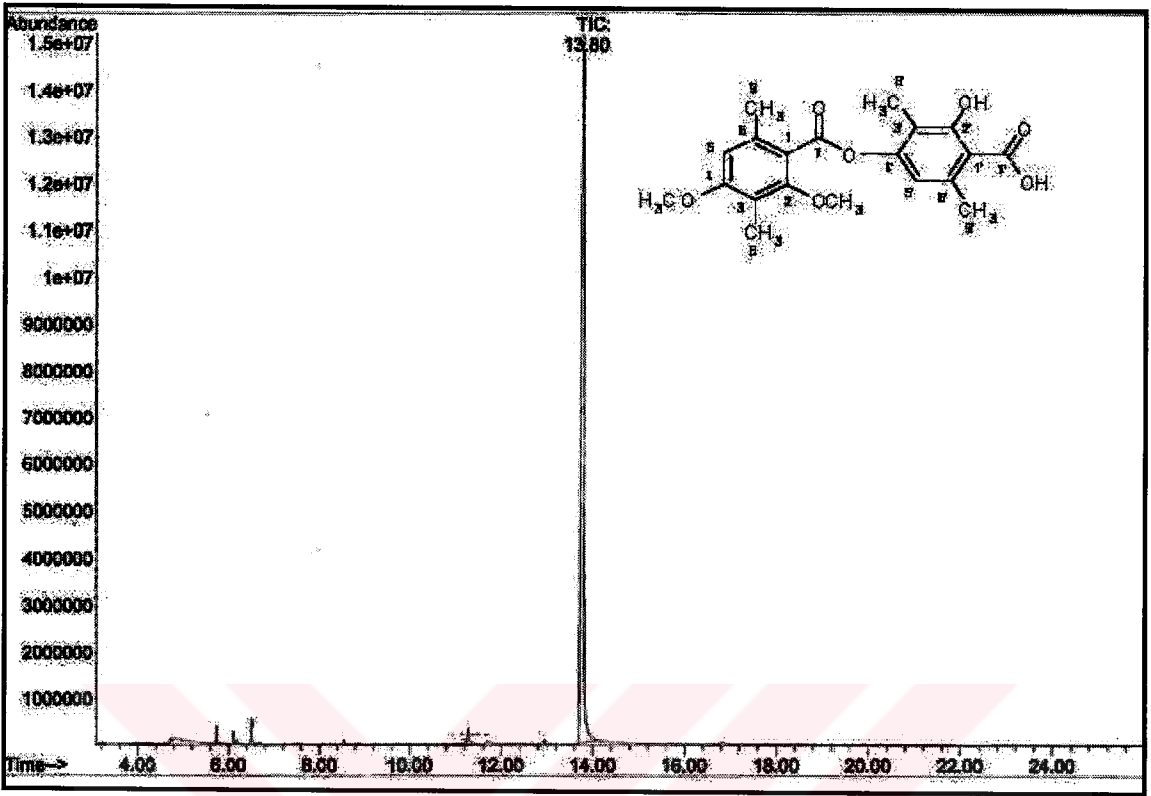
Şekil 10. DA'nın UV spektrumu (CHCl_3)



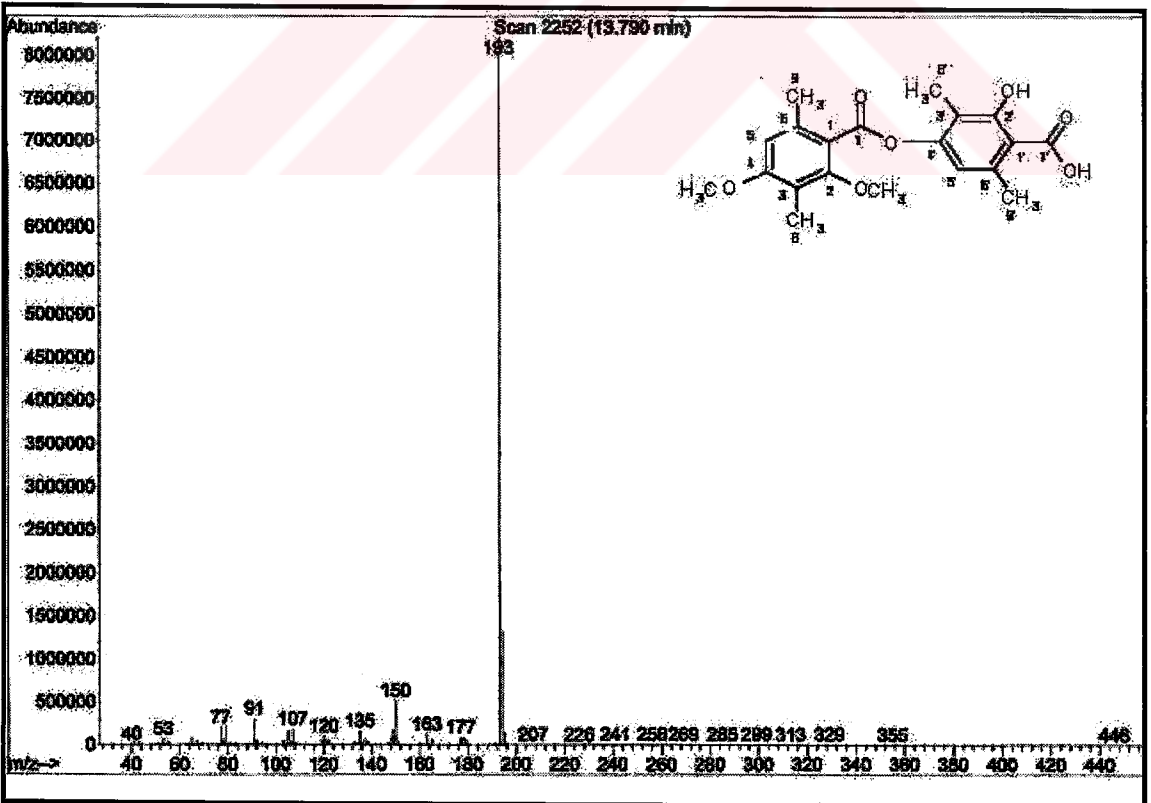
Şekil 11. DA'nın IR spektrumu

Bileşğin IR spektrumunda (Şekil 11) 1753, 1651 ve 1625 cm^{-1} 'de gözlenen şiddetli absorban bantları C=O grupları için karakteristiktir¹⁹². 1472-1395 cm^{-1} arasında gözlenen absorban bantları ise aromatik C=C bağ titreşiminden kaynaklanmaktadır. 3439 ve 3438 cm^{-1} de gözlenen absorban bantları karboksilli asitlerin –OH titreşim bantları, 2850-3004 cm^{-1} arasında gözlenen bantlar ise alifatik C-H gerilme bantları için karakteristiktir. İzole edilen DA, gaz kromatografisine (GC) tatbik edildiğinde saf olduğu gözlemlendi. Difraktaik asitin GC spektrumu Şekil 12'de verilmiştir. DA'nın EI-kütle (MS) spektrumunda (Şekil 13) bileşğin moleküler iyon piki (M^+) gözlenememiştir. Bu molekülün kolayca parçalanması ile izah edilebilir. Molekülün ester yapısında olması da bunu doğrulamaktadır. Kütle spektrumunda gözlenen parçalanma iyonları bileşğin molekül yapısı ile de oldukça uyumludur. DA, α -parçalanması ile karakteristik olarak $m/z:193$ (%100) ($C_{11}H_{12}O_3^+$) ve $m/z:165$ (% 1.8) ($C_9H_9O_3^+$) parçalanma iyonları vermiştir. Bileşğin diğer parçalanma iyonlarına ait m/z iyon pikleri şekil altında ayrıca sunulmuştur.

DA'nın yapısının tam olarak aydınlatılması NMR spektroskopik yöntemleri ile yapılabilmektedir. Bileşğin $^1\text{H-NMR}$, spektrumu incelediğinde $\delta=2-3$ ppm arasında gözlenen 4 singlet aromatik halkaya bağlı $-\text{CH}_3$ gruplarını işaret etmektedir (Şekil 14). Bu sinyallerin integrasyonu toplam 12 hidrojene tekabül etmektedir. Bu bilgiler bize molekülün yapısında aromatik halkaya bağlı 4 adet $-\text{CH}_3$ grubu olduğunu göstermektedir (şekil 15). $\delta=3.9$ ppm civarında gözlenen kuvvetli singletler ise aromatik halkaya bağlı metoksil hidrojenlerine ($-\text{OCH}_3$) aittir. Bu hidrojenlerin oksijenin indüktif etkisinden dolayı aşağı alanda rezonans ($\delta=3-4$ ppm arasında) olmaları karakteristiktir. Olefinik bölgede gözlenen 2 singlet ise ($\delta=6.60$ ve 6.63 ppm) aromatik halkaya bağlı hidrojenlere aittir.



Şekil 12. DA'nın gaz kromatografisi (GC) spektrumu



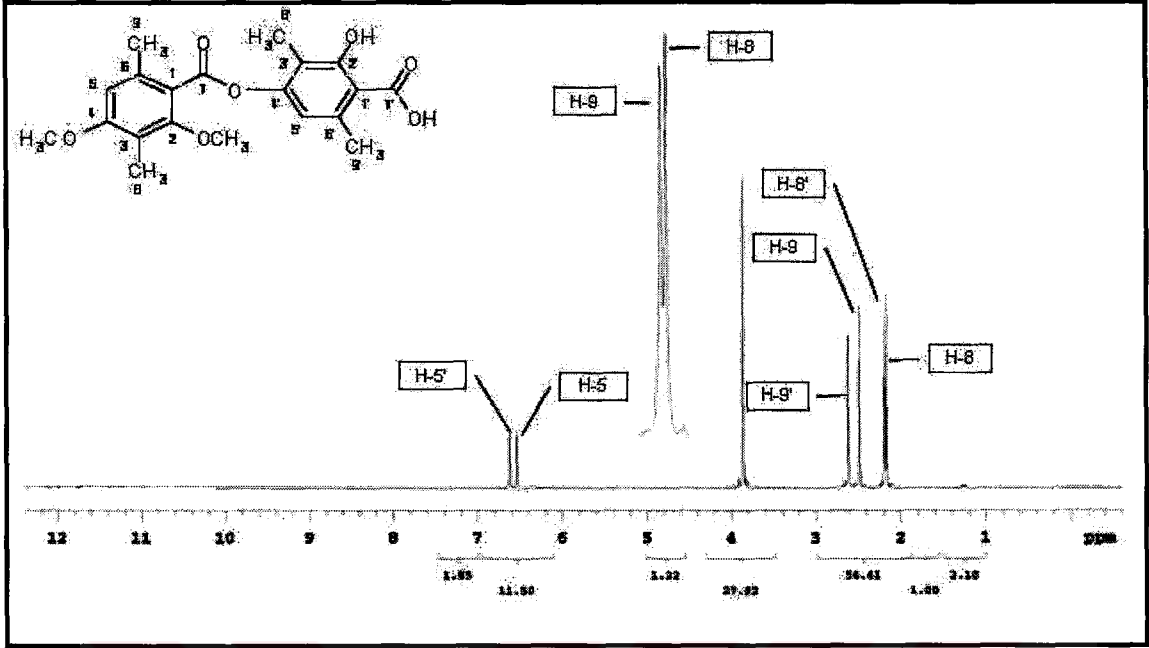
Şekil 13. Difraktaik asitin EI-kütle (MS) spektrumu. m/z : 193 (%100) $C_{11}H_{13}O_3$, 177 (%0.9) $C_{10}H_{10}O_3$, 163 (%1.8) $C_{10}H_{10}O_2$, 150 (%6.3) $C_{10}H_{13}O_2$, 135 (%1.8) $C_9H_{10}O$, 120 (%0.9) C_9H_{10} , 107 (%2.2) C_8H_{10} , 91 (%3.5) C_7H_8 , 77 (2.6) C_6H_6 .

DA'nın ^{13}C -NMR spektrumunda toplam 20 sinyal tespit edilmiştir (Şekil 16). Bu sinyallerin 6 tanesi alifatik bölgede (0-70 ppm) 14 tanesi ise olefinik bölgede (100-180 ppm) rezonans olmuştur. Olefinik bölgede 12 adet karbon sinyalinin gözlenmesi molekülde iki adet aromatik benzen halkasının varlığına işaret etmektedir^{78,79}. Olefinik bölgede gözlenen diğer iki karbon sinyali ise asit ve ester grubunun karbonil (C=O) karbonlarına aittir. $\delta=9.12, 9.36, 20.45, 24.39$ ppm'de rezonans olan 4 adet ^{13}C sinyali aromatik halkaya bağlı metil karbonlarına aittir. Aromatik halkaya bağlı metoksil (OCH_3) karbonları ise oksijen atomunun indüktif etkisinden dolayı beklenildiği gibi alifatik bölgede, $\delta=55.94$ ve $\delta=62.35$ ppm de rezonans olmuştur.

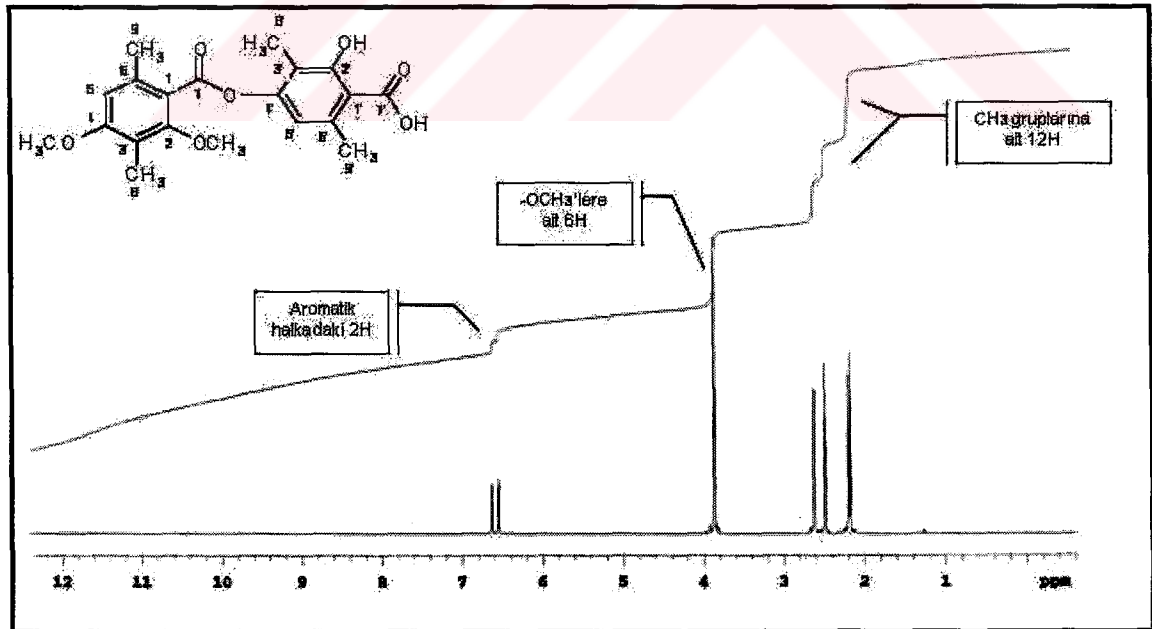
DA için önerilen molekül yapısı APT ^{13}C -NMR spektrumu(Şekil 17) ve DEPT ^{13}C -NMR (Şekil 18) spektrum verileri ile de uyumludur. APT ^{13}C -NMR spektrumunda metil ($-\text{CH}_3$) ve tersiyer ($-\text{CH}$) karbonları negatif sinyal, metilen ($-\text{CH}_2$) ve kuarterner karbonlar ise pozitif sinyal verir. Molekülün APT ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde molekül yapısı ile uyumlu olarak 8 negatif sinyal, 12 adette pozitif sinyal gözlenmiştir. APT ^{13}C -NMR spektrumunda $\delta=108.39$ ve $\delta=116.99$ ppm de gözlenen 2 negatif sinyal ise aromatik halkadaki tersiyer karbonlara ($-\text{CH}$) aittir. Bu 2 negatif sinyal bize aromatik halkada sadece iki karbonun dallanmış grup taşımadığını göstermektedir. DA'nın DEPT ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde ise yapı ile uyumlu olarak toplam 8 adet hidrojen taşıyan karbon sinyali gözlenmiştir. Bu 8 sinyalin 2 adeti tersiyer ($-\text{CH}$) karbonlara (C-5 ve C-5') ve 6 adeti ise metil ($-\text{CH}_3$) karbonlarına (C-8, C-8', C-9, C-9' ve 2 X OCH_3) aittir. DA'nın metilen karbonu ($-\text{CH}_2$) içermediği de DEPT ^{13}C -NMR spektrumunda kolayca görünmektedir. DA'nın spektral verileri daha önce literatürde yayınlanmış verilerle de doğrulanmıştır.^{78,79} Difraktaik asitin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR ve APT ^{13}C -NMR verileri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. DA'nın $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve APT $^{13}\text{C-NMR}$ verileri

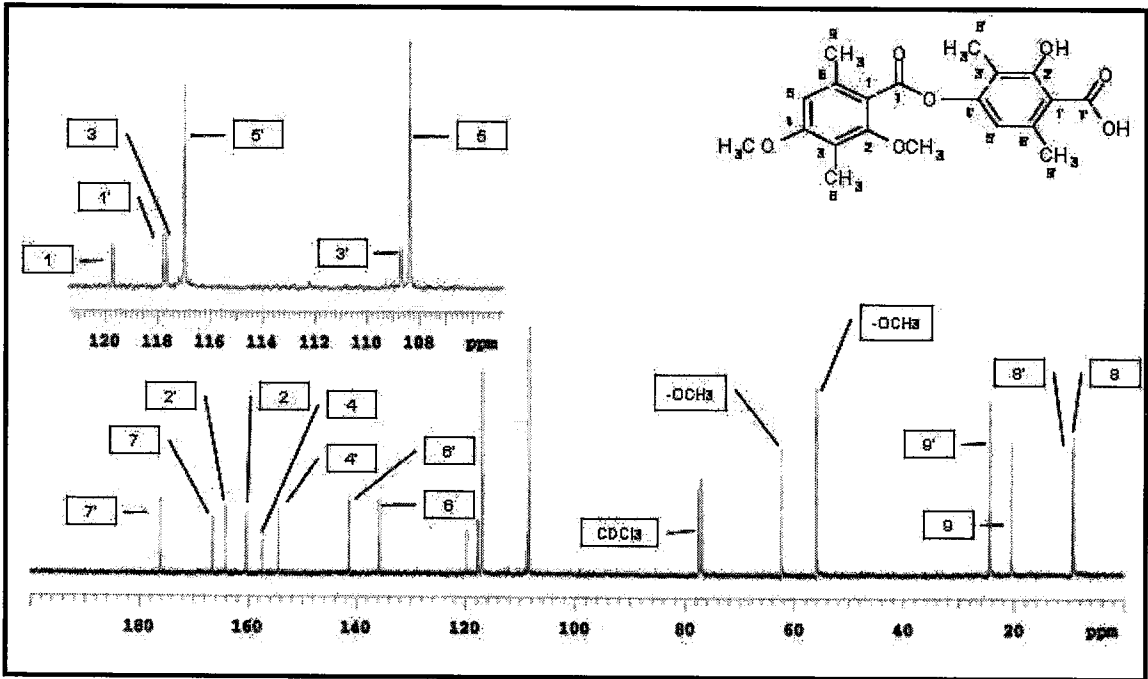
C/H	$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm)	APT $^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm)	$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm)
1	119.73	+ 119.73	-
2	160.32	+ 160.32	-
3	117.68	+ 117.68	-
4	157.44	+ 157.45	-
5	108.38	- 108.39	6.63 (1H, s)
6	135.76	+ 135.76	-
7	166.56	+ 166.55	-
8	9.12	- 9.12	2.17 (3H, s)
9	20.45	- 20.45	2.48 (3H, s)
OCH ₃	62.35	- 62.35	3.87 (3H, s)
OCH ₃	55.94	- 55.95	3.86 (3H, s)
1'	117.81	+ 117.81	-
2'	164.07	+ 164.07	-
3'	108.71	+ 108.71	-
4'	154.41	+ 154.41	-
5'	116.99	- 116.99	6.63 (1H, s)
6'	141.39	+ 141.37	-
7'	176.20	+ 176.16	-
8'	9.36	- 9.36	2.19 (3H, s)
9'	24.39	- 24.39	2.61 (3H, s)



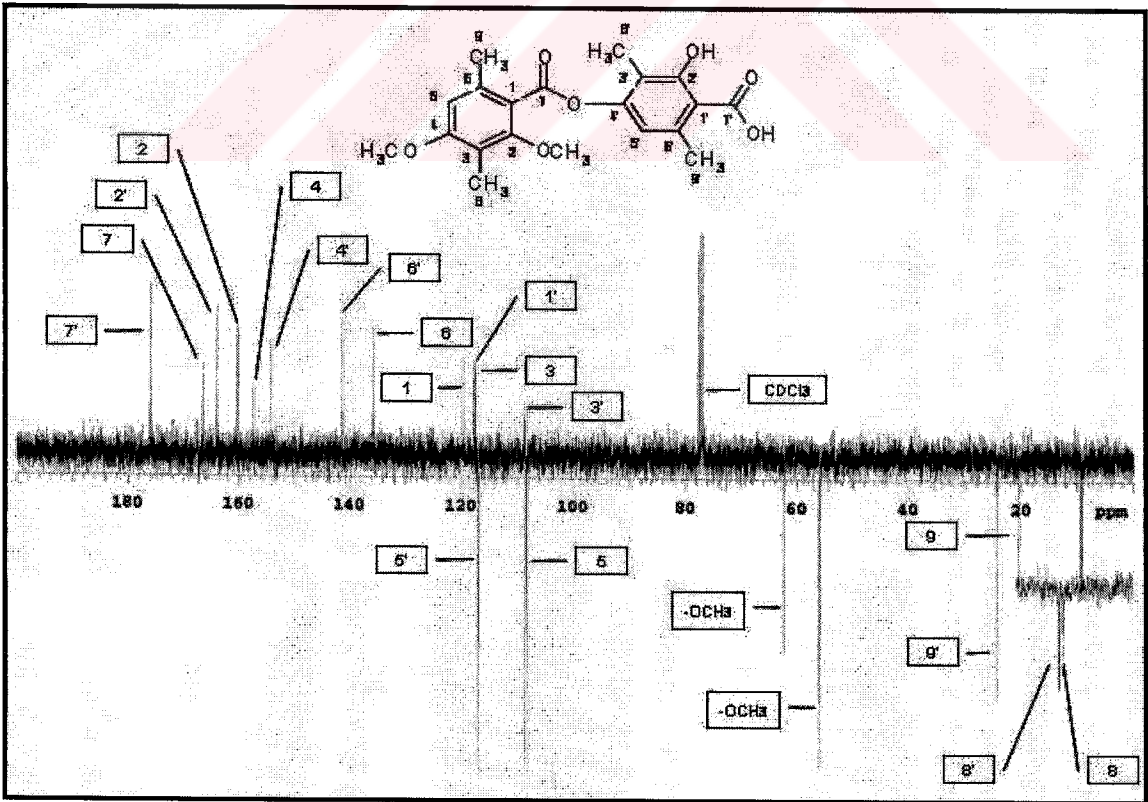
Şekil 14. DA'nın $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3)



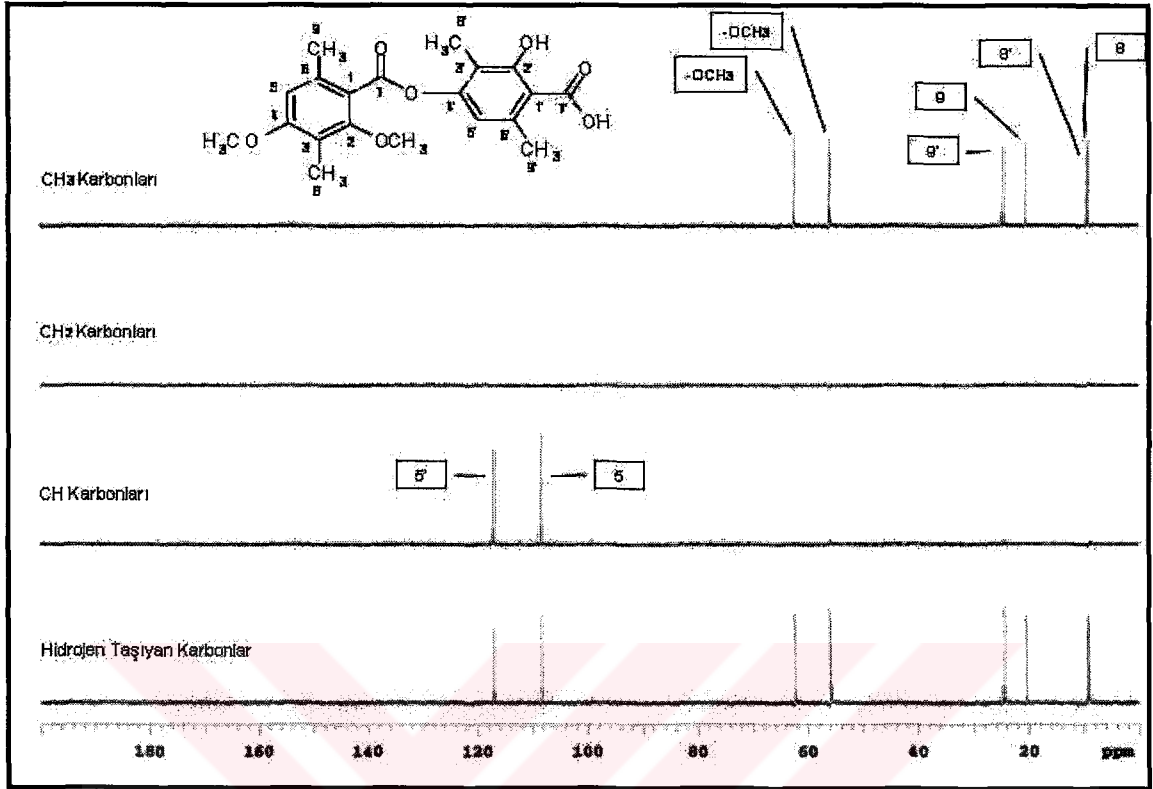
Şekil 15. DA'nın $^1\text{H-NMR}$ integrasyon spektrumu (CDCl_3)



Şekil 16. DA'nın ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)



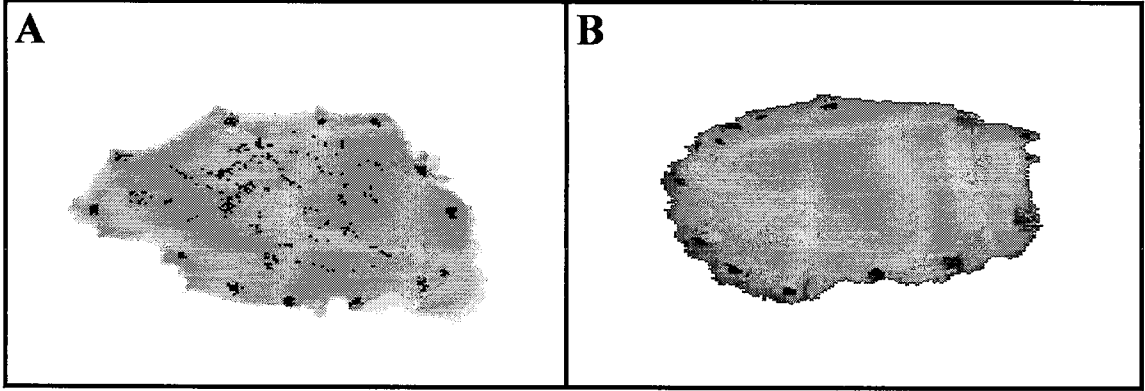
Şekil 17. DA'nın APT ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)



Şekil. 18. DA'nın DEPT ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)

3.2. Makroskopik Bulgular

Makroskopik inceleme sonuçları Tablo 2 ve Şekil 19'da sunulmuştur.



Şekil 19. İND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasarlı dokudan (A) ve DA (200 mg/kg) ile muamele edilmiş gruptan alınan (B) rat mideleri.

Tablo 2'den görüldüğü üzere sadece musluk suyu verilen grupta ülser oluşmazken İND ile muamele edilen mideler'de $30.75 \pm 8.96 \text{ mm}^2$, RAN grubunda $8.38 \pm 3.59 \text{ mm}^2$, CMC'de süspansiyon haline getirilen DA'nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 17.38 ± 9.97 , 14.50 ± 7.85 , 2.63 ± 1.11 ve $1.00 \pm 1.68 \text{ mm}^2$ ülser alanı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre DA ve RAN'ın İND ile oluşturulan ülseri bütün dozlarda önemli oranda ($P < 0.05$) azaltmıştır (Tablo 2).

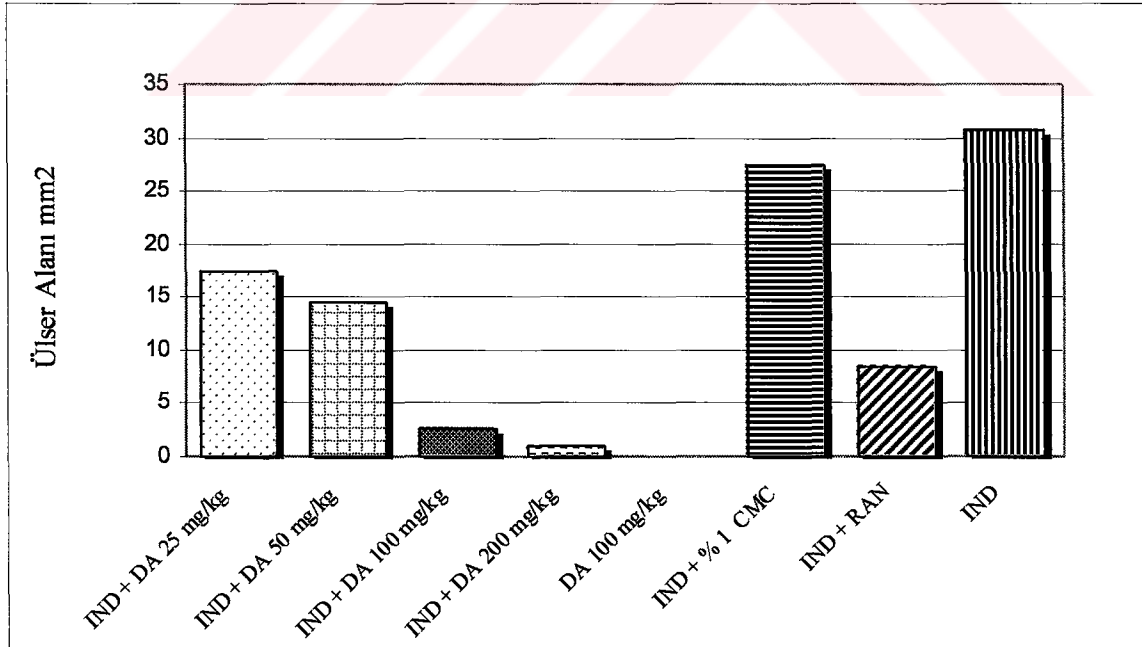
DA, 100 mg/kg dozda İND'siz olarak doğrudan midelere uygulandığında midelerde herhangi bir ülser oluşumu gözlenmedi. Diğer yandan İND ile birlikte uygulandığında CMC'nin İND tarafından oluşturulan mide hasarlarında herhangi bir azalmaya neden olmadığı da belirlendi ($P > 0.05$).

Şekil 20'den de net bir şekilde görülebileceği üzere İND grubunda meydana gelen ülser, uygulanan RAN ve DA'nın her dört dozu vasıtasıyla önemli oranda ($p < 0.05$) azaltılmıştır. İND'nin meydana getirdiği ülser dikkate alındığında ranitidinin % 72.7, DA'nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarının ise sırasıyla % 43.5, % 52.9, % 91.4 ve % 96.7 oranında ülseri engellediği belirlenmiştir.

Tablo 2. İND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasar üzerine farklı dozlarda uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg) ve CMC (% 1)'nin etkilerini gösteren ölçüm sonuçları.

Muameleler	Doz (mg/kg)	N	Hasar alanı		
			mm ²	% Azalma	P
İND-DA	25	6	17.38±9.97	43.5	P<0.05
	50	6	14.50±7.85	52.9	P<0.05
	100	6	2.63±1.11	91.4	P<0.05
	200	6	1.00±1.68	96.7	P<0.05
DA	100	6	0.00±0.00	0	P<0.05
İND-CMC	% 1	6	27.38±2.29	11.0	P>0.05
İND-RAN	50	6	8.38±3.59	72.7	P<0.05
İND	25	6	30.75±8.96	-	
KONTROL		6	0.00±0.00	0	P<0.05

Kontrol : Musluk suyu ile muamele edilmiş mide dokularındaki ülser alanları
 İND : İndometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki ülser alanları
 DA : Diffraktaik asit ile muamele edilmiş mide dokularındaki ülser alanları
 RAN : Ranitidine ile muamele edilmiş mide dokularındaki ülser alanları
 CMC : CMC ile muamele edilmiş mide dokularındaki ülser alanları
 N : Deneylerde kullanılan rat sayısı
 % Azalma : ((İND-Uygulama/İND)*100) formülüne göre belirlenmiştir.



Şekil 20. İND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasar üzerine farklı dozlarda uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200mg/kg), RAN (50 mg/kg) ve CMC (% 1)'nin etkilerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram

3.3. Biyokimyasal Bulgular

Rat mideleri makroskopik olarak incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20°C 'de saklandı ve dokuların enzim aktiviteleri en geç üç gün içerisinde analiz edildi. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri ile LPO ve GSH miktarları literatürlere göre uygun metodlar kullanılarak tespit edildi. Ayrıca süspansiyon halinde uygulanan CMC ile DA'nın antiasit özelliğini olup olmadığını belirlemek için de % 1 CMC ve 100 mg/kg DA'nın pH'sı ölçüldü. %1 CMC'nin pH'sı 7.7 ve 100 mg/kg DA'nın pH'sı 6.9 bulundu. Elde edilen veriler ile antiasit mekanizması ile ülserojen etkinin giderilmediğine kanaat getirildi.

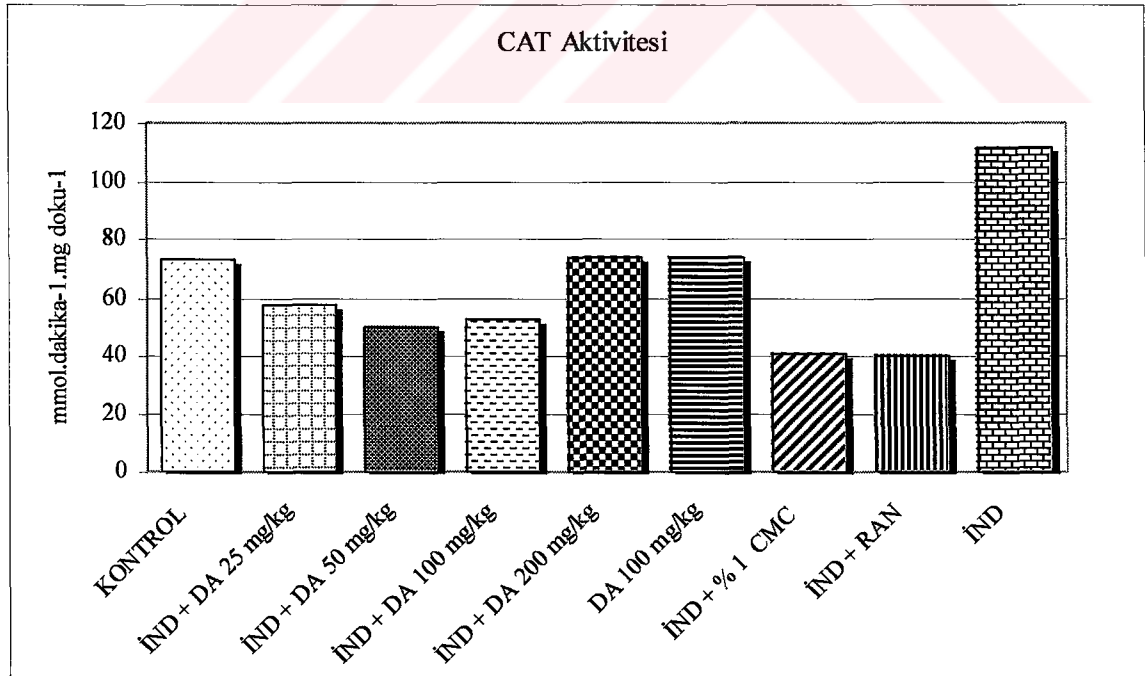
3.3.1. Katalaz Aktivitesi Üzerine DA'nın Etkileri

CMC'de çözülen DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN, İND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen CAT aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 21'de gösterilmiştir. Tablo 3'den görüldüğü üzere CAT aktiviteleri kontrol grubunda 73.09 ± 5.98 , indometazin grubu midelerinde 111.48 ± 2.47 , ranitidin grubunda 39.67 ± 2.19 ve İND ile birlikte uygulanan DA'nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 57.78 ± 0.63 , 49.57 ± 5.08 , 52.96 ± 0.64 ve 73.51 ± 4.55 mmol.dakika⁻¹.mg doku⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre İND'nin önemli oranda ($P<0.05$) artırdığı CAT aktivitesini, İND ile birlikte uygulanan CMC ve RAN'ın önemli oranda azalttığı ($P<0,05$) tespit edildi. Diğer yandan DA, 100 mg/kg dozda İND'siz olarak doğrudan uygulandığında CAT aktivitesini etkilemezken ($P>0.05$), İND ile birlikte uygulandığında 25, 50 ve 100 mg/kg önemli oranda ($P<0.05$) 200 mg/kg dozda ise önemsiz oranda ($P>0.05$) aktiviteyi azaltmıştır.

Tablo 3. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki CAT aktivitelerini gösteren sonuçlar. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Muameleler	Doz mg/kg	N	CAT Aktivitesi		P
			mmol.dakika ⁻¹ .mg doku ⁻¹	% Kontrol	
İND-DA	25	6	57.78 \pm 0,63	79.1	P<0.05
	50	6	49.57 \pm 5,08	67.8	P<0.05
	100	6	52.96 \pm 0,64	72.5	P<0.05
	200	6	73.51 \pm 4,55	100.7	P>0.05
DA	100	6	73.43 \pm 1,17	100.5	P>0.05
İND + CMC	% 1	6	40.77 \pm 1,44	55.8	P<0.05
İND + RAN	50	6	39.67 \pm 2,19	54.3	P<0.05
İND	25	6	111.48 \pm 2,47	152.5	P<0.05
Kontrol		6	73.09 \pm 5,98	100.0	-

Kontrol : Musluk suyu ile muamele edilmiş mide dokularındaki CAT aktiviteleri
 İND : İndometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki CAT aktiviteleri
 DA : Diffraktaik asit ile muamele edilmiş mide dokularındaki CAT aktiviteleri
 RAN : Ranitidine ile muamele edilmiş mide dokularındaki CAT aktiviteleri
 CMC : CMC ile muamele edilmiş mide dokularındaki CAT aktiviteleri
 N : Deneylerde kullanılan rat sayısı



Şekil 21. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki CAT aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

Tablo 3 ve Şekil 21'den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre İND ile muamele sonrası meydana gelen CAT aktivitesinde ki artışı ($p<0.05$) İND ile birlikte uygulanan 200 mg/kg DA tarafından net bir şekilde azaltmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($p>0.05$), diğer yandan İND olmaksızın 100 mg/kg dozda uygulanan DA ise CAT aktivitesini etkilememiştir ($p<0.05$). Bu bulgular DA, RAN ve CMC'nin CAT aktivitesi üzerine inhibisyon etkisine sahip olduğunu göstermektedir.

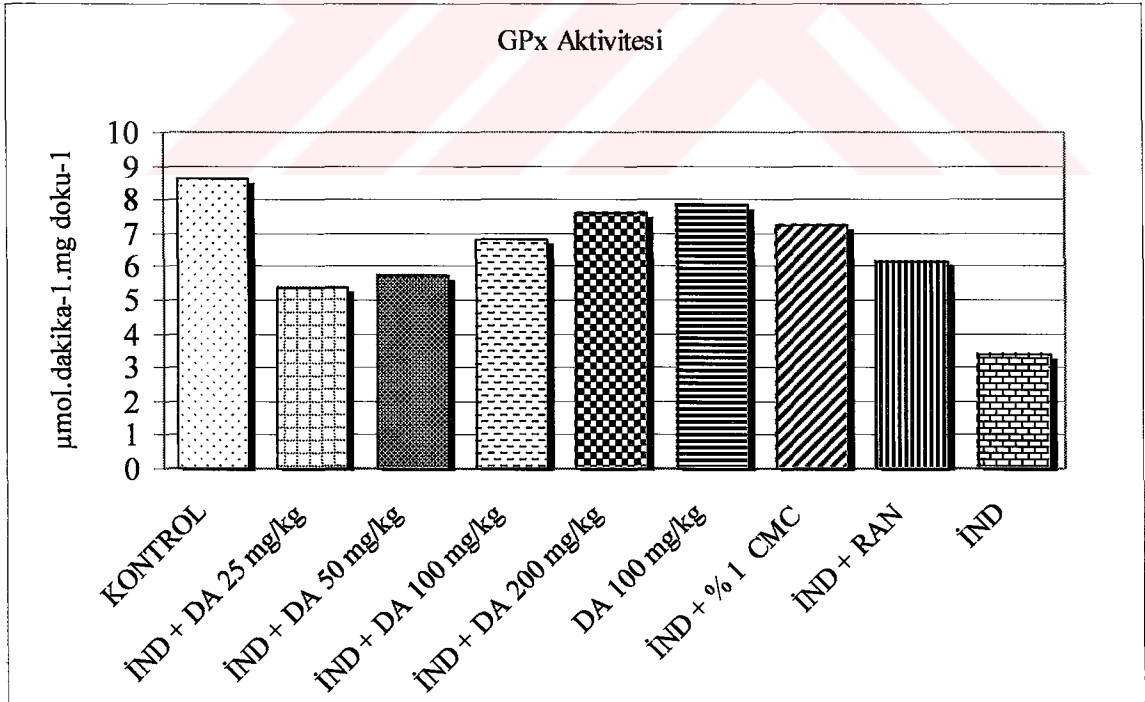
3.3.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Üzerine DA'nın Etkileri

CMC'de süspansiyon haline getirilerek uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN, İND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GPx aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 22 de gösterilmiştir. Tablo 4'den görüldüğü üzere GPx aktiviteleri kontrol grubunda 8.62 ± 0.08 , indometazin grubu midelerinde 3.39 ± 0.43 , ranitidin grubunda 6.16 ± 0.13 ve İND ile birlikte uygulanan DA'nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 5.36 ± 0.27 , 5.72 ± 0.15 , 6.83 ± 0.23 ve 7.59 ± 0.08 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre İND'nin önemli oranda ($P<0.05$) azalttığı GPx aktivitesini, İND ile birlikte uygulanan DA, CMC ve RAN'ın yeniden artırdığı ve hatta 200 mg/kg dozdaki DA'nın kontrol seviyesine getirdiği ($P>0.05$) söylenebilir. Diğer yandan DA, 100 mg/kg dozda İND'siz olarak doğrudan uygulandığında GPx aktivitesini etkilemezken ($P>0.05$), İND ile birlikte uygulandığında 25, 50 ve 100 mg/kg önemli oranda ($P<0.05$) aktiviteyi artırdığı belirlendi. GPx aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol.dakika}^{-1}.\text{mg doku}^{-1}$ olarak tarif edildi.

Tablo 4. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki GPx aktivitelerini gösteren sonuçlar. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Muameleler	Doz mg/kg	N	GPx Aktivitesi		P
			$\mu\text{mol.dakika}^{-1}.\text{mg doku}^{-1}$	% Kontrol	
İND-DA	25	6	5.36 ± 0.27	37.8	P<0.05
	50	6	5.72 ± 0.15	66.4	P<0.05
	100	6	6.83 ± 0.23	79.2	P<0.05
	200	6	7.59 ± 0.08	88.1	P<0.05
DA	100	6	7.86 ± 0.08	91.5	P>0.05
İND + CMC	% 1	6	7.24 ± 0.23	84.0	P<0.05
İND + RAN	50	6	6.16 ± 0.13	71.5	P<0.05
İND	25	6	3.39 ± 0.43	39.4	P<0.05
Kontrol		6	8.62 ± 0.08	100.0	

Kontrol : Musluk suyu ile muamele edilmiş mide dokularındaki GPx aktiviteleri
 İND : İndometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki GPx aktiviteleri
 DA : Difraktaik asit ile muamele edilmiş mide dokularındaki GPx aktiviteleri
 RAN : Ranitidine ile muamele edilmiş mide dokularındaki GPx aktiviteleri
 CMC : CMC ile muamele edilmiş mide dokularındaki GPx aktiviteleri
 N : Deneyleerde kullanılan rat sayısı



Şekil 22. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GPx aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

Tablo 4 ve Şekil 22'den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre İND ile muamele sonrası meydana gelen GPx aktivitesinde ki inhibisyon ($p<0.05$) İND ile birlikte uygulanan 200 mg/kg DA tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($p>0.05$), diğer yandan İND olmaksızın 100 mg/kg dozda uygulanan DA, GPx aktivitesini etkilememiştir ($p<0.05$). Bu bulgular DA, RAN ve CMC'nin İND ile birlikte uygulandığında GPx aktivitesini artırıcı etkisinin olduğunu göstermektedir.

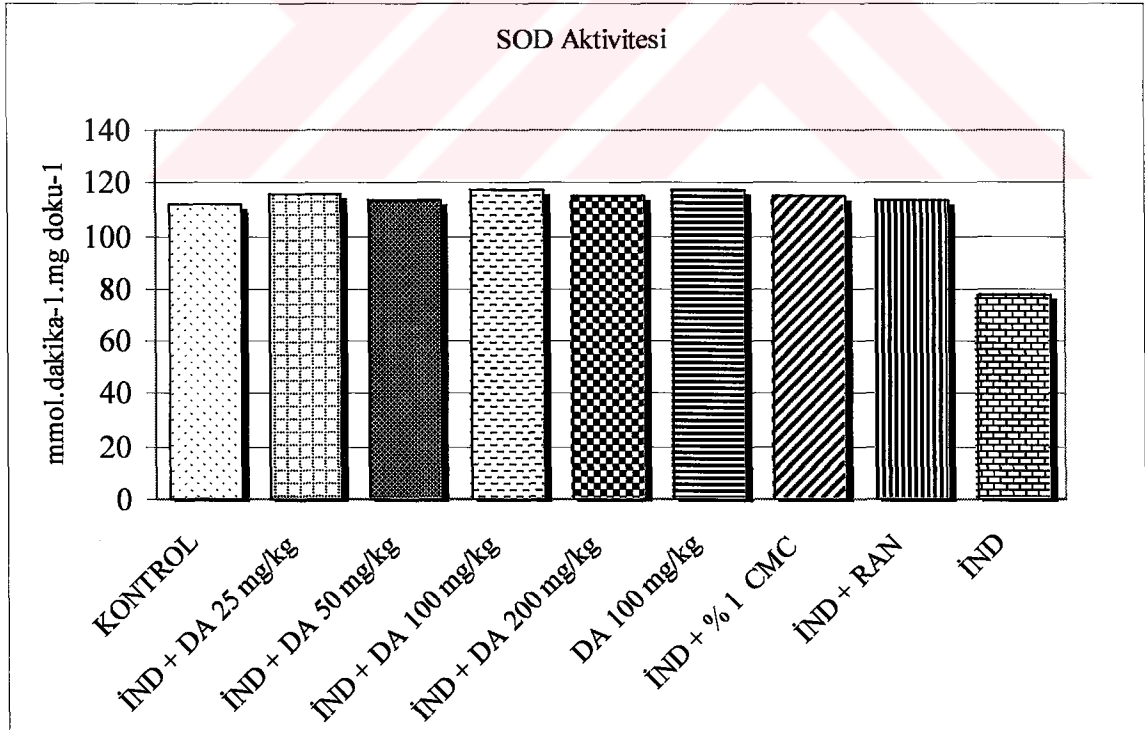
3.3.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine DA'nın Etkileri

CMC'de süspansiyon halinde uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN, İND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen SOD aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 23'de gösterilmiştir. Tablo 5'den görüldüğü üzere SOD aktiviteleri kontrol grubunda 112.10 ± 0.35 , indometazin grubu midelerinde 77.73 ± 1.82 , ranitidin grubunda 113.52 ± 0.83 ve İND ile birlikte uygulanan DA'nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 115.29 ± 0.46 , 113.09 ± 0.94 , 117.18 ± 0.69 ve 114.98 ± 1.25 olarak tespit edilmiştir. Tablo ve şekilden de görüleceği gibi İND'nin önemli oranda ($P<0.05$) azalttığı SOD aktivitesini, DA ve RAN'ın yeniden kontrol grubu seviyesine ($P>0.05$) artırdığı tespit edilmiştir. DA, 100 mg/kg dozda İND'siz olarak doğrudan uygulandığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($P<0.05$) SOD aktivitesini artırmıştır. Diğer yandan İND ile birlikte uygulandığında CMC'nin İND tarafından azaltılan SOD aktivitesini kontrol grubu seviyesine çıkardığı gözlemlendi ($P>0.05$). SOD aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $mmol.dakika^{-1}.mg dokü^{-1}$ olarak tarif edildi.

Tablo 5. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki SOD aktivitelerini gösteren sonuçlar. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm , standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Muameleler	Doz mg/kg	N	SOD Aktivitesi		P
			mmol.dakika ⁻¹ .mg doku ⁻¹	% Kontrol	
İND-DA	25	6	115.29 \pm 0.46	102.9	P>0.05
	50	6	113.09 \pm 0.94	100.9	P>0.05
	100	6	117.18 \pm 0.69	104.6	P<0.05
	200	6	114.98 \pm 1.25	102.6	P>0.05
DA	100	6	117.49 \pm 0.11	104.8	P<0.05
İND + CMC	% 1	6	114.56 \pm 0.28	102.2	P>0.05
İND + RAN	50	6	113.52 \pm 0.83	101.2	P>0.05
İND	25	6	77.73 \pm 1.82	69.3	P<0.05
Kontrol		6	112.10 \pm 0.35	100.0	

- Kontrol : Musluk suyu ile muamele edilmiş mide dokularındaki SOD aktiviteleri
 İND : İndometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki SOD aktiviteleri
 DA : Diffraktaik asit ile muamele edilmiş mide dokularındaki SOD aktiviteleri
 RAN : Ranitidine ile muamele edilmiş mide dokularındaki SOD aktiviteleri
 CMC : CMC ile muamele edilmiş mide dokularındaki SOD aktiviteleri
 N : Deneylerde kullanılan rat sayısı



Şekil 23. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki SOD aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

Tablo 5 ve Şekil 23'den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre İND ile muamele sonrası meydana gelen SOD aktivitesinde ki inhibisyon ($p<0.05$) uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg) ve CMC tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol seviyesine getirilmiştir ($p>0.05$), hatta 100 mg/kg dozda uygulanan DA, İND olmaksızın kontrol dokusunun da üzerine çıkarmıştır ($p<0.05$). Bu bulgular DA'nın SOD aktivitesi üzerine aktive edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

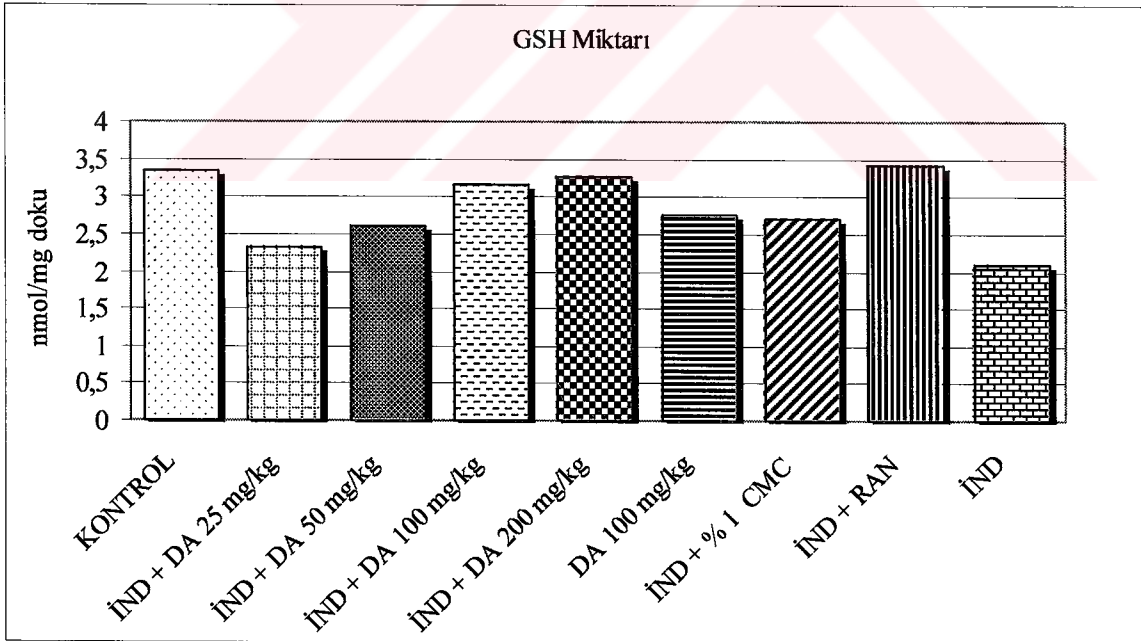
3.3.4. GSH Miktarı Üzerine DA'nın Etkileri

CMC ile süspansiyon halinde uygulanan çözülen DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN, İND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GSH miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 24'de gösterilmiştir. Tablo 6'dan görüldüğü üzere GSH miktarları kontrol grubunda 3.34 ± 0.15 , indometazin grubu midelerinde 2.09 ± 0.05 , ranitidin grubunda 3.41 ± 0.09 ve DA'nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 2.33 ± 0.04 , 2.59 ± 0.18 , 3.17 ± 0.04 ve 3.26 ± 0.03 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize İND'nin önemli oranda ($P<0.05$) azalttığı GSH miktarını, İND ile birlikte uygulanan 100 ve 200 mg/kg dozda DA ve RAN'ın kontrol seviyesine yükselttiği ($P>0.05$) göstermektedir. Diğer yandan DA, hem 100 mg/kg dozda İND'siz olarak doğrudan uygulandığında ($P<0.05$), hemde 25 ve 50 mg/kg dozlarda İND ile birlikte uygulandığında önemli oranda ($P<0.05$) GSH miktarını azaltmıştır. Numunelerin GSH miktarları, *nmol/mg doku* olarak tarif edildi.

Tablo 6. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki GSH miktarlarını gösteren sonuçlar. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Muameleler	Doz mg/kg	N	GSH Miktarı		P
			nmol/mg doku	% Kontrol	
İND-DA	25	6	2.33 \pm 0.04	69.8	P<0.05
	50	6	2.59 \pm 0.18	77.5	P<0.05
	100	6	3.17 \pm 0.04	94.9	P>0.05
	200	6	3.26 \pm 0.03	97.6	P>0.05
DA	100	6	2.75 \pm 0.09	82.3	P<0.05
İND + CMC	% 1	6	2.70 \pm 0.10	80.8	P<0.05
İND + RAN	50	6	3.41 \pm 0.09	102.1	P>0.05
İND	25	6	2.09 \pm 0.05	62.6	P<0.05
Kontrol		6	3.34 \pm 0.15	100.0	

Kontrol : Musluk suyu ile muamele edilmiş mide dokularındaki GSH miktarları
 İND : İndometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki GSH miktarları
 DA : Diffraktaik asit ile muamele edilmiş mide dokularındaki GSH miktarları
 RAN : Ranitidine ile muamele edilmiş mide dokularındaki GSH miktarları
 CMC : CMC ile muamele edilmiş mide dokularındaki GSH miktarları
 N : Deneyleerde kullanılan rat sayısı



Şekil 24. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GSH miktarlarının karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

Tablo 6 ve Şekil 24'den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre İND ile muamele sonrası meydana gelen GSH miktarındaki azalma ($p<0.05$) İND ile birlikte uygulanan 100 ve 200 mg/kg DA ile RAN tarafından yeniden ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($p>0.05$). Diğer yandan, İND olmaksızın 100 mg/kg dozda uygulanan DA, GSH miktarını bir miktar azaltmış ve bu azalma istatistiksel açıdan da önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Bu bulgular DA, RAN ve CMC'nin İND ile birlikte uygulandıklarında GSH miktarını artırdığını göstermektedir.

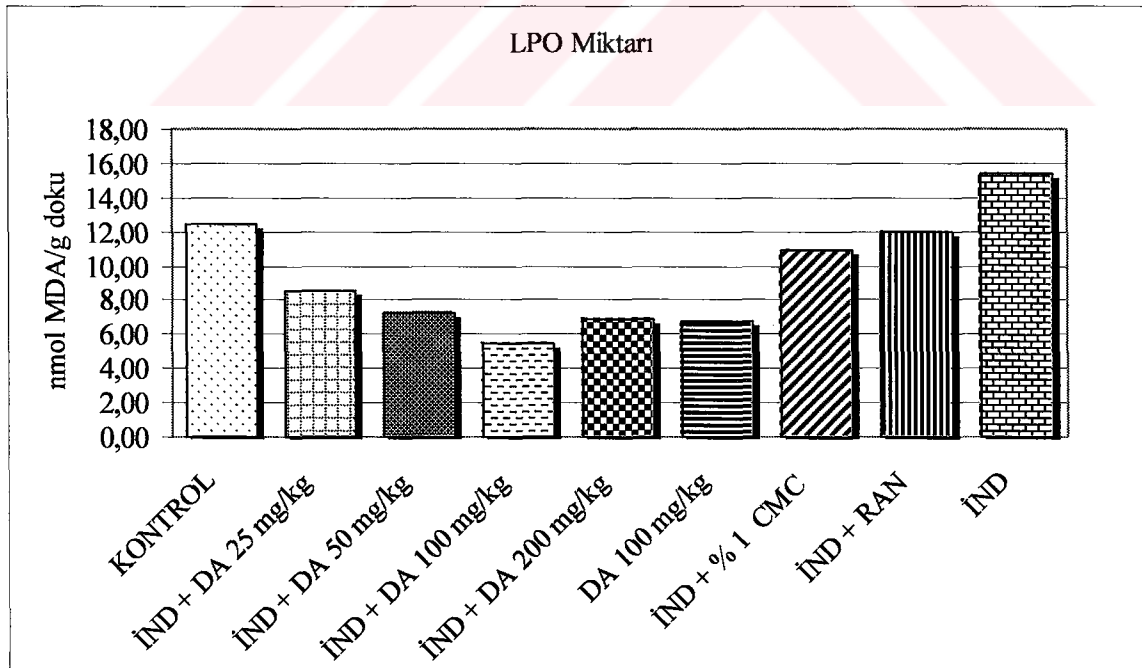
3.3.5. LPO Miktarı Üzerine DA'nın Etkileri

CMC ile süspansiyon halinde uygulanan DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN, İND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MDA miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 25'de gösterilmiştir. Tablo 6'dan görüldüğü üzere LPO'nun göstergesi olan MDA miktarları kontrol grubunda 12.42 ± 0.49 , indometazin grubu midelerinde 15.36 ± 0.40 , ranitidin grubunda 12.00 ± 1.20 ve İND ile birlikte uygulanan DA'nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 8.51 ± 3.05 , 7.21 ± 0.28 , 5.41 ± 1.02 ve 6.88 ± 1.98 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bize İND'nin önemli oranda ($P<0.05$) artırdığı LPO miktarını, İND ile birlikte uygulanan CMC ve RAN'ın kontrol seviyesine azalttığı ($P>0,05$) göstermektedir. Diğer yandan DA, hem 100 mg/kg dozda İND'siz olarak doğrudan uygulandığında ($P<0,05$), hemde 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda İND ile birlikte uygulandığında önemli oranda ($P<0,05$) LPO miktarını azaltmıştır. Numunelerin LPO miktarları, *nmol MDA/g doku* olarak tarif edildi.

Tablo 7. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide dokularındaki LPO miktarlarını gösteren sonuçlar. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Muameleler	Doz mg/kg	N	LPO Miktarı		P
			nmol MDA/g doku	% Kontrol	
İND-DA	25	6	8.51 \pm 3.05	68.4	P>0.05
	50	6	7.21 \pm 0.28	57.9	P<0.05
	100	6	5.41 \pm 1.02	43.4	P<0.05
	200	6	6.88 \pm 1.98	55.3	P<0.05
DA	100	6	6.72 \pm 0.28	54.2	P<0.05
İND + CMC	% 1	6	10.87 \pm 0.88	87.4	P>0.05
İND + RAN	50	6	12.00 \pm 1.20	96.5	P>0.05
İND	25	6	15.36 \pm 0.40	123.7	P<0.05
Kontrol		6	12.42 \pm 0.49	100.0	

Kontrol : Musluk suyu ile muamele edilmiş mide dokularındaki LPO miktarları
 İND : İndometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki LPO miktarları
 DA : Diffraktaik asit ile muamele edilmiş mide dokularındaki LPO miktarları
 RAN : Ranitidine ile muamele edilmiş mide dokularındaki LPO miktarları
 CMC : CMC ile muamele edilmiş mide dokularındaki LPO miktarları
 N : Deneylerde kullanılan rat sayısı



Şekil 25. İND (25 mg/kg), DA (25, 50, 100 ve 200 mg/kg), RAN (50 mg/kg), CMC (% 1) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki LPO miktarlarının karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

Tablo 7 ve Şekil 25'den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre İND ile muamele sonrası meydana gelen LPO miktarındaki artış ($p<0.05$) İND ile birlikte uygulanan CMC ve RAN tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($p>0.05$); Bununla beraber, İND olmaksızın 100 mg/kg dozda uygulanan DA ve İND ile birlikte uygulanan DA'nın tüm dozları LPO miktarını daha da azaltmış ve bu azalma istatistiksel açıdan da önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Bu bulgular DA, RAN ve CMC'nin İND ile birlikte uygulandıklarında LPO miktarını azalttığını göstermektedir.



4. TARTIŞMA

Günümüzde 20000 den fazla türe sahip olduğu tahmin edilen likenler, mantarlar ve alglerin bir araya gelerek teşkil ettikleri simbiyotik (ortak yaşayan) bir bitki grubudur. Likenler pek çok yönden biyolojik aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir⁷⁸⁻⁸³. Diğer yandan, likenlerden izole edilen çok sayıda molekülün de değişik biyolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir⁷⁸⁻¹⁰⁴. Bu ilginç bitki grubuna dahil olan türlerden birisi de epifit (ağaçlar üzerinde yaşayan) bir liken olan *Usnea longissima*'dır . Bu liken türü hava kirliliğinin belirlenmesinde önemli bir indikatör olarak kabul edilmektedir. Çocuk bezi, kadın hijyen¹²⁶ ürünlerinin yapımında ve çeşitli ilaçların terkinde yer almıştır. Hem Çin hem de Hindistan'da ekspektoran olarak kullanılan bu tür Avrupa'da da iyi bir saç güçlendirici olarak bilinmektedir¹²². Bunlara ilaveten dünyanın farklı bölgelerinde, halk hekimliğinde terleme, baş dönmesi, üşüme, ağrı ve balgamın önlenmesinde, kemik kırıklarının tedavisinde¹²³, hijyenik yatak yapımında¹²⁵, idrar yolu hastalıkları ile ülser tedavisinde^{119,127,128} kullanılmıştır. Bu çalışmada, halk hekimliğinde yaygın bir kullanıma sahip olan *Usnea longissima Ach.* deney materyali olarak seçilmiştir.

Likenlerin antiülserojen ve antioksidan etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırma vardır^{109,110,158}. Antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında mevcut araştırmanın bu konuda bir boşluğu dolduracağı inancını taşımaktayız. Bu amaçla, daha önceki bir çalışmamızda ülser önleyici etkisi olduğunu belirlediğimiz *Usnea longissima Ach.*'nin¹⁵⁸ bünyesinde yer alan hangi molekül veya moleküllerden bu etkinin kaynaklandığını merak ederek başlattığımız izolasyon ve saflaştırma işlemleri sonunda saf olarak elde etmeyi başardığımız difraktaik asit'in değişik dozlarda ülser önleyici etkisi, antioksidan

metabolizma üzerine olan etkisi ve antioksidan aktivitesi araştırıldı. Ayrıca, enzim aktivitelerinin ülser önleyici aktivite mekanizması üzerine olan etkisini araştırmak için ülserli dokularda SOD, CAT ve GST enzim aktiviteleri ile GSH ve LPO miktarları ölçüldü.

Araştırmamızda indometazin ile muamele edilen rat midelerinde meydana gelen ülserli doku hasarı (Tablo 2, Şekil 20) DA' nın 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda İND'e göre sırasıyla % 43.5, 52.9, 91.4 ve 96.7, azalttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). İND'siz uygulanan DA ülser alanı oluşturmazken RAN'ın İND ile oluşturulan ülseri %72.7 oranında ($P < 0.05$) azalttığı, CMC'nin ise ülserin engellenmesinde etkisiz olduğu ($p > 0.05$) tespit edildi (Şekil 20). DA'nın uygulanan dozlar arasında en etkili doz 200 mg/kg olarak uygulanan doz olup ranitidin ile mukayese edildiğinde ülser önleyici etkisi daha fazladır.

İndometazinin gastrik hasar oluşturmasının sebepleri arasında; mide dokusundaki sitoprotektif prostaglandinlerin sentezini inhibe etmesi¹⁹³, LPO'yu artırması^{31,194-199}, doku glukoz seviyesini azaltması²⁰⁰, MPx aktivitesini ve NOS aktivitesini artırması^{201,202} sayılabilir. İndometazin, etanol ve diğer ajanlar ile oluşturulan mukozal hasarların reaktif oksijen molekülleri ile ilişkili olduğu da öne sürülmüştür²⁰³.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda indometazin gibi antiinflamatuvar ilaçların hem prooksidan hem de lipit peroksit 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^{197,198}. Oksidatif hasar daha ileriki aşamalarda kontrol edilemeyen lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve nihayetinde de hücre ölümüne yol açabilmektedir.

Organizmalar ROS'ların toksisitesine karşı hem enzimatik hem de enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptirler²⁰⁴⁻²⁰⁶. 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 ve GPx ise H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşümünü katalizler²⁰⁷.

İndometazin ile ülser olmuş dokularda (SOD, CAT ve GPx) bazı antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı konusunda pekçok literatür kaydına rastlanmıştır^{199,208-211}.

Usnea longissima Ach.'dan elde edilen su ekstresinin halk arasında ülser tedavisinde kullanıldığına dair bilgiler literatürde kayıtlı^{118,119,128} olmasına karşın antiülserojen etki mekanizması hakkında ise yalnızca bir tek literatür kaydı mevcut olup bileşenlerinden herhangi birisi hakkında da çok az sayıda çalışma mevcuttur^{158,212,213}. Mevcut çalışma *Usnea longissima Ach.*'dan elde edilen DA'nın ülser önleyici etkiye sahip olduğunu bilimsel olarak ortaya koymaktadır. Fakat etki mekanizmasının; sitoprotektif prostaglandinlerin ve bikarbonatların sentezini artırarak mı yoksa mukus sentezini azaltarak mı, ve yahut ta MPx ve NOS aktivitesi üzerine mi etkili olduğu açıklığa kavuşturulamamıştır. Bununla beraber araştırmamızda, *Usnea longissima Ach.*'dan elde edilen DA'nın antioksidan savunma sistemi üzerine pozitif etkileri tespit edilmiştir. Etki mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için ayrıntılı araştırmalarımız devam edecektir.

Araştırmamızda indometazin ile muamele edilen rat midelerinde belirlenen SOD aktivitesi (Tablo 5, Şekil 23) kontrol grubuna göre % 30.7 oranında azalmıştır ($p < 0.05$). *Usnea longissima Ach.*'dan elde edilen DA tarafından hem CMC ile birlikte uygulandığında ve hemde İND olmaksızın yalnız başına uygulandığında SOD aktivitesi artırılmış ve kontrol seviyesine getirilmiştir. Burada dikkat çekici bir durum İND ile

birlikte uygulandığında CMC'nin de SOD aktivitesini kontrol grubu seviyesine ($p>0.05$) getirmiş olmasının belirlenmesidir. DA yalnız başına uygulandığında ise SOD aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı oranda artırarak kontrol grubunun da üzerine çıkarmıştır ($p<0.05$). Diğer yandan % 1'lik CMC ile süspansiyon halinde uygulanan İND ile birlikte uygulandığında ise İND grubunun azalttığı SOD aktivitesini yeniden kontrol seviyesine yükseltmiştir. Sonuçlara göre CMC'nin ve DA'nın SOD aktivitesi üzerine sinerjistik olarak aktive edici yönde davrandıkları söylenebilir. Benzer şekilde RAN'nın da SOD aktivitesini kontrol grubu seviyesine çıkardığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). RAN grubu ile DA uygulanan gruplar arasındaki fark kendi aralarında istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Diklofenak sodyum, meloksikam ve ketoprofenil gibi çeşitli NSAID'ler ve indometazin ile muamele edilen rat mide dokularında SOD aktivitesinin azaldığına ilişkin bulgularımız daha önce yapılmış olan çok sayıda çalışma^{199,209,210,212} ile uyum içerisindedir. Fakat indometazinin hangi mekanizma ile SOD aktivitesini inhibe ettiği henüz kesin olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Antioksidanların inhibisyonu ROS birikimine yol açar. ROS'ların üretildiği yerde SOD'yi de içine alan antioksidanların varlığı, indometazin ile uyarılan patojenezin kontrol edilmesinde koruyucu bir faktör olarak davranır²⁰⁸. Araştırmamızda indometazin etkisi ile azalan SOD aktivitesinin, DA'nın tüm dozlar ve RAN 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 İND ile oluşturulan ülser modelinin olası mekanizmalarından birisi olarak kabul edilmektedir^{208,214-217}. Bu araştırmalar ışığında ele alındığında bu araştırma

çerçevesinde elde ettiğimiz bulgular prostaglandin seviyeleri üzerine de DA'nın etkili olduğu izlenimini vermektedir.

İndometazin 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 bulunurlar²⁰⁸.

SOD veya SOD'ye benzer etki gösteren ajanlar 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^{138,208}.

SOD inhibitörü olan dietilditiyokarbamat (DDC) verilen indometazin ile uyarılmış ülserli rat dokusunda SOD aktivitesinin azaldığı, bunun sebebinin ise mukozal asidifikasyonun yol açtığı bikarbonat salgılanmasındaki artışın DDC tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir²¹⁸. DDC'nin bikarbonat salgılanması üzerindeki inhibisyon etkisi SOD ilavesiyle tersine döndürülebilir²¹⁹. Bu bilgilerden yola çıkarak SOD bikarbonat salgılanması prosesinde de rol aldığı söylenilebilir.

Bütün bu verilerden yola çıkarak RAN'ın ve DA'nın ülser önleyici aktivite göstermesinde, SOD aktivitesini artırmasının önemli bir paya sahip olduğunu düşünmekteyiz. Fakat CMC hakkında böyle bir sonuç çıkarmak mümkün gözükmemektedir. Zira CMC, SOD aktivitesi üzerine pozitif etki gösterirken İND ülseri üzerine etkisizdir (Şekil 20).

Araştırmamızda kontrol ve muamele gruplarında tespit edilen CAT aktiviteleri Tablo 3 ve Şekil 21'de sunulmuştur. RAN ve CMC, İND tarafından önemli oranda artırılan CAT aktivitesini yeniden azaltmıştır. Diğer yandan İND olmaksızın yalnız

uygulanan DA'nın CAT aktivitesi üzerine etkisiz olduğu, birlikte uygulandığında ise CAT aktivitesini azalttığı tespit edildi. Bu bulgular DA'nın CAT aktivitesi üzerine etkisiz olduğunu göstermektedir. Meydana gelen CAT inhibisyonunun CMC'den kaynaklandığı söylenebilir. Bu bağlamda, DA'nın mevcut ülser önleyici etkisinin CAT aktivitesi ile ilişkili olmadığı söylenebileceği gibi farklı bir mekanizmada öne sürülebilir.

Diğer yandan GPx aktivitesi ile ilgili bulgularımız (Şekil 22, Tablo 4) İND ile muamele edilen rat midelerinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %60 oranında bir inhibisyon meydana geldiğini ($p<0.05$) göstermektedir. RAN ve CMC ile muamele edilen gruplarda GPx kısmen aktive edilirken, DA'nın yalnız başına muamele edilen gruplarda GPx aktivitesini etkilemediği tespit ($p>0.05$) edilmiştir. İND ile birlikte uygulanan DA ise doz artışına bağlı olarak GPx aktivitesini kısmen artırmış fakat kontrol seviyesine getirememiş olup muhtemelen meydana gelen bu artış da CMC'den kaynaklanıyor olabilir. Ancak total GSH düzeyinin de DA ile muamele edilmiş dokularda fazla olması H_2O_2 'nin daha fazla kullanabileceğini böylece GPx aktivitesini artırabileceği yargısını da çıkarabilir.

Mide dokusunda indometazin vasıtasıyla CAT aktivitesinin artırıldığı literatürlerde belirtilmiştir^{199,209,220}. Bizim bulgularımızda da indometazin tarafından CAT aktivitesinin artırıldığı tespit edilmiştir. GPx aktivitesinin İND tarafından azaltıldığı da literatürde kayıtlıdır^{31,209,211}. Bu açıdan bakıldığında bulgularımız literatürle uyum içerisindedir. İND ile muamele edilen dokularda CAT aktivitesi artarken GPx aktivitesinin azalması her iki enzimin H_2O_2 'yi kullanmakta yarışıyor olmalarından kaynaklanıyor olabilir²²¹. CAT ve GPx enzimleri H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürerek zayıf radikalik etkisini ortadan kaldırır. Çünkü H_2O_2 ortaklanmamış bir

elektron içermediği için kendi başına güçlü bir radikal değildir^{165,169}. 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 oluşturabilir¹⁵⁸. 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.

Şekil 24 ve Tablo 6'dan görülebileceği gibi GSH miktarı İND tarafından % 37,4 oranında azaltılmıştır. İND ile birlikte uygulanan DA bütün dozlarda GSH miktarını artırmış 100 ve 200 mg/kg dozda ise daha da artırarak kontrol seviyesine getirmiştir (p>0.05). RAN, GSH miktarını kontrol düzeyine artırırken, CMC kısmi olarak azaltmıştır. DA, İND olmaksızın uygulandığında ise kısmi bir azalmaya neden olmuştur. Bu bulgular İND tarafından meydana getirilen gastrik hasarın temel sebeplerinden birisinin gastrik GSH düzeyinin azaltılması olduğunu göstermektedir. Bulgularımız literatürlerdeki bulgular ile tam bir uyum içerisindedir^{208,211,222}.

İND ile oluşturulan gastrik hasarlı dokularda LPO miktarının arttığı çok sayıda literatürde kayıtlıdır^{26,31,52,208,209,211,218,221,223}. Bizim bulgularımızda da İND ile muamele sonrası LPO miktarı önemli oranda artmıştır (p<0.05). İND ile birlikte uygulanan DA'nın bütün dozlarda önemli oranda LPO miktarını azalttığı (p<0.05) belirlenmiştir (Tablo 7, Şekil 25). RAN ve CMC, kısmi bir miktar azalmasına neden olurken İND olmaksızın yalnız başına uygulanan DA önemli oranda LPO miktarını azalttığı gözlenmiştir.

İndometazin vasıtasıyla oluşturulan gastrik hasarın en önemli sebebi olarak prostaglandin sentezinin engellenmesi gösterilmektedir^{193,208,216,217}. Prostaglandin

sentezini gerçekleştiren prostaglandin H sentaz, hem COX hem de hidroperoksidaz aktivitesine sahiptir. İndometazinin 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 edilmemelidir²²³. Zira indometazin ortamda mevcut olan bir peroksidaz enzimi vasıtasıyla H₂O₂ ile reaksiyona girerek süperoksit oluşturabilir, süperoksit ise membranlarda hasara yol açabilir.

Prostaglandin H sentaz, H₂O₂ varlığında indometazin tarafından inhibe edilmez, prostaglandin H sentazın peroksidaz aktivitesi göstermesi indometazin tarafından inhibe edilmediğine işaret eder²²⁴.

İndometazin H₂O₂ varlığında lipit peroksidasyonunu uyaracak şekilde 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 H₂O₂'in harcanması gerekir. H₂O₂, CAT enziminin substratı olduğu için CAT aktivitesinde meydana gelen artış daha fazla H₂O₂'nin suya dönüştürülmesi anlamına gelecek ve ortamda harcanacak H₂O₂ olmadığı için indometazin lipit peroksidasyonuna yönelmeyecektir. DA'yı deney hayvanlarına vermek için kullandığımız CMC'nin bu bağlamda bir etkisi olduğu düşünülebilir. Fakat DA'nın CAT ve GPx aktivitesi üzerine net bir pozitif etkisini belirleyemedik. Bu bağlamda DA'nın SOD enzimi üzerinde gösterdiği modülatör etkisi, ülser önleyici mekanizma hakkında bize yol göstermektedir. Diğer yandan özellikle LPO ve GSH miktarları üzerine DA'nın pozitif etkileri kayda değerdir.

Araştırmamızda ilginç bir şekilde CMC ile muamele edilen dokularda ki SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin pozitif yönde etkilendiği tespit edilmiştir. Pek çok etken madde ülser üzerine denenirken CMC’de çözülerek ratlara verilmiş olup^{52,225-228} araştırmaların hiçbirinde CMC’nin etkileri yalnız başına verilmediği için literatüre bağlı bir yorum yapmamız çok zor görünmektedir. Fakat CMC’nin SOD ve CAT aktivitesini artırdığı²²⁵, HO· ve O₂⁻ radikallerine karşı antioksidan aktiviteye sahip olduğu^{229,230} literatürde kayıtlıdır. Bu bağlamda deney verileri değerlendirilirken bilim adamlarının çözücü sistemlerini ayrı bir grup olarak deneye almaları gerektiği kanaatindeyiz. Bizim araştırmamızda CMC antiülserojen aktivite göstermezken antioksidan enzim aktivitelerini olumlu etkilemiştir. Bu durum İND ile oluşturulan ülserlerde bu enzimlerin etkisiz olduğunu akla getirirse de, CMC’nin H₂O₂ miktarının ayarlanmasında etkili olduğunu^{229,230} dikkate almamız gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada,

DA’nın indometazin ile oluşturulan ülseri önemli oranda önlediği belirlendi. Bulgular, DA’nın GPx, SOD aktivitesi, GSH ve LPO miktarları üzerine dokuların lehine olacak şekilde modülatör etkiye sahip olmasının ülser koruyucu ve antiülserojenik süreçte etkili olduğu şeklinde değerlendirildi. Bu çalışmada DA’nın diğer ülser modellerinde ülser önleyici ve antiülserojenik etkisi araştırılmamıştır. DA diğer ülser modellerinde denenerek ülser koruyucu ve antiülserojenik etkisi hakkında daha detaylı bilgilere ulaşılabilir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen bulguların “İND ile oluşturulan ülserlerde ROS’ların etkin rol oynadığı” hipotezini desteklediği ve antiülserojenik süreçte önemli parametreler olan “NOS, GR, MPx, PGE ve COX seviyeleri ile mide asit ve mukus salgısı üzerine etkileri de araştırılmak suretiyle DA’nın antiülserojen ilaç araştırmalarında değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

5. KAYNAKLAR

1. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Philadelphia: W.B. Saunders Co. 6th ed., 2002: 1; 604-15.
2. 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 α and neutrophils: causative relationship in indomethacin-induced stomach injuries. *European Journal of Pharmacology* 1998; 348: 257-263.
3. Sen T, A.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.
4. Wallace JL, Granger DN. Pathogenesis of NSAID gastropathy: are neutrophils the culprits? *Trends in Pharmacological Sciences.* 1992; 13: 129-131.
5. 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.
6. Davis 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.
7. Whittle BJR. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology.* 1981; 80: 81-94.
8. Kauffman G. Aspirin induced gastric mucosal injury: lessons learned from animal model. *Gastroenterology.* 1989; 96: 606-614.
9. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PD, Howley CJ. Mechanism of gastric and duodenal damage and protection. *Hepatogastroenterology.* 1992; 39 (1): 31-36.

10. Ito S, Lacy ER. Morphology of rat gastric mucosal damage, defence and restitution in the presence of luminal ethanol. *Gastroenterology*. 1985; 88: 250–260.
11. Hudson N, Everitt S, Edwards T. Elevation of gastric mucosal leukotriene B4 levels of patients on long-standing NSAID therapy. *Gastroenterology*. 1991; 100: A86.
12. Lau ATS, Graham GG, Day RO, Perry MA. Effect of aspirin on ulcer site blood flow in cat stomachs. *American Journal of Physiology*. 1992; 263 (26): G155–160.
13. 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. *Archives of Internal Medicine*. 1995; 155: 1371–1377.
14. Taha AS, Sturrock RD, Russel RI. Mucosal erosions in long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug users: predisposition to ulceration and relation to *Helicobacter pylori*. 1995; *Gut*. 36, 334–336.
15. Isenberg JI, Mc Quaid KR, Laine L, Walsh JH. Acid peptic disorders. In: Yamada, T. (Ed.), *Text Book of Gastroenterology*, 2nd ed. JB Lippincott, Philadelphia, PA. 1995; pp: 1347–1430.
16. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Rad. Biol. Med.* 1997; 23: 8-18.
17. 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.
18. 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.

19. 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
20. 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. *Journal of Gastroenterology And Hepatology*. 2001; 16: 1336–1340.
21. Alarcón de la Lastra C, Nieto A, Martín MJ, Cabré JF, Herrerías M, Motilva V. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rat: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm. Res.* 2002; 51: 051–057.
22. Itoth M, Guth PH. Role of oxygen derived free radicals in hemorrhagic shock induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology*. 1985; 88: 1165–1167.
23. Das D, Banerjee RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1993; 125: 115–125.
24. Hetil O. Mechanism of free radicals in gastrointestinal and liver diseases. *Journal of Clinical Biology*. 1993; 134: 675– 683.
25. 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. *Archivum Veterinarium Polonicum*. 1992; 32: 117–123.
26. Sandip K, Bandyopadhyay S, Pakrashi C, Pakrashi A. The role of antioxidant activity of *Phyllanthus emblica* fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 70: 171–176.
27. 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.

28. Villegas I, Martin MJ, La Casa C, Motilva V, Alarcón L. C. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. *Inflamm Res.* 2000; 49: 361–366.
29. Sánchez S, Martín MJ, Ortiz P, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Effects of dipyron on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa. Comparison with acetaminophen and diclofenac. *Dig Dis Sci.* 2001; 47:6 1389-1398.
30. Van der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Rad Biol. Med.* 1992; 12: 499–513.
31. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Iimuna 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.
32. 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.
33. Halliwell BJ, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Clarendon Press. 1989.
34. 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. Phar.* 1987; 142: 23–30.
35. 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.
36. Sakurai K, Yamasaki K. Protective effect of rebamipid against hydrogen peroxide-induced hemorrhagic mucosal lesions in rat stomach. *Jpn J. Pharm.* 1994. 64: 229– 234.

37. 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.
38. Pohle T, Brzozowski T, Becker JC, Van Der Voort IR, Markmann A, Konturek SJ, Moniczewski 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.
39. Tanaka J, Yuda Y. Lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rat. *Biol. Pharm. Bull.*, 1996. 19: 716-20.
40. Anderson D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.*, 1996. 350 (1): 103-108.
41. Bast A, Haenen GRM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.*, 1991. 91 (3): 1-13.
42. Conner, EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 1996. 12: 274-277.
43. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 1995. 33 (7): 601-617.
44. Özdemir G. Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP). Roche Bilimsel Eserler Serisi, İstanbul, 1993. S: 20-26.
45. 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. 89: 5093–5097.
46. 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.
47. Hirashi H, Terano A, Ota S *et al.* Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathion. *Gastroenterology* 1994. 106: 1199–207.
48. Strubelt O, Hoppenkamps R., Relations between gastric GSH and the ulcerogenic action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arch. Int. Pharmacodyn* 1983. 262: 268–278.
49. 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.
50. 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 sulphhydryl compounds. *Pharmacology* 1997. 54: 193–202.
51. Bjarnason I, Zanelli G, Smith T *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology* 1987. 93: 480–489.
52. Mizoguchi H, Ogawa Y, Kanatsu K, Tanaka A, Shunichi Kato And Koji Takeuchi. Protection by drugs of experimental intestinal lesions; Protective effect of rebamipide on indomethacin-induced intestinal damage in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2001. 16, 1112–1119.
53. Suleyman H, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. The antiulcerogenic effect of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *Digestion*; 2004. (Incelemede).

54. Suleyman H, Altinkaynak K, Gocer F, et al. Effect of nimesulide-on the indomethacin- and ibuprofen-induced ulcer in rat gastric tissue. *Pol J Pharmacology* 2002; 54 (3): 255-259.
55. Bilici D, Suleyman H, Banoglu ZN, et al. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci.* 2002; 47 (4): 856-861.
56. Suleyman H, Akcay F, Altinkaynak K. The effect of nimesulide on the indomethacin- and ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol. Res.* 2002; 45 (2): 155-158.
57. Banoğlu NZ, Süleyman H, Gepdiremen A. and Sadeler D. *Sophora japonica*'dan Elde Edilen Ekstrenin Stres Ülserleri Üzerine Etkileri ve Ranitidin ile Karşılaştırılması. Türk Farmakoloji Derneği-XIII. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya. 1996.
58. Ulak G, Çiçek R, Sermet A. et. al. Balık Yağının Sıçanlarda Soğuk ve İmmobilizasyon Stresinde Koruyucu Etkisi. Türk Farmakoloji Derneği-XII. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya 1994.
59. Süleyman H, Gepdiremen A, Banoğlu NZ, Sadeler D. *Sophora japonica* ekstresinin stres ülserine etkisi. *Yeni Tıp Dergisi* 1996; 13 (6): 373-374.
60. Armario A, Capmany L, Borrás M. et. al., Vitamin E supplemented diets reduce lipid peroxidation but do not alter either pituitary adrenal, glucose and lactate responses to immobilization, stress or gastric ulceration. *Free Radic. Res. Commun.* 1990; 9 (2): 113-118.
61. Gracioso JS, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS. Antiulcerogenic Effect of a Hydroalcoholic Extract and its Organic Fractions of *Neurolaena lobata* (L.). *Phytomedicine.* 2000; 7 (4): 283-289.

62. Brito ARMS, Rodriguez JA, Hiruma-Lima CA, Haun M, Nunes DS. Antiulcerogenic Activity of Trans-Dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 1998; 64 (2): 126-129.
63. Calero MJM, LaCasa C, Motilva V, Lopez A, de la Lastra CA. Healing process induced by flavonic fraction of *Bidens aurea* on chronic gastric lesion in rat. *Zeitschrift für Naturforschung C-A J. of Biosci.* 1996; 51 (7-8): 570-577.
64. Manonmani S, William S, Subramanian S. and Govindasamy S. Biochemical Evaluation of the Antiulcerogenic Effect of Cauvery-100 (an ayurvedic Formulation) in Rats. *J. Ethnopharmacol.*, 1994; 42 (1): 1-5.
65. Yesilada E, Gurbuz I, Shibata H. Screening of Turkish Anti-ulcerogenic Folk Remedies for Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 66 (3): 289-293.
66. Gurbuz I, Akyuz C, Yesilada E, Sener B. Anti-ulcerogenic Effect of *Momordica charantia* L. Fruits on Various Ulcer Models in Rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 71 (1-2): 77-82.
67. Yesilada E, Takaishi Y, Fujita T, Sezik E. Anti-ulcerogenic Effect of *Spartium junceum* flowers on in vivo Test Models in Rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 70 (3): 219-226.
68. Germano MP, Sanogo R, Guglielmo M, De Pasquale R, Crisafi G. and Bisignano G. Effects of *Pteleopsis suberosa* Extracts on experimental Gastric Ulcers and *Helicobacter pylori* Growth. *J. of Ethnopharmacol.* 1998; 59 (3): 167-172.
69. Cota RH, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. and Souza Brito AR. Anti-Ulcerogenic Mechanisms of a lyophilized Aqueous Extract of *Dalbergia monetaria* L. in Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999; 51 (6): 735-740.

70. Amosova N, Zueva EP, Razina TG, Turetskova VF, Azarova OV, Krylova SG. and Goldberg ED. The Search for new Anti-Ulcer Agents from Plants in Siberia and the Far East. *Eksp. Klin. Farmakol.* 1998; 61 (6): 31-35.
71. Souza-Formigoni ML, Oliveira MG, Monteiro MG, da Silveira-Filho NG, Braz S. and Carlini EA. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* Species in Laboratory Animals. *J. of Ethnopharmacol.* 1991; 34 (1): 21-27.
72. Tanaka S, Yoon YH, Fukui H, Tabata M, Akira T, Okano K, Iwai M, Iga Y. and Yokoyama K. Antiulcerogenic Compounds isolated from *Chinese cinnamon*. *Planta Med.* 1989; 55 (3): 245-248.
73. Suleyman H, Demirezer LO, Kuruuzum-Uz A, et al. Gastroprotective and antiulcerogenic effects of *Rumex patientia* L. extract. *Pharmazie.* 2002. 57 (3): 204-205.
74. Suleyman H, Demirezer LO, Buyukokuroglu ME, et al. Antiulcerogenic effect of *Hippophae rhamnoides* L. *Phytother. Res.* 2001; 15 (7): 625-627.
75. Aslan A. Lichens from the Regions of Artvin, Erzurum, and Kars(Turkey). *Israel Journal of Plant Sciences* 2000; 48: 143-155.
76. Aslan A. and Öztürk A. Oltu(Erzurum) Yöresine Ait Liken Florası Üzerine Çalışmalar. *Tr. J. of Botany* 1994; 18: 103-106.
77. Öztürk A. and Aslan A. Likenlerin ekonomik özellikleri ve kuzeydoğu anadolu'dan bazı liken türleri *Yüzüncü Yıl Univ. Fen-Edeb. Fak. Fen Bilimleri Dergisi* 1991; 2/2: 27-42.
78. Culberson CF. Chemical and Botanical guide to Lichen Products. The Univ. of North Carolina Press. Chapel Hill. 1969.
79. Huneck S. and Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1996.

80. Huneck S. The Significance of Lichens and Their Metabolites. *Naturwissenschaften*, 1999. 86: 559-570.
81. Tanker N, Koyuncu M. and Coşkun M. *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Basımevi-Ankara. 1998.
82. Lawrey JD. Biological Role of Lichen Substances. *The Bryologist*, 1986. 89(2): 111-122.
83. Zeybek U. and John V. Likenler(Lichenes), Kimyasal Bileşikleri ve Tıbbi Kullanımları. *Pharmacia-JTPA*, 1992; 32(1): 37-48.
84. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, Milne GWA, Proksa B. and Pommier Y. Depsides and Depsidones as Inhibitors of HIV-I İntegrase: Discovery of Novel Inhibitors Through 3D Database Searching. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 942-946.
85. Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortis A, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E. and Hidalgo ME. Activity of Compounds Isolated from Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 1997; 116: 51-55.
86. Raju KR, Appa Rao AVN. and Rao PS. Leprapinic Acid Derivates with Antibacterial Activity. *Fitoterapia*. 1985; 56: 221-226.
87. Aslan A, Güllüce M. and Ögütçü H. Bazı Likenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma. *Biyoteknoloji(Kükem) Dergisi*, 1999; 22/2: 19-26.
88. Dülger B, Gücin F. and Aslan A, *Cetraria islandica* (L.) Ach. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Tr. J. of Biology* 1998; 22: 111-118.
89. Dülger B, Gücin F, Kara A. and Aslan A. *Usnea florida*(L.) Wigg. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Tr. J. of Biology* 1997; 21: 103-108.

90. Gücin F, Dülger B. and Aslan A. *Pseudoevernia furfuracea*(L.) Zopf. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji-Çevre Dergisi* 1997; 7(25): 22-24.
91. Schindler H. Zur Geschichte der Anwendung von Flechten(Lichens) in der Medizin. *Carolina*. 1988; 46: 31-36.
92. Kumar KCS, Müller K. Lichen Metabolites. II. Antiproliferative and cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic, and Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth. *J. Nat. Prod.* 1999; 62: 821-826.
93. Demleitner S, Kraus J. and Franz G. Synthesis and Antitumor Activity of Derivates of Curdlan and Lichenan Branched at C-6. *Carbohydr. Res.* 1992; 226: 239-245.
94. Braasch J. and Jacopsen P. Flechten und Ihre Allergene. *Allergologie* 1991; 14: 99-104.
95. Huneck S. and Schreiber K. Wachstumsregulatorische Eigenschaften von Flechten- und Moos-Inhaltsstoffen. *Phytochemistry* 1972; 11: 2429-2433.
96. Lawrey JD. Lichen Secondary Compounds: Evidence for a Correspondence Between Antiherbivore and Antimicrobial Function. *Bryologist*, 1989; 92: 326-331.
97. Ingolfssdottir K, Wiedemann B, Birgisdottir M, Nenniger A, Jonsdöttir S. and Wagner H. Inhibitory Effects of Baeomycesic Acid from the Lichen "*Thamnolia subulisformis*" on 5-Lipoxygenase in vitro. *Phytomed.* 1997; 4: 125-129.
98. Matsubara H, Kinoshita K, Koyama K, Yang Y, Takahashi K, Yoshimura I, Yamamoto Y, Miura Y. and Kinoshita Y. Antityrosinase Activity of Lichen Metabolites and Their Synthetic Analogues. *J. Hattori Bot. Lab.* 1997; 83: 179-184.
99. Bironaite DA, Cenas NK, Medentsev AG, and Akimenko VK. The Inhibition of Glutathione Reductase by Quinones. *Z. Naturforsch* 1991; 46: 966-971.

100. Endo Y, Hayashi H, Sato T, Maruno M, Ohta T. and Nozoe S. Confluent Acid and 2'-O-methylperlatolic Acid, monoamine oxidase B Inhibitors in a Brazilian Plant, *Himatanthus sucuba*. *Chem. Pharm. Bull.* 1994; 42: 1198-1202.
101. Pengsuparp T, Cai L, Constant H, Fong HHS, Lin L-Z, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Cordell GA, Ingolfssdottir K, Wagner H. and Hughes SH. Mechanistic Evaluation of new Plant-Derived Compounds that Inhibit HIV-1 Reverse Transcriptase. *J. Nat. Prod.* 1995; 58:1024-1028.
102. Abo-Khatwa AN, Al-Robai AA. and Al-Jawhari DA. Lichen Acids as Uncoupler of Oxidative Phosphorylation of Mouse-Liver Mitochondria. *Natural Toxins* 1996; 4: 96-99.
103. Higuchi M, Miura Y, Boohene J, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Yoshimura Y. and Yamada Y. Inhibition of Tyrosinase Activity by Cultured Lichen Tissues and Bionts. *Planta Med.* 1993; 59: 195-199.
104. Seifert P. and Bertram C. Usnic Acid-Natural Preservation from Lichens. *Seifen Öle Fette Wachse* 1995; 121: 480-485.
105. Galun M, and Ronen R. Interaction of Lichens and Pollutants. In: Galun, M. (ed) *CRC Handbook of Lichenology, Vol-III.* CRC, Boca Raton 1988; P: 55.
106. Herzig R, Liebendörfer L, Urech M. Flechten als Bioindikatoren der Luftverschmutzung in der Schweiz: Methoden-Evaluation und Eichung mit wichtigen Luftschadstoffen. *VDI Ber.* 1987; 609: 619-625.
107. Kirschbaum U, Wirth V. *Flechten Erkennen, Luftgüte Bestimmen.* Eugen Ulmer, Stuttgart. 1995.

108. Suleyman H, Yildirim D, Aslan A, et al., An investigation of the antiinflammatory effects of an extract from *Cladonia rangiformis Hoffm.* Biol. Pharm. Bull. 2002; 25 (1): 10-13.
109. Suleyman H, Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Karagoz Y, Gocer F, Halici M, and Bayir Y. "Antiinflammatory and Antiulcer effects of aqueous extract of "*Lobaria pulmonaria*". Phytomedicine 2003; 10 (6-7): 552-557.
110. Odabaşoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Halici M, Bayir Y. Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Three Lichen Species Phytotherapy Research, 2003. (İncelemede).
111. İlçim A, Dığrak M, Bağcı E. Bazı bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Tr. J. Of. Biology 1998; 22 : 119-125
112. Güner H. Likenlerin biyolojisi ve ege bölgesinde bulunan bazı liken türleri. izmir, Ege Üniv. Fen fak. 1986; 92.
113. Öztürk Ş, Güven Ş. farklı bölgelerden toplanan liken örneği "*pseudevernia furfuracea (L.) Zopf. Var.*" 'ın antimikrobiyal etkisinin karşılaştırılması. Tr. J. Of botany, 1995; 19: 145-148,
114. Karamanođlu K. Türkiye'nin önemli liken türleri. Ankara Ecz. Fak. Mec. 1971; 1: 53-75.
115. Smith AL. Lichens. Surrey, England. The richmond publishing Co. Ltd. 1975
116. Richardson S, David L. Medicinal and other economic aspects of lichens In : M. Galun (ED) LŞ Handbook of lichenology Vol :III , England, CRC press, 1988: 93-105.
117. Harmala P, Hiltunen R, Caldentey KM, Laakso T, Kauppinen V. Isolation and in vitro cultivation of lichen alga and their antimicrobial properties, Fitoterapia, 1992; Vol: LXIII, 3.

118. Vartia KO. Antibiotics in lichens. I. *Ann-Med. ex; tl. Biol. Fenn.* 27 : 46-54. II *Ebenda.* 1950; 28 : 7-19.
119. Vartia KO. Antibiotics in lichens. In Ahmadjian, V, Hale, ME, eds. *The Lichens.* 1973: 547-561.
120. Kremer BP. Trennung und Nachwess pflanzlicher polyole. *Biologie in unserer zeit.* 1982; 12 : 91-94.
121. Chicita F, Culberson. *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products,* The University of North Carolina Press. Chapel Hill 1969: 329-331.
122. Brodo MI, Sharnoff SD, Sharnoff S. *Lichens of north amnerica,* Yale University press/New Haven and London, 1999: 721-723.
123. Brij Lal, Upreti DK. Ethnobotanical notes on three Indian lichens. *Lichenologist* 1995; 27(1): 77-79.
124. Turner NJ. *Plants in British Columbia Indian Technology.* Handbook No. 38, British Columbia Provincial Museum. 1979: 47.
125. Compton BD. 1993. Moerman, D.. 1998. *Ethnobotany of Native America.*
126. Turner NJ, Thomas J, Carlson RT. *Ethnobotany of the Nitinaht Indians of Vancouver Island.* British Columbia Prov Mus Occas. 1983; Pap. No. 24 : 165.
127. Hu S-y, Kong YC, But PPH. *An Enumeration of the Chinese Materia Medica.* The Chinese University Press, Hong Kong. 1980: 112.
128. Chopra RN, Chopra IC, Handa KL, Kapur LD. *Indigenous Drugs of India* Academic Publishers, Calcutta & New Delhi. 1958: 645.
129. Mallavadhani UV, Sudhakar AVS, Mahapatra A, Narasimhan K, Thirunavokkarasu M, Elix JA. Phenolic and steroidal constituents of the lichen *Usnea longissima*: *Biochemical Systematics and Ecology* 2004; (32): 95–97

130. Nishitoba Y, Nishimura H, Nishiyama T, Mizutani J. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry*. 1987; 26: 12 3181-3186.
131. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med* 1995; 61(2):113–115.
132. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus M.C. Milne G.W.A., Proksa B., Pommier Y., *J. Med. Chem.* 1997; (40) 942–951.
133. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K. Screening of Tissue Cultures and Thalli of Lichens and Some of Their Active Constituents for Inhibition of Tumor Promoter-Induced Epstein-Barr Virus Activation *Chem. Pharm. Bull.* 1995; (43): 1388–1390.
134. Kumar S, Muller K, Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth, *J. Of Natural Products* 1999; 62 (6): 821-823
135. Kumar S, Muller K, Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth. 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid, *Eur. J. Med. Chem.* 1999 (34): 1035–1042.
136. Guyton AC, Hall JE. *Medical Textbook Of Physiolyg* Çavuşoğlu H., *Tıbbi Fizyoloji Nobel Tıp Kitabevleri* 2001 Onuncu Edisyon 742-768
137. Mozsik G, Jovar T. Biochemical and pharmacological approach to the genesis of ulcer disease. *Dig Dis Sci.* 1988; 33: 92-105.
138. 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.

139. Terano A, Hirashi H, Ota S. and et al. Role of oxygen-derived free radicals in ethanol-induced damage in rat stomach. *Gastroenterol.* 1986; 90:1661.
140. Guidobono F, Ticozzi PC, Sibilio BF. and et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacol.* 1997; 120 : 581-586.
141. Smith GS, Mercer DW, Cross JM. and et al. Gastric injury induced by ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. *Dig Dis Sci.* 1996; 41: 1157 – 1164.
142. Stein HJ, Ghinder RA, Oosthuizen MJ. Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery.* 1990; 108: 467-474.
143. Melchiorri D, Severynek E, Reiter RJ. and et al. Suppressive effect of melatonin administration on ethanol induced gastroduodenal injury in rats in vivo. *B J P.* 1997; 121 : 264-270.
144. Szelenyi S, Brune K. Possible role of free oxygen radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci.* 1988; 33 : 865-871.
145. Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastro-intestinal mucus. *Lancet.* 1984; 1328-1329.
146. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence *Lancet.* 1994; 344: 721-724.
147. Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982; 47: 412-426.
148. Weiss JS, Lobuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest.* 1982; 47 : 5-16.

149. Stein HJ, Esplugues J, Whittle BJR. Direct cytotoxic effect of oxygen radicals on the gastric mucosa. *Surgery*. 1989; 106: 318-324.
150. Mc Cord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide; Roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol*. 1982; 60: 1346-1351.
151. Panes J, Grander DN. Neutrophils generate oxygen free radicals in rat mesenteric microcirculation after abdominal irradiation. *Gastroenterology*. 1996; 111: 981-989.
152. Smith SM, Holm-Rutili L, Michael AP. and et al. Role of neutrophils in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology* 1987; 93: 466-471.
153. Ghanayem BI, Boor PJ, Ahmed AE. Acrylonitrile-induced gastric mucosal necrosis : Role of gastric glutathione. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984; 232: 570-577.
154. Szabo S. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand J Gastroenterol*. 1987; 127: 21-28
155. Whittle BJR. Mechanism underlying gastric mucosal damage induced by indomethacin and bile-salts and the actions of prostoglandins. *B J P*. 1977; 60: 455-460
156. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Feryal Matbaacılık Sanayi ve Tic Ltd Şti. 1997; 3. Cilt, 7.Baskı : 2818-2856.
157. Ingolfssdottir K. Hjalmarsdottir MA. Sigurdsson A. et al *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolicheterinic acid from lichen *Cetraria islandica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 215-217
158. Halıcı M. Ratlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde “*Usnea longissima*” dan elde edilen su ekstresinin antiülserojenik ve bazı antioksidan enzim

aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi - Biyokimya ABD, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum, 2003.

159. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları.1995: 1-80.

160. Cadet JL. Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. *Int J Neurosci* 1988; 40: 13-18.

161. Mahadik SP, Scheffer RE. Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996; 55(1-2): 45-54.

162. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease; an overview. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 1-85.

163. Mc Cord JM. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New Eng J Med*. 1985; 312: 159-163.

164. Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Arc Biochem Biophys*. 1978; 191 : 351-357.

165. Mc Cord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J Biol Chem*. 1970; 245: 1374-1377.

166. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 - dioxygenase reaction. *J Biol Chem*. 1971; 246: 7825.

167. Egan RW, Paxton J, Kuehl FA. Mechanism for irreversible self deactivation of prostoglandin synthetase. *J Biol Chem*. 1976; 251 : 7329-7335.

168. Szabo S, Trier JS, Brown A. and et al. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology*. 1985; 88 : 228-236

169. Hemler ME, Cook HW, Lands WE. Prostoglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys.* 1979; 193: 340-345.
170. Laguercio C, Taranto D, Beneduce F. and et al. Glutathione prevents ethanol-induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut.* 1993; 34: 161-165.
171. Comporti M. Lipid Peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest.* 1985; 53: 599-622.
172. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry, Dikmen N, Özgünen T, Harper'ın Biyokimyası, İstanbul Barış kitabevi, 1998; 127-799.
173. Halliwell, B.: Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am. J. Med.* 1991; 91: 14-21.
174. Church DF, Prior WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111-126.
175. Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. *Biochem J* 1991; 277: 133-138.
176. Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vitro. 1993; 49(3): 494-505.
177. Stryer L. *Biochemistry Third Edition*, 1988; 437-439.
178. Cecil B.P. Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation and biological function *Annu.Rev.Biochem.* 1989; 58-743-64.
179. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ. *Biyokimya, Erzurum, Aktif yayınevi* 2000; 348-470.
180. Siems WG, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism, *Clin Nephrol.* 2000; 53 (Suppl. 1), 9-17

181. Montgomery R, Conway T.W, Spector AA. Biochemistry, Türkçe: Atlan N., Biyokimya - Olgu Sunumlu Yaklaşım, Ankara, Palme Yayıncılık, 2000, 84-450
182. Champe PC, Harvey RA. Lippincott's Illustrated Review, Türkçe: Tokulligil A, Dirican M, Ulukaya E. Lippincott's Illustrated Reviews serisinden Biyokimya, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1997 300-350
183. Odabaşoğlu F. Antioksidan Vitaminler, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi - Konferans Kitapçığı, Erzurum, 8 Mart 1999.
184. Bulucu D. Mide Ülserlerinde Melatonin Antioksidan Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 1998.
185. Yazıcı K, Aslan A. Lichens From The Regions Of Gümüşhane, Erzincan and Bayburt (Turkey) Cryptogamie, Mycologie 2003; 24 (2) : 287-300
186. 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(3): 287-293.
187. Aebi H. Catalase. Method Enzymol. 1984; 105: 121-126.
188. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976; 71: 952-958.
189. Sun Y, Larry WO, Ying LA. simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988; 34/3: 497-500.
190. Sedlak J, Lindsay RHL. Estimation of total, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. Anal. Biochem. 1968; 25: 192-205.
191. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351-358.

192. Fessenden RJ, Fessenden JS. Organic Chemistry, Türkçe Uyar T. Organik Kimya, Ankara, Güneş Kitapevi, 1992.
193. 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.
194. 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
195. Naito Y, Yoshikawa T, Yoshida N, Kondo M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43: 30-34.
196. Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nishimura S, Yagi N, Arai M. And Nakamura Y et al. Neutrophils, lipid peroxidation and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radic Biol Med* 1988; 24: 494-502.
197. 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.
198. 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.
199. Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand j Gastroenterol.* 1969; 4: 265-267.

200. Filaretova L, Tanaka A, Miyazowa T, Kato S, Takeuchi K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *The American Journal of Physiology* 2002; 283: 1082-1090.
201. 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.
202. 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.
203. Elliot SN, Wallace JL. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can. J. Gastroenterology.* 1998; 12: 559-568.
204. Verspaget HW, Mulder TPJ, van der Sluys Veer A, Pena AS. and Lamers CBHW. Reactive oxygen metabolites and colitis; a dsiturbed balance between damage end protection. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991; 26: 44-51.
205. Groot H. Reactive oxygen speices in tissue injury. *Hepatogastroenterology.* 1994; 41: 328-332.
206. Smith SM, Kvietys PR. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Crit Care Med.* 1988; 16: 892-898.
207. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 481-493.
208. 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.

209. Basivireddy J, Jacob M, Ramamoorthy P, Pulimood AB, Balasubramanian KA. Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65: 683-695.
210. 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.* 2002; 51: 51-57.,
211. 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.
212. Halıcı M, Odabasoglu F, Suleyman H, Aslan A, Cakır 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. 2003; 13th Balkan Biochemical Biophysical Days-KUSADASI (Poster Presentation).
213. Odabasoglu F, Suleyman H, Cakır A, Aslan A, Bayir Y, Halıcı M, Yucel O, Kazaz C, Demirceylan E. The antiulcerogenic effect of usnic acid isolated from *usnea longissima* on indomethacine-induced gastric ulcer in rats 2003; 13th Balkan Biochemical Biophysical Days-KUSADASI (Poster Presentation).
214. Franco L, Velo GP. A copper-complex reduced gastric damage caused by acetyl salicylic acid and ethanol. *Prostaglandins.* 1996; 51: 331-338.
215. Franco L, Doria D. Prostaglandins and nitric oxide in copper-complex-mediated protection against ethanol induced gastric damage. *Pharmacol Res* 1997; 30: 395-399.
216. Robert A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterology.* 1975; 69: 1045-1047.

217. Whittle BJR. Temporal relationship between COX inhibition, as measured by prostaglandin biosynthesis and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in rat. *Gastroenterology*. 1981; 80 : 94-98.
218. Takeuchi K, Takehara K, Ohuchi T. Diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor, reduces indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Digestion* 1996; 57: 201-209.
219. 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 the pathogenesis. *Jpn J Pharmacol* 1991; 57: 299-310.
220. 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
221. 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.). *Bulletin Pure and Applied Sciences*, 2001; 20B(2): 79-88.
222. Yukgunja Gamiyangsa, Shin H.M., Anti-oxidative herbs and indomethacin-induced rat gastric mucosal lesions, *American Jou. Chinese Med*. 2001; 29:101.
223. 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.
224. 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.

225. Siddiqi NJ, Puri SK, Dutta GP, Maheshwari RK, Pandey VC. Studies on hepatic oxidative stress and antioxidant defence system during chloroquine/poly ICLC treatment of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infested mice, *Molecular and cellular biochemistry* 1999; 194:179-183
226. Mega BT, Sheppard KW, Williams HL, McMillen BA. Naunyn-schmiedeberg's *Archives of Pharmacology* 2002; 366(4):319-326.
227. O'shea E, Sanchez V, Camarero J, Green AR, Colada MI. On the protection against methamphetamine-induced neurotoxicity by benzamide, a *PARP* inhibitor., *Psychopharmacology* 2003; 165:317-319.
228. Yoshida N, Sugimoto N, Ochiai J, Nakamura Y, Ichikawa H, Naito Y, Yoshikawa N. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(Suppl 2):191-197.
229. Moseley R, Walker M, Waddington RJ, Chen WYJ. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials-carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species, *Biomaterials*, 2003; 24 (9): 1549-1557.
230. Moseley R, Leaver M, Walker M, Waddington RJ, Parsons D, Chen WYJ, Embery G, Comparison of the antioxidant properties of HYAFF (R)-11p75, AQUACEL(CMC) (R) and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro, *Biomaterials*, 2002; 23 (10): 2255-2264.