

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

RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN ÜLSER
MODELİNDE “*USNEA LONGISSIMA*” DAN ELDE EDİLEN SU
EKSTRESİNİN ANTIÜLSEROJENİK VE BAZI ANTIOKSİDANT
ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

TC. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKÜMANLAMA VE KÜTÜPHANE BÖLÜMÜ

738510

138510

Mesut Bünyamin HALICI

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2003

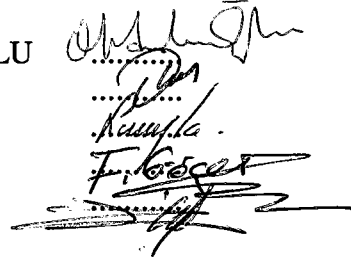
TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN ÜLSER
MODELİNDE “USNEA LONGISSIMA” DAN ELDE EDİLEN SU
EKSTRESİNİN ANTIÜLSEROJENİK VE BAZI ANTIOKSİDANT
ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mesut Bünyamin HALICI

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22 / 07 / 2003
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 07 / 08 / 2003
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU
Jüri üyesi : Prof. Dr. İrfan KÜFREVİOĞLU
Jüri üyesi : Prof. Dr. Leyla YILDIZ
Jüri üyesi : Prof. Dr. Fatma GÖÇER
Jüri üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ali ARSLAN



Enstitü Müdürü V. : Doç. Dr. Adnan TEZEL

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2003

	Sayfa No :
İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
KISALTMALAR.....	IV
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1 _GENEL BİLGİLER.....	5
1.1. LİKENLER.....	5
1.1.1. USNEA LONGISSIMA.....	8
1.2. ÜLSER.....	10
1.2.1. İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN ÜLSERLER.....	14
1.2.2. LİKENLER VE ÜLSER.....	16
1.3. ANTİOKSİDANLAR.....	16
1.3.1. SERBEST RADİKALLER.....	16
1.3.1.1. SERBEST RADİKAL ÇEŞİTLERİ.....	17
1.3.2. SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI.....	22
1.3.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ.....	27
1.3.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	31
1.3.4.1. DOĞAL (ENDOJEN) ANTİOKSİDANLAR.....	31
1.3.4.1.1. PRİMER ANTİOKSİDANLAR.....	31
1.3.4.1.1.1. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ.....	31
1.3.4.1.1.2. KATALAZ.....	32
1.3.4.1.1.3. GLUTATYON S-TRANSFERAZ.....	34
1.3.4.2. SEKONDER ANTİOKSİDANLAR.....	35
1.3.4.2. EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR.....	35
1.3.4.3. GIDA ANTİOKSİDANLARI.....	36
1.3.5. ANTİOKSİDAN ETKİ TİPLERİ.....	37
2_ MATERYAL METOD.....	38
2.1. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR.....	38
2.2. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR.....	38
2.3. DENEYLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI.....	38
2.4. DENEY BİTKİLERİ.....	41

2.5. DENEY HAYVANLARI.....	41
2.6. BİTKİ EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI.....	42
2.7. RAT'LARDA İNDOMETAZİN-ÜLSERİNİN OLUŞTURULMASI VE EKSTRELERİN VERİLMESİ.....	42
2.7.1. MİDE DOKUSUNUN MAKROSKOBİK İNCELENMESİ.....	43
2.7.2. MİDE DOKUSUNUN BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ.....	43
2.7.2.1. DOKU HOMOJENAT LARININ HAZIRLANMASI.....	43
2.7.2.2. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	44
2.7.2.3. KATALAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	45
2.7.2.4. GLUTATYON S-TRANSFERAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	46
2.8. BİTKİ EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDANT AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ.....	48
2.9. BİTKİ EKSTRAKTLARINDAKİ TOTAL FENOLİK BİLEŞİKLERİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ.....	48
2.10. BİTKİ EKSTRAKTLARININ İNDİRGEME KUVVETLERİNİN BELİRLENMESİ.....	49
2.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	50
3_BULGULAR.....	51
3.1. MAKROSKOPİK BULGULAR.....	51
3.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	54
3.2.1. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTESİ.....	54
3.2.2. KATALAZ (CAT) AKTİVİTESİ.....	56
3.2.3. GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) AKTİVİTESİ.....	58
3.3. <i>USNEA LONGISSİMA</i> 'NİN SU EKSTRESİNİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ.....	60
4_TARTIŞMA.....	62
5_KAYNAKLAR.....	72

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarımın başından sonuna kadar her türlü desteği sağlayan ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında gerek türlü zorluklara katlanarak topladığı likenlerin temininde, gerekse en bunaldığım anlarda vermiş olduğu moral destekten dolayı çok değerli hocam; sayın Yrd. Doç. Dr. Ali ASLAN 'a ve kısıtlı zamanına rağmen bu çalışmanın her anında sonsuz desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam; sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR 'a ,

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

Başkanı olduğu Farmakoloji ABD.'nin kapılarını sonuna kadar açtığı ve çalışmalarımı desteklediği için sayın Prof. Dr. Fatma GÖÇER 'e ve yardım ve alakalarını hiç eksik etmeyen tüm Farmakoloji ABD. ekibine,

Çalışmalarım esnasında gösterdikleri proje desteği ve katkılarından dolayı 'Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi' müdür ve personeline,

Yine çalışmalarım esnasında fakültemizde Dekan olarak göreve başlayıp ne yazık ki çalışmalarımın sonucunu göremeden başka önemli görevlere atanan, muhabbet ve alakalarını koparmayan hocalarım; sayın Prof. Dr. Samih BAYRAKÇEKEN ve sayın Prof. Dr. Hasan SEÇEN 'e,

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde gerçekleştirilen bu çalışmanın ortaya çıkmasında desteklerini esirgemeyen 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,

Üniversite sıralarında tanıştığımız günden beri beni asla yalnız bırakmayan, bu çalışmanın ortaya çıkmasında hem katkısı hem emeği bulunan sayın meslektaşım Yasin BAYIR 'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

KISALTMALAR

$^1\text{O}_2$: Singlet oksijen
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAT	: Katalaz
COX	: Siklooksijenaz enzimi
GAE	: Gallik Asit eşdeğeri
GI	: Gastro intestinal
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
$\text{HO}\cdot$: Hidroksil
HO_2^-	: Peroksil
IG	: İndirgeme gücü
$\text{NO}\cdot$: Nitrik oksit
NO^+	: Nitronyum iyonu
NO_2^-	: Azot protoksit
NSAID	: Steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar
NBT	: Nitro blue tetrazolium
O_2^-	: Süperoksit
PMN	: Polimorfo nükleer
PUFA	: Polidoymamış yağ asitleri (Polyunsaturated fatty acids)

RO \cdot	: Alkoksil radikalleri
ROO \cdot	: Peroksil radikalleri
ROS	: Oksijenden türevlenen serbest radikalleri
RSO \cdot	: Sülfenil
RSO $_2$ \cdot	: Tiyol peroksil
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAA	: Total antioksidan aktivite
TFB	: Toplam fenolik bileşikler
WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı



ÖZET

Bu çalışmada, ratlarda indometazin ile oluşturulan ülser modellerinde *Usnea longissima* liken türünden elde edilen su ekstresinin (*in vivo*) antiülserojen etkisi araştırıldı. İndometazin ile oluşturulan ülser modelinde, 6 adet rat'dan oluşturulmuş deney grupları kullanılarak *Usnea longissima*'nın farklı dozlardaki (50, 100 ve 200 mg/kg) su ekstresinin antiülserojen aktivitesi negatif kontrol (sadece indometazin uygulanan) ve ranitidin (pozitif kontrol) grupları ile mukayese edilerek belirlendi. *Usnea longissima*'nın su ekstresinin 100 mg/kg dozda, negatif kontrol grupları ile kıyaslandığında anlamlı bir antiülserojen aktivite gösterdiği tespit edildi. Gözlenen antiülserojen aktivite ile antioksidan savunma sistemi arasındaki ilişkiyi anlamak için, su ekstresinin total antioksidan aktivitesi tiyosiyonat metodu kullanılarak belirlendi. Antioksidan aktivite ölçümleri trolox ve askorbik asitle (pozitif kontrol) mukayese edilen *Usnea longissima*'nın su ekstresinin ılımlı bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Bunlara ilaveten, antioksidan enzim aktivitelerinin antiülserojen aktivite üzerine olan etkilerini açıklamak için, gastrik hasarlı rat mide dokularında antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon s transferaz (GST) enzimlerinin aktiviteleri belirlendi ve kontrol gruplarındaki mide dokularındaki enzim aktiviteleri ile karşılaştırıldı. İndometazin uygulanan dokularda SOD ve GST aktiviteleri kontrol (sağlıklı) gruplarına göre azalırken, CAT aktivitesi ise bunların aksine artmıştır. Bu sonuçlar, gastrik hasar oluşumunda serbest radikallerin üretildiğini ve indometazinin antioksidan savunma sisteminde önemli rol oynayan bu enzimlerin aktivitelerini olumsuz etkileyerek ülser oluşumuna katkı sağladığını göstermektedir. *Usnea longissima*'nın su ekstresi ve ranitidin ile muamele edilmiş dokularda indometazinin aksine SOD ve GST aktivitelerinin artırılması, katalaz aktivitesinin ise azaltılması gastrik mukozada üretilen reaktif oksijen (ROS) radikallerinin ülser oluşumundaki olumsuz etkilerinin azaltıldığını doğrulamaktadır.

SUMMARY

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.

In this study, the antiulcerogenic effect of water extract obtained from a lichen species, *Usnea longissima* in ulcer models induced by indomethacin was investigated, *in vivo*. In the experimental groups that consisting of 6 rats, the antiulcerogenic activity of water extract at 50, 100 and 200 mg/kg doses was determined by comparing the negative control groups (only treated with indomethacin) and ranitidine groups (positive control). 100-mg/kg dose of the water extract of *Usnea longissima* exhibited a significant antiulcerogen activity as compared to negative control groups. In order to discuss the relationship between antiulcerogen and antioxidant defence systems, total antioxidant activity of water extract of *Usnea longissima* was evaluated by using the thiocyanate method. The water extract of *Usnea longissima* showed a moderate antioxidant activity when compared with the trolox and ascorbic acids, which were used as positive antioxidant controls. In addition, the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) were determined in the gastric damaged stomach tissues of rats and compared with that of the control groups to expound the effects of antioxidant enzymes on the antiulcerogenic activity. The activities of SOD and GST in indomethacin-administrated tissues reduced, contrarily the CAT activity increased. These results suggested that free radicals are produced in the gastric mucosal damage and indomethacin also effects negatively to the activities of the enzymes, which play an important role in antioxidant defence systems. In contrast to indomethacine-administrated tissues, the increase in the activities of SOD and GST and the decrease in the activity of CAT in the water extract of *Usnea longissima* and ranitidine administrated- tissues, supports that the reduction of negative effects of reactive oxygen (ROS) radicals, produced in gastric mucosa.

GİRİŞ VE AMAÇ

Diğer tüm yaralar gibi gastrik ülser de enflamasyonla birlikte ortaya çıkar. Gastrointestinal (GI) ülserasyonda enflamatuvar cevap genellikle yıkıcıdır. Çünkü hepsi doku nekrozu ve gastrik ülserasyon patogenezinin yol açan lipit türevli eikozanoitlerin yanı sıra lokal enflamasyon aracılarının salınımlarıyla birlikte görülür. Çalışmalar parental lökotrien uygulamasının gastrik vazokonstriksiyon, vasküler permeabilitede artış, gastrik mukozada yıkım, asit ve pepsin sekresyonunda artış meydana getirdiğini göstermiştir. Ülserin midedeki defansif ve saldırgan faktörlerin etkileşim sürecindeki düzensizlikten ileri geldiği iyi bilinmektedir. Bu düzensizliğe sebep olan etmenler stres, alkol ve sigara tüketimi, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların (NSAID) yan etkileri vb. şeklinde sıralanabilir. NSAID'ların tahriş edici etkileri, enflamatuvar bozukluklardaki kullanımlarının en büyük dezavantajı olmaya devam etmektedir. NSAID-indüklemeli GI mukozal ülserasyon temel olarak sitoprotektif prostaglandinlerin eksikliğine bağlanır. Bu prostaglandinlerin eksikliği midede gastrik asitlerin, safra tuzlarının ve etanolün tahrip edici etkilerini artırır. Aspirin ve indometazin'in siklooksijenaz (COX) enzim sistemini bloke ederek antiinflamatuvar aktivite gösterdikleri düşünülmektedir. Aspirin ve indometazin gibi antiinflamatuvar ilaçların COX enzim sistemini bloke etmesi ise prostaglandin biyosentezinin baskılanması ve gastrik mukozal bariyerin bozulmasına bağlı olarak gastrik ülserasyon ile sonuçlanır. Daha önceki araştırmalarda COX enziminin engellenmesi sonucunda araziidonik 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 rapor edilmiştir¹⁻⁵.

Daha önce de belirtildiği gibi ülser midedeki defansif ve saldırgan faktörlerin etkileşimi sürecindeki düzensizlikten meydana gelmektedir. İndometazin-indüklemeli ülser oluşumunun COX inhibisyonuyla ilişkili olduğu ve COX inhibisyonunun da prostaglandin biyosentezini baskılayarak GI hasara karşı bir savunma faktörü olan mukus oluşumunu engellediği belirlenmiştir⁶⁻⁸.

İndometazin-indüklemeli mide ülserlerinin oluşum mekanizması ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır. Bunlar arasında prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışında bir azalmanın olması topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi sayılabilir⁹⁻¹³.

İndometazin gibi NSAID'lar tarafından uyarılan akut gastrik deneysel lezyonlarda oksijenden türevli serbest radikallerin (ROS) önemli rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur¹⁴⁻²⁰. Oksijen türevli radikallerin stres, etanol yada NSAID'larla oluşturulan akut deneysel gastrik lezyonların patogenezindeki rolü de çok iyi bilinmektedir^{14,21-23}. Bunun yanı sıra, insanlarda kronik ülserlerin %75-85'i *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna bağlı olup, bu bakteri polimorfik nükleer lökositlerin oksidatif baskısına yol açar. Bunun sonucunda önemli miktarda oksijen metabolitleri üretilir ve bu metabolitler ise dokuyu dejenere ederek ülsera sebep olurlar^{4,5}. Diğer birçok doku hasarı gibi gastrik ülser de süperoksit anyonlarının oluşumuyla yönlendirilir. Gastrik mukozadaki ülser formasyonunun giderilmesinde antioksidan enzimlerin koruyucu fonksiyonlarına ve karşılıklı olarak birbirlerini etkilemelerine dikkat çekilmiştir^{22,24-38}.

Hücreler ROS hasarlarını önleyebilecek veya tamir edebilecek pek çok mekanizmaya sahiptir. ROS'nin tahribatları, primer olarak enzimler [Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon S-transferaz (GST), glutasyon redüktaz

(GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx)] ve sekonder olarak da antioksidant vitaminler, glutatyon (GSH) ve birçok makro ve mikro moleküller tarafından azaltılarak serbest radikallerin hücrelerde düşük ve belirli konsantrasyonlarda tutulmaları sağlanır³⁹⁻⁴³. Şayet süperoksit (O⁻), hidroksil (HO.) ve hidrojen peroksit (HOOH) gibi ROS üyeleri aşırı üretilirse, membran lipitlerinin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve ekstraselüler matriks glikozaminoglikanlarının zarar görmesine bağlı olarak doku hasarı prosesi başlayabilir. Gastrik ülser oluşumunu tetikleyen mekanizmalardan birisinin de bu mekanizma olabileceği pek çok araştırmacı tarafında öne sürülmüştür^{14-16,19,24,30,36}. Serbest radikalleri etkisizleştiren sekonder moleküllerden GSH ise, gastro intestinal dokuları makromolekül içeren lipitlerin oksidatif hasarlarından korumada önemli görev üstlenmiştir^{16,19,36,44-46}.

Bu gün bilinen pek çok etken maddenin indometazin ile uyarılan gastrik hasar üzerine pozitif etkileri gösterilmiştir^{16,20,26-28,31,35,36,47-55}. Diğer yandan çok sayıda bitki ekstrelerinin antiülserojen etkilerinin olduğu da rapor edilmiştir⁵⁶⁻⁷³.

Likenler, mantarlar 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 azdır⁷⁴⁻⁷⁶. Likenlerin çok sayıda madde sentezlemekte oldukları ve bu maddelerin çoğunun biyolojik aktivitelere sahip oldukları tespit edilmiştir⁷⁷⁻⁸². Bu aktivitelere bir kısmı; antiviral⁸³, antibakteriyel⁸⁴⁻⁸⁹, antitümör⁹⁰⁻⁹², allerjen⁹³, bitki büyüme inhibitörü⁹⁴, antiherbivor⁹⁵, enzim inhibitörü⁹⁶⁻¹⁰² şeklinde sıralanabilir. Parfüm sanayiinde⁷⁹, kozmetik krem sanayiinde¹⁰³, hava kirliliğinin belirlenmesinde¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ faydalanılan likenler pek çok ülkede de besin olarak kullanılmaktadır⁸⁰. Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri

çok özel moleküllerden ileri gelmekte⁷⁹ 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 ekstrelerinin ve liken metabolitlerinin antiülserojen etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırmaya rastlanmıştır^{107,109}. Antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında bu çalışma ülserin önlenmesinde oksidatif süreç üzerinde likenlerin etkili olup olmadığının tespit edilmesi açısından önemli bir eksikliği tamamlayacaktır.

Bu araştırma; antioksidant potansiyele sahip olduğunu belirlenen *Usnea longissima* liken türünün antiülserojen etkisinin olup olmadığını, şayet antiülserojen etkiye sahip ise bu etkinin oksidatif süreçten nasıl etkilendiğinin ve bu liken türünün antiülserojenik potansiyelinin ilaç çalışmaları yapılabilmesi için yeterli olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. LİKENLER

Tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, dünyada ve ülkemizde çok eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (WHO) bir çok ülkedeki yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre, dünyada tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam tür sayısı 20 000 civarındadır⁷⁴⁻⁷⁶. Ülkemizde 9000'e yakın bitki türünün doğal olarak yetiştiği ve bunların kimyasal içerikleri hakkındaki çalışmaların yok denecek kadar az olduğu da vurgulanmaktadır¹¹⁰.

Bitkisel organizmalar içerisinde incelenen likenler de tıbbi özellikleri itibariyle antik çağlardan beri değerlendirilmektedir¹¹¹. Mantar (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 metabolitleri, onların en güçlü antagonistik maddelerini oluşturmaktadır. Diğer taraftan likenlerin boya ve parfümeri sanayiinde hammadde olarak^{112,113} ve hava kirliliği indikatörü olarak^{114,115} kullanıldıkları da belirtilmiştir. Her ne kadar likenlerin global krizlerde besin kaynağı olarak kullanılabilmesi teklif edilmişse de, doğal yolla üremeleri çok yavaş olduğundan, bu tür bir değerlendirmenin ekonomik olmadığı ifade edilmiştir¹¹⁶. Son yıllardaki araştırmalar, liken metabolitleri ve onların antimikrobiyal etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırmalar sonucunda 300'e yakın liken metabolitinin yapısı aydınlatılmış ve bunlardan özellikle protolikesterik asit, pulvinik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asitin en yüksek antimikrobiyal etki gösteren liken maddeleri olduğu saptanmıştır^{87,88}. Öte yandan likenlerin tıbbi önemleri

bilim adamlarının ilgisini çekmekte ve likenlerin tıbbi kullanım alanları, araştırmacıların likenler üzerinde yoğunlaşmasını sağlamaktadır.

Likenler alglerle fungus hiflerinin oluşturdukları simbiyotik birliktelikler olup belirli zamanlarda yeterli nemin bulunduğu kızılgın çöllerde, Arktik ve Antartik bölgeler ile 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 gösterdiği rapor edilmiřtir⁸².

Türkiye liken florası 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^{88,90}. İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra ilkel funguslardan elde edilen antibiyotiklerin kıtlığı, likenler üzerinde benzer araştırmaların yapılmasına yol açmıştır. Likenlerdeki bu 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 saptanmıřtır¹¹⁷.

Likenlerin en önemli özelliklerinden biri "liken maddeleri" denilen metabolik ürünler halinde kompleksleşmiş organik bileşikler üretme yeteneğidir. Bu liken maddeleri likenlerin yapısında bulunan mantar kısmından üretilir. Bu maddeler suda çözünmezler. Medulla veya kortekste mantar hiflerinin yüzeyinde kristalleşirler. Bazı liken maddeleri liken tallusunun rengini belirleyen genellikle sarı, turuncu veya kırmızı

pigmentlerdir. Bu özelliklerinden dolayı çok eski zamanlardan beri boyama amacıyla da kullanılmışlardır. Günümüzde likenlerden hala gıda, boya, ilaç, maya, deri, kozmetik ve dekorasyon endüstrilerinde faydalanılmaktadır. Bunlara ilaveten likenler, hava kirliliğinin önemli indikatörleridirler⁸⁷.

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 olmaktadır⁷⁶.

Uzun zamandır hastalıkların sağıtımında kullanılan likenlerin iyileştirici özelliklerinin, yapılarında bulunan asitlerden kaynaklandığı saptanmıştır¹¹⁸. 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 metabolitlerdir¹¹⁹. Likenlerde bulunan alifatik ve aromatik bileşikler ise sekonder metabolit ürünler olup günümüze kadar 300 'den fazla aromatik bileşiğin yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak karakterize edilmiştir^{78,79,120}.

1.1.1. *Usnea Longissima*



Usnea longissima tallusu asılı durur, oldukça uzundur. Ağaçlar üzerinde bulunur (epifit). Kirliliğe en duyarlı likenlerden biridir. Genellikle gölge ve nemli bölgeleri sever. Varlığı saf havaya delalet ettiği gibi, yokluğu da hava kalitesinin düştüğünü (Avrupa'nın büyük bölümünde olduğu gibi) gösterir. Konifer yağmur ormanları gibi

bolca bulunduğu bölgelerde geleneksel olarak çocuk bezi imalatında kullanılmıştır. Ayrıca kadınlara yönelik hijyen ürünlerinin yapımında ve çeşitli ilaçların terkininde yer almıştır. Çin ve Hindistan'da ekspektoran, Avrupa'da ise saçları güçlendirmek için kullanılmıştır¹²¹.

Hindistan'da yerliler tarafından bazen astım oluşturdıkları düşünilen yastık ve minderlerin doldurulmasında kullanılmıştır¹²². Ayrıca İngiliz Kolombiyası'nda Queen Charlotte Adaları yerlileri tarafından sıcak katranın ilaç olarak kullanılmadan önce süzülerek safsızlıklarının giderilmesi için kullanmışlardır¹²³. Yine aynı bölge yerlileri tarafından mevsimlik kamplarda hijyenik yatak olarak kullanılmıştır¹²⁴. Vancouver Adası'nın batı kıyısındaki Nitinaht yerlileri tarafından absorban özellikleri dolayısıyla bebek bezi, kadınlar için sağlık ürünleri (hijyenik ped), ve som balğının temizlenmesinde kullanılmıştır¹²⁵. Hindistan'da kemik kırıklarının tedavisinde kullanıldıkları da rapor edilmiştir¹²². Bütün bunlara ilaveten Geleneksel Çin tıbbında kullanılmıştır¹²⁶. Örneğın *Usnea longissima* telemeyi, baş dönmesini, üşümeyi, ağrıyı, balgamı önlemek amacıyla kullanılmıştır, üriner trakt içerisinde faydalıdır ve dişi genital sisteminde şişmeyi önler. Enteral olarak alınır ve ekspektoran olarak ve ülsere karşı kullanılırdı^{118,127}.

Bu likenden izole edilen bazı bileşikler (+)-usnik asit, barbatik asit, diffractaik asit, 4-O-dimetilbarbatik asid, evernik asid, β -orsinol; β -orsinolkarboksilik asid,^{128,129} ve likhenin¹²⁰ olarak sıralanabilir.

1.2. ÜLSER

Peptik ülser; travma, stres, sepsis, hemorajik şok, yanıklar, pulmoner ve karaciğer hastalıkları, rezepin, epinefrin, steroidler, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve alkol gibi iyi bilinen pek çok faktörün sebep olduğu bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık %60-80'inde etyolojik faktör bilinmemektedir¹³⁰. Etanol tüketimi erkeklerde akut gastro duodenal hasarların predispozan faktörlerinden biridir. Sıçanlarda etanol 'ün intragastrik verilışı gözle görülür histolojik gastrik mukozal hasar oluşturmaktadır¹³¹. Etanol gastroduodenal mukozaya penetre olarak membran hasarına, hücre eksfoliasyonuna ve erozyona sebep olur¹³². Mukozal permeabilededeki artışla birlikte mast hücreleri, makrofajlar ve diğer kan hücrelerinden vazoaktif ürünlerin salınımı ile vasküler hasar, nekroz ve ülsere meydana gelir^{133,134}.

Stres, etanol^{135,136}, antiinflamatuvar ilaçlar^{135,137} ve özellikle de iskemi reperfüzyon¹³⁸ ile ilişkili gastrik mukozal hasarda oksijen kökenli serbest radikaller patojen faktörler olarak kabul edilmektedirler¹³⁹. Etanolla oluşturulan gastro duodenal hasarlarda serbest radikal oluşumunun patojenik faktörlerden biri olduğu birçok araştırmacı tarafından da doğrulanmıştır^{135, 138,140, 141}.

İnsanlarda tüm aerobik hücrelerde üretilen oksijen kökenli serbest radikaller; süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil ($\cdot OH$) radikalleri ile bu radikallerin kaynakları veya ürünü olan singlet oksijen (1O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) pek çok zararlı etkiye sahiptir¹⁴²⁻¹⁴⁵. Dokularda normalde de az miktarda oluşan serbest radikallere karşı korunmak için SOD, CAT ve GPx gibi enzimler mevcuttur¹⁴²⁻¹⁴⁴. Fakat bu enzimler ekstraselüler sıvıda fazla miktarda bulunmadığı için insan ve diğer tüm memeli hücreleri in vitro olarak ekstraselüler oksijen kökenli radikallere maruz kaldığında tahrip olur. Respiratuvar 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.

Oksijen radikallerinin sebep olduğu büyük gastrik mukozal hasarların mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Oksidanlar, polidoymamış yağ asitleri, kükürt içeren amino asitli proteinler ve nükleik asitlerle kolayca reaksiyona girerler¹⁴⁴. 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 eder ve gastrik mukozayı sekonder mekanizmalar aracılığı ile de tahrip eder. Tromboksan mukozal ve submukozal damarları kontrakte ederek gastrik mukozal kan akımını durdurur¹⁴⁶.

Oksijen radikallerinin diğer bir kaynağı da polimorfo nükleer (PMN) lökosit 'lerdir. Nötrofillerin süperoksite bağlı akümülyasyonu ile nötrofil kökenli oksidanların sebep olduğu mikro vasküler rezistanstaki artış da gastrik mukozada oksijen radikallerinin sebep olduğu hasarların patojenik faktörlerinden biridir¹⁴⁵⁻¹⁴⁹.

Akut gastrik mukozal hasarların gelişmesine karşı korunmada endojen antioksidan savunma mekanizmaların oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir. Tripeptit yapısında olan glutatyon (redükte glutatyon, GSH), özellikle insan ve sıçan gastrik mukozasında yüksek konsantrasyon da bulunan endojen bir antioksidandır^{135,139,150}. Glutatyon'un doğal bir süperoksit radikali toplayıcısı olduğu ve sellüler bütünlüğün

devamı için gerekli olan protein-tiol gruplarını oksidasyona karşı koruduğu bilinmektedir¹³⁹.

Etanol, sıçanlarda nonprotein sülfidril konsantrasyonunda anlamlı bir düşme yaparak gastrik mukozal hasara sebep olmaktadır^{139,151-154}. İnsanlarda da % 80 etanol ile oluşturulan gastrik mukozal hasarın nedeninin GSH ve sistein gibi total sülfidrillerin (nonprotein-protein) antrum ve gastrik corpusta azalışı ile yakından ilgili olduğu belirtilmiştir¹⁵². Endojen sülfidril eksikliğinde gastrik mukus hücrelerinin oksijen metabolitlerine ve aside karşı hassasiyeti artmaktadır^{139,152,155-157}. Bu yüzden glutasyonun normal doku da konsantrasyonunun sabit tutulabilmesi sonucu etanolün oluşturduğu oksijen metabolitleri uzaklaştırılacak ve bu suretle mukozal hasar inhibe edilebilecektir¹⁵⁸. Ayrıca parenteral GSH'nin gastrik mukozal kan akımında artışa, mukus üretiminin stimülasyonuna veya sülfidril içeren proteazların inhibisyonuna yardım ettiği rapor edilmiştir^{132,134,159,160}. Bu yüzden endojen GSH gastrik mukozal bütünlüğün devamında önemli bir rol oynamaktadır^{151,152}.

Gastrointestinal mukusun da fizyolojik bir antioksidan olduğu düşünülmektedir. Çünkü mukus epitel hücrelerini tamamen kapatarak oksidatif hasardan korur ve ayrıca lümen ile epitel arasında fizyolojik bir bariyer oluşturur¹⁴². Mukus $\cdot\text{OH}$ radikali ve H_2O_2 ile reaksiyona girerek alttaki epitele antioksidan koruma sağlar. Ayrıca kobay gastrik musininin etkili bir hidroksil radikali toplayıcısı olduğu da belirlenmiştir¹⁶¹.

Yapı olarak birbirinden farklı pek çok kimyasal madde insanlar ve deney hayvanlarında midenin asit üreten kısmındaki mukozal epitelde hemoraji ve nekroza sebep olur. Etanol tüketimi de erkeklerde akut gastroduodenal hasarların predispozan faktörlerinden biridir. Kimlerde ve ne zaman ülser gelişeceği ve bu ülserin nerede lokalize olacağı önceden tahmin edilemez, bu sadece hayvan modellerinde veya in vitro

sistemlerde oluşturulabilir. Oysa hem ülser hastalarında hem de hayvan modellerinde tedavi evresine etki edilebilir. Genel olarak akut evrede bir ülseri nelerin aktive ettiği veya ülserin nasıl iyileşeceği bilinmektedir. Fakat maalesef kronik evrede primer ve sekonder faktörler karışıktır. Bu sebeple etyolojinin ne ile ilişkili olduğu hasarlara cevabın ne olduğunu bilmek imkansızdır.

Sıçanlara intragastrik verilen etanol ile oluşturulan gastrik mukozal lezyonlar, insanda oluşan ülseratif hastalığın hem patojenezini hem de tedavisini ortaya koymak için kullanılabilir. Hayvanlarda ayrıca aspirin, indometazin gibi antiinflamatuvar ajanlar, stres, iske-mi-reperfüzyon ile de ülser oluşturulabilir. Mukozal lezyonların patojenezinin iyi bilinmesi, ülser hastalığına başarılı bir farmakolojik yaklaşım sağlayabilir. Etiyolojik hikayenin başlangıcından itibaren yapılan tedavi ve önlemler her hastalık için en uygun müdahale şeklidir.

Etanol (%50-100) protektif ajanların varlığında bile gastrik mukozaya hızlı bir şekilde penetre olur¹⁶². Hücre ve plazma membran hasarına sebep olan etanol, sodyum ve suyun intrasellüler birikimine yol açan membran permeabilitesini de artırır. “Leakey membran” (delik membran) hücre hasarının gelişmesinde iyi bilinen bir evredir¹³². Membran permeabilitesi arttığı zaman intrasellüler ve ekstrasellüler kopartmanlar arasındaki normal elektrolit dağılımı bozulur. İntrasellüler kalsiyum birikimi gastrik mukozal hasarların patojenezinde önemli bir basamaktır. Gastrik mukozadaki bu değişiklikler hücre ölümü ve yüzeysel epitel de eksofolyasyona sebep olarak erozyon oluşturur. Lamina propriya ve submukozadaki yapılar (mast hücreleri, makrofajlar, kan damarları gibi) lüminal hasar verici ajanlara maruz kaldığında bu değişiklikler mukozal permeabilitedeki artışla sonuçlanır¹³⁴.

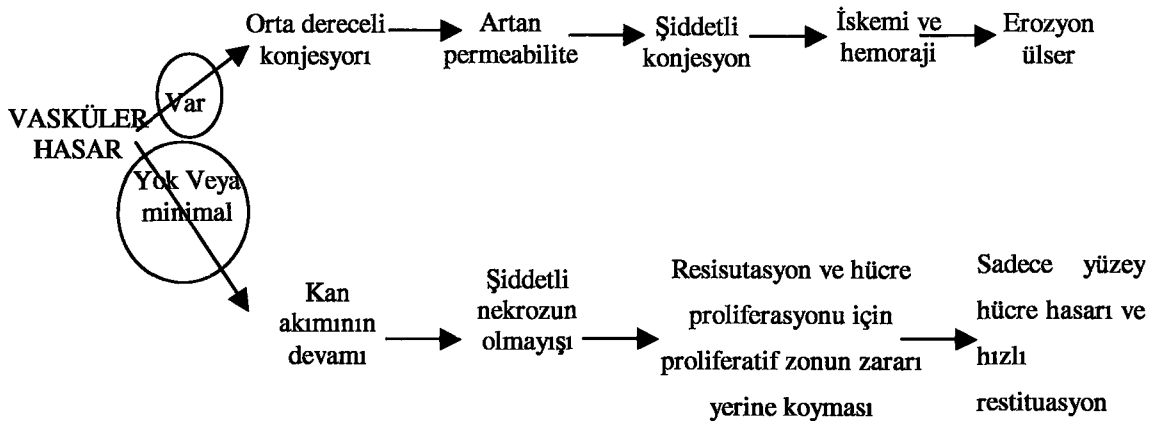
Sıçanlarda etanolün intragastrik verilişinden 1 dakika sonra vasküler hasarlar meydana gelir. Öncelikle gastrik pitlerdeki süperfisyal, subepitelyal mukozal kapillerde belirlenen vasküler lezyonların hem mukozaya penetre olan etanolün direk etkisi hem de mast hücreleri ve diğer doku veya hücrelerden (makrofaj, lökosit, trombosit gibi) vazoaaktif aminlerin salınımı ile indirek olarak oluşturulduğu belirgindir¹³⁴. Çeşitli formlardaki gastrik ülserlerde mast hücre degranülasyonunun önlenmesinin etanolün oluşturduğu gastrik erozyonları azaltacağı ileri sürülmektedir. Üstelik genetik olarak mast hücre cevabı az olan farelerde alkolün yaptığı gastrik mukozal hasar kontrolden daha azdır.

1.2.1. İndometazinle Oluşturulan Ülserler

İndometazin, diğer nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar gibi siklooksijenaz enzimini inhibe ederek prostaglandin sentezini inhibe eder. Siklooksijenaz enziminin vücutta iki izozimi vardır. Bunlar COX-1 ve COX-2 dir. Vücutta predominant olan tip COX-1 olup, fizyolojik uyarılarla aktive olan formdur. COX-1 damar endoteli, mide mukozası, böbrek, kalp ve trombositlerde bulunur. COX-2 ise 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 NSAID'lerden meloksikam, tenoksikam ve nabumeton halen tıbbi kullanımı yaygın olan ilaçlardır. Gastrik bikarbonat ve mukus sekresyonunun azalması indometazinin hasarlayıcı etkisine yardım eder. Vasküler hasar etanol veya indometazin tarafından indüklenen şiddetli gastrik mukozal lezyonların patojenezinde hız sınırlayıcı bir basamak gibi görünmektedir^{132,163}. Son zamanlarda

yapılan çalışmalarda etanol veya aspirin tarafından gastrik mukozada oluşturulan vasküler lezyonları önleyen prostaglandin analogları veya sülfidril ilaçların hemorajik erozyon ve ülserleri de yok ettiği veya bariz bir şekilde azalttığı doğrulanmıştır¹⁶⁴.

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 1). 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 etanolle 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 gösterilmektedir¹⁶⁴.



Şekil 1. Çeşitli kimyasalların oluşturduğu gastrik erozyon ve ülserlerin patojenezinde vasküler hasarın önemi

1.2.2. Likenler ve Ülser

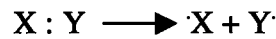
Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri çok özel moleküllerden ileri gelmekte⁷⁹ ve yapılan biyolojik aktivite ölçümlerinde liken maddelerin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmekte, üstelik bu maddelerin sitotoksik özelliklerinin az olması da ilaç özelliklerinin araştırılmasında ön planda tutulmaktadır. Likenlerin antiülserojen etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırma vardır^{107,108}. Antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında planlanan bu araştırma en azından oksidatif sürecin likenler tarafından engellenip engellenemeyeceğinin tespit edilmesi ülserin önlenmesinde önemli bir aşama olacaktır.

1.3. ANTIOKSİDANLAR

1.3.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip moleküller ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça aktiflerdir ve bu yüzden nüfuz edici özelliğe sahiptirler. Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler¹⁶⁵.

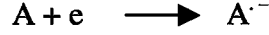
1 - Kovalent bağlı bir molekülün her bir grubunda ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik olarak bölünmesi.



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.



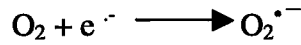
3 - Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallere iyonları ve hidroksil radikalleridir¹⁴². Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları sonucu genellikle hidroksil radikalleri meydana gelir. Oksijen 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 reaksiyona girmesini sağlar. Oksijenin son indirgenme ürünü genellikle sudur, ancak kısmi redüksiyonla çok sayıda yüksek derecede reaktif ürünler de oluşturabilmektedir.

1.3.1.1. Serbest Radikal Çeşitleri

Süperoksit Radikali : Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron olarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot -}$) meydana gelir.

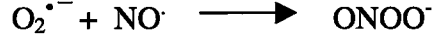


Süperoksit bir radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak zarar vermez. Süperoksitin zararlı etkileri çok iyi anlaşılmamasına rağmen, yüksek derecede toksik olduğuna dair birçok deliller vardır^{166,167}. Bununla beraber oksidatif hasarda nadiren rol alırlar, çünkü hızlı bir şekilde süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) çevrilirler. Buna ilaveten asidik durumlarda H_2O_2 ve peroksil (HO_2^{\cdot}) radikallerini üreten spontan protonasyona uğrarlar¹⁶⁷. Bu süperoksit radikallerinin asıl

zararları, hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır.



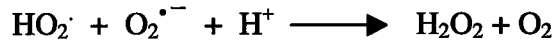
Süperoksit fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana getirir.



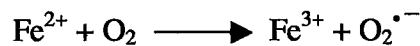
Böylece NO in normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot protoksit (NO_2^-), hidroksil radikali (OH^\bullet) ve nitronyum iyonu (NO^+) gibi başka toksik ürünlere de dönüşürler.

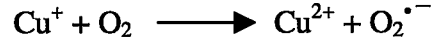
Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksil amini oksitler, nitrobluetetrazolium ve sitokrom c'yi indirger. Redüktan olarak görev yaptığında, ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir¹⁶⁵.

Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir¹⁴⁵.



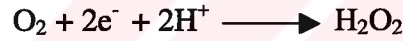
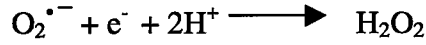
Diğerk taraftan indirgenmiş geçiş metallerinin oto oksidasyonu da süperoksit meydana getirebilmektedir¹⁴⁴.





Bu reaksiyonlar geriye dönüşlü redoks reaksiyonları olarak kabul edilmektedir ve serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir¹⁶⁸.

Hidrojen Peroksit : Asidik ortamda moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir^{145,169}.

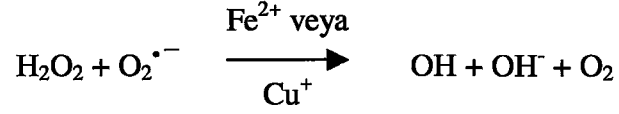


Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. Süperoksit molekülü proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar¹⁴⁴. Bu dismutasyon ya spontandır ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8 'de en hızlıdır. Süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon ise daha geniş bir pH aralığında olur.

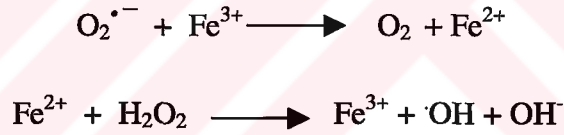


H_2O_2 kendi başına serbest radikal değildir, çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir^{166,170}. Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve

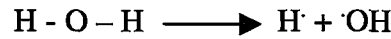
zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir¹⁴⁵.



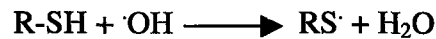
Bu reaksiyona Haber - Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber - Weiss reaksiyonu katalizör varlığında veya katalizörsüz cereyan eder. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{2+}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak "Fenton reaksiyonu" ile hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir¹³². Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir¹⁴⁴.



Hidroksil Radikali : Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir¹⁴⁵. Suyun yüksek enerjili iyonize edici reaksiyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur.



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



Meydana gelen sülfür radikali oksijenle birleşerek $RSO_2\cdot$ ve $RSO\cdot$ gibi oksisülfür radikallerini meydana getirir. Bu radikaller de biyolojik moleküllerde hasar yapıcı etkiye sahiptir.

Belki de hidroksil radikalının en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipit peroksidasyonu'nu stimüle etmesidir. 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 (1O_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 oluşur¹⁶⁵.

Diğer Radikaller : Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($R\cdot$), peroksil radikalleri ($ROO\cdot$), alkoksil radikalleri ($RO\cdot$), tiyol radikalleri ($RS\cdot$) 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 ($RSO\cdot$) veya tiyol peroksil ($RSO_2\cdot$) vb. gibi radikalleri oluşturabilirler.

1.3.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik Kaynakları :

- Aktive olmuş fagositler: (Respiratory Burst)^{144,165}.
- Antineoplastik ajanlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin
- Radyasyon ¹⁴⁸
- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular
- Çevresel ajanlar : Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksitler, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler 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, fiavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler^{169,171,172}.
- 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 olanıdır¹⁴⁴. Normalde NAD 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 (O_2^-) radikalinin üretimine sebep olur¹⁶⁹. Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksit radikali üretir. Benzer şekilde triptofan dehidrojenaz gibi enzimler de radikal oluşumuna sebep olurlar^{144,173}.

- 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 artar¹⁴⁴. Böylece NAD⁺ bağlı substratlar, süksinat, ADP 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 b₅) Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve b₅, doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları ise okside ederler.
- Peroksizomlar, oksidazlar, flavoproteinler : Peroksizomlar çok önemli hücre içi H₂O₂ 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 H₂O₂ üretimine sebep olurlar. Ancak peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir¹⁴⁴.
- Aktive olmuş fagositler: Bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksit üretirler^{145,148,149}.
- Plazma membranı : Plazma membranı serbest radikal oluşum reaksiyonlarının kritik bir bölgesidir. ekstraselüler olarak üretilen serbest radikaller diğer hücre komponentleri ile reaksiyona girmeden önce plazma membranını geçmek zorundadırlar. Bu geçiş sırasında membranda toksik maddeleri üreten reaksiyonlar başlatabilirler. Membranda yer alan ve fosfolipitler, glikolipitler, gliseridler ile sterollerin bünyesinde bulunan doymamış yağ asitleriyle okside olabilen ve amino asit içeren 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 integre sellüler metabolik proseslerin inhibisyonuna sebep olur¹⁴⁴.

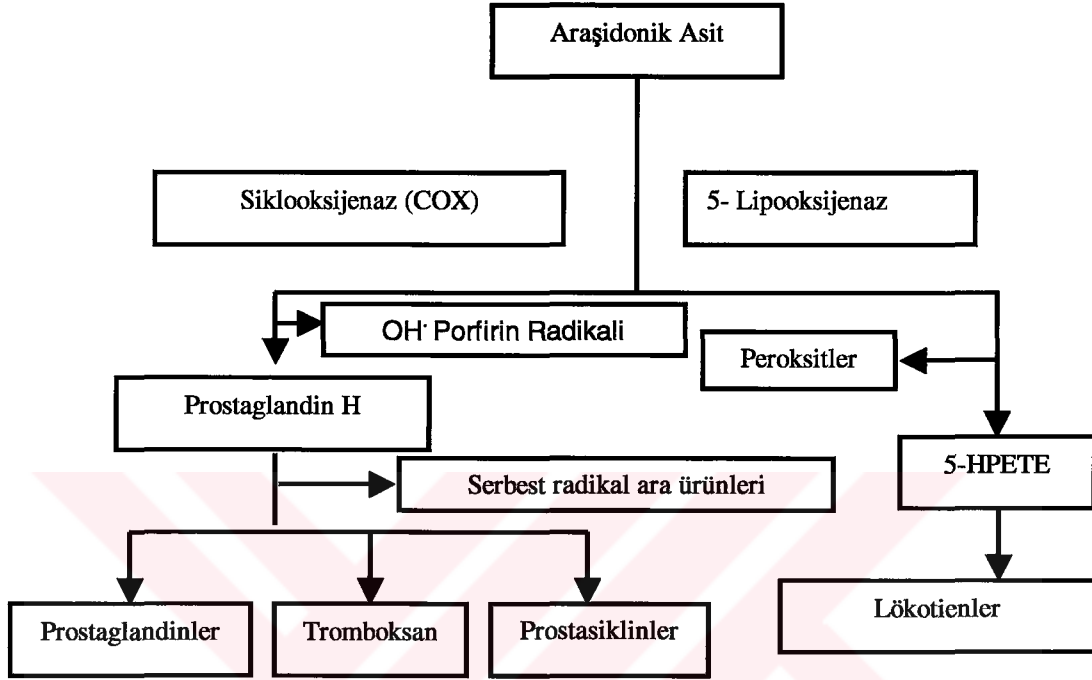
Hidrojen peroksit, membranları neredeyse su kadar kolay geçebilme özelliğine sahiptir. Saldırgan $O_2^{\bullet -}$ radikal anyonu membranları ve transmembranal anyon kanallarını geçerek hücreye girer. Aynı zamanda polianyonik hücre yüzeyi, çevre doku sıvısından 2-3 pH daha düşük olduğu tahmin edilen bir mikro çevre sağlayan çoğu çözülmüş H^+ den oluşan son derece zıt bir konsantrasyonu çeker. Bu pratik çevre $O_2^{\bullet -}$ in protonla reaksiyonu sonucu perhidroksil radikalinin oluşumunu sağlar¹⁴⁴.



$HO_2^{\bullet -}$, $O_2^{\bullet -}$ den daha güçlü bir oksidandır, bu nedenle lipitlerin ve proteinlerin hidrofobik kısımlarını daha iyi parçalayabileceği ve toksik etkilerinin 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-oksidadz aracılı üretimi, serbest radikallerin önemli bir biyolojik kaynağıdır¹⁴⁵. 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 2).

Son zamanlarda araşidonat metabolizmasında yer alan bu enzimatik proseslerin otokatalitik lipid peroksidasyonuna öncülük etmesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır¹⁴⁴.



Şekil 2. Araşidonik asit metabolizması esnasında üretilen serbest radikaller

Araşidonik asit metabolizması reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır¹⁴⁴. Araşidonik asitin biyoaktif ürünlere dönüşümü esnasında geniş spektrumlu oksijen, karbon ve hemoprotein radikalleri oluşur ve bunlar doku hasarına yol açar¹⁷⁴. 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^{134,175}.

Trombositlerde tromboksan sentezinin imidazol ve nordihidroguaiaretik asit gibi radikal toplayıcılarla inhibe edilmesi, prostaglandin endoperoksitinin tromboksanlara

dönüşümünün bir serbest radikal reaksiyonu sonucu olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir¹⁴⁴. Lipoksijenaz kaynaklı peroksitler oksidan-sensitif siklooksijenaz aktivitesini modüle edebilir¹⁷⁵. 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.

Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbirleriyle yakından ilişkilidir. 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 doğrulamaktadır¹⁶⁵.

- Hayvan hücrelerinde süperoksitin bir başka kaynağı da askorbik asit, tioller (glutasyon, sistein gibi) adrenalın ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin oto oksidasyonudur¹⁶⁵.

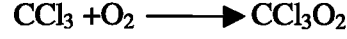
- Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon¹⁶⁵.

Hücrelerde serbest radikal üretimi bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilir¹⁶⁵.

1 - Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit¹⁵² 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 (CC₃)

serbest radikaline dönüştürülür. Bu radikalın oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de güçlü bir lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır.



3 - Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraguattır.

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

1.3.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozarlar ve hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, Lipoksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken alfa-1- antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini de inaktive ederler¹⁶⁶. Serbest radikallerin etkilerini :

Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu)

Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenmesine karşın, bunlar arasında en hassas olanı lipitlerdir. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Polidoymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve bu

otokatalitik reaksiyon sonucu lipit peroksit, lipit alkol ve aldehitler gibi istenmeyen yan ürünler oluşur^{144,176}.

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikalin etkisi sonucu membran yapısında bulunan polidoymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılmasıyla başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali kararlı değildir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dienler ve takibinde lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu da lipid peroksit radikali meydana gelir. Bu, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açar. Lipit peroksit radikalleri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak hidroperoksidlere dönüştürürler¹⁶⁵.

Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının tümüyle stimüle edilebilir ve metal varlığında katalizlenebilir¹⁴⁴.

Lipid hidroperoksidleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidlere dönüşür. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da hücrenin diğer kısımlarına yayılarak zarar verirler¹⁶⁵.

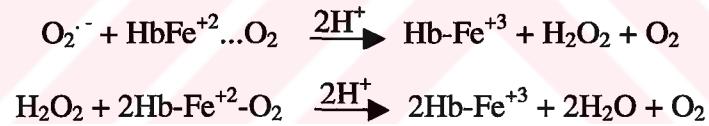
Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Bundan da membran permeabilitesi ve mikrovizkozitesi ciddi bir şekilde etkilenir.

Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin doymamış ve sülfür içeren moleküllerle olan reaktivitesi sebebiyle, triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asit içeren proteinler bu serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Bu etkilenmenin

sonucunda da sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur¹⁴⁴. Bu istenmeyen reaksiyonlar sonucu immünoglobulin G ve albümin gibi çok sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Nitekim serum proteinlerinde, kataraktlı lens proteinlerinde ve enflamatuar eklem hastalığı olan kişilerin sinoviyal sıvılarındaki IgG 'lerinde serbest radikal hasarı tespit edilmiştir¹⁶⁵.

Sitoplazmik ve membran proteinleri, ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıktan sonra çapraz bağlanarak dimerleşir veya daha büyük agregatlara dönüşür. Prolin ve lizin; süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilmektedirler¹⁶⁵. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar gören proteinlerdendir. Örneğin; oksi hemoglobinin $O_2^{\cdot -}$ veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olmaktadır^{144,145}.



Nükleik Asit ve DNA'ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksite büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonundan doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır^{143,165}. OH^{\cdot} radikalinin hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde, radyasyonun sebep olduğu hücre ölümünden büyük oranda (% 80 oranında) sorumlu bir ajan olduğu düşünülmektedir¹⁴⁴. Aktivite olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçtikten sonra hücre çekirdeğine ulaşarak DNA

hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görülebilen açık bir hedefdir. 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, ($\cdot\text{OH}$) prekürsörlerinin konsantrasyonunu azaltarak DNA'yı korur¹⁶⁵.

Karbohidratlara 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 proseslerinde de önemli rol oynarlar¹⁶⁵.

Okzalaldehyitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etkiye sahiptirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında da önemli rol oynarlar¹⁶⁵.

Serbest radikaller enflamatuar cevap ve sekonder doku hasarının modülasyonunda da önemli rol oynar. İltihap hücreleri ile ilişkili doku hasarında risk altında bulunan kollagen ve hiyaluronik asit gibi ekstraselüler doku komponentlerinin, enflamatuar osteoartrit ile etkilendikleri görülmüştür¹⁴⁴. Kıkırdak dokunun esas ögesi olan kollagen $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile hasarlanır ve jelasyonu önlenir¹⁶². SOD kollagen jelasyonunu süperoksit inhibisyonundan korur. Eklem sıvısının viskozitesinin devamı için gerekli olan hiyaluronik asit $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile depolimerize edilebilir^{162,177}. $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve OH^{\cdot} toplayıcıları süperoksit oluşturan sistemden hiyaluronik asitin depolimerizasyonunu

önler. ekstraselüler sıvının çok düşük seviyede SOD ve CAT aktivitesine sahip olması nedeniyle redükte oksijen türlerinin küçük miktarları bu bölümlerde yaygın hasara sebep olabilirler¹⁴⁴.

Revers, pasif Arthus reaksiyonunun, carragenan'le indüklenen bacak ödeminin inhibisyonu aktive olmuş lökositlere bağlı akciğer kapiller endotelial hücre hasarı ve pulmoner ödemin azalması süperoksit dismutazın antiinflamatuar etkilerinin örnekleridir^{147,156}.

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, (doğal)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. Doğal (Endojen) Antioksidanlar

1.3.4.1.1. Primer Antioksidanlar (Enzimler)

1.3.4.1.1.1. Süperoksit dismutaz : 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 CuZnSOD ile mitokondri de bulunan tetramerik Mn ihtiva eden

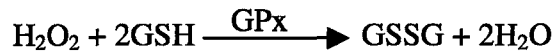
MnSOD^{143,144} izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri (FeSOD) ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunur.

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. Sitoplazmada bulunanın dışında bazı hayvanların plazmasında 130.000 Dalton molekül kütleli Cu,Zn-SOD bulunduğu tespit edilmiştir¹¹⁸. 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 molekül kütlesine sahiptir. Mitokondrial SOD hemen hemen total SOD'nin % 60 'ını içerir. Zira süperoksit sitozole göre mitokondride hemen hemen iki kat daha fazla oluşur. Tüm SOD'ler fizyolojik şartlarda süperoksite karşı etkin bir koruma sağlarlar¹⁶⁷. Her iki enzimin katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu lipid peroksidasyonunu inhibe ederek oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır^{143,144}. 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.

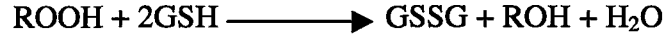
1.3.4.1.1.2. Katalaz : Doğada yaygın bir şekilde mevcut olduğu ilk defa 1901 'de O. Leew tarafından bulunmuştur. Yine ilk defa 1937'de Summer ve Dounce tarafından karaciğerden kristal formda izole edilmiştir. Molekül kütlesi 240.000 Daltondur. Dört alt üiteden oluşmuştur. Peroksizomlarda, lizozomlarda ve mitokondride bulunur. Kandaki katalaz aktivitesi büyük ölçüde eritrositlerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle insan eritrositleri katalaz yönünden çok zengindir. GPx esas olarak mitokondri ve sitozolde bulunurken, katalaz peroksizomlarda bulunur. Eritrositlerde mitokondri olmadığı halde yüksek aktivitede CAT ve GPx vardır. Katalaz 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir¹⁴³. Büyük moleküllü lipid hidroperoksidlere etki etmezken, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar¹⁶⁴.



Glutasyon peroksidaz : 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. Dominant olarak sitozolik bir enzimdir ve mitokondride düşük düzeylerde bulunur. GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin 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 peroksidlerini GSH'ı kullanarak redüksiyon yoluyla uzaklaştırır. GPx aşağıdaki reaksiyonları katalize eder¹⁴³.



GPx



Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz da (PLGPx) monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger^{143,165}. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman, PLGPx membranı peroksidasyona karşı korur.

Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazın katalizlediği aşağıdaki reaksiyon ile tekrar GSH a dönüştürülür¹⁷⁸.



1.3.4.1.1.3. Glutasyon S-transferazlar : GST 'lar başta araşidonik ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar¹⁴³.



GST 'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahip GST 'ların tüm canlı hücrelerde bulunması hayati önemlerinin bir göstergesidir. Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak, yabancı maddeleri glutatyondaki 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 'dan glutamat ve glisin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür. Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünü olan bu merkaptürik asitler safra ile atılır. Bu yol

GST 'ların kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidroforik pek çok bileşiği bağlama özellikleri bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir.

Lökotrien C₄ ün sentezi GST tarafından katalizlenmekte olup, GST'lar prostaglandin sentezinde PG izomeraz etkisine sahiptirler.

1.3.4.1.2. Sekonder Antioksidanlar (Enzim Olmayanlar)

Lipid fazda bulunanlar: α - tokoferol (E - vitamini) , β - karoten

Sıvı fazda (hücre sitozolü veya kan plazmasında) bulunanlar:

- | | | | |
|-----------------|---------------|--------------|--------------|
| - Askorbik asit | - Myoglobulin | - Melatonin | - Hemoglobin |
| - Üre | - Ferritin | - Sistein | - Metionin |
| - Seruloplazmin | - Albümin | - Laktoferin | - Bilirubin |
| - Glutatyon | | | |

1.3.4.2. Ekzojen Antioksidanlar

1. *Ksantin oksidaz inhibitörleri:* Tungsten, allopürinol, oksipürnol, folik asit, pterin aldehit

2. *Soya fasulyesi inhibitörleri:* Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.

3. *NADPH oksidaz inhibitörleri:* Adenozin lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, cetiedil, difenilin iyodoniyum

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*

1.3.4.2. Gıda Antioksidanları

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)

- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)

- Sodyum benzoat

- Etoksiguin

- Propilgalat

- Fe - süperoksit dismutaz

1.3.5. Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler¹⁶⁵.

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.



2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasallar

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

2.2. Deneyleerde Kullanılan Cihazlar

Masa santrifüjü	: Hettich-EBA 20
Soğutmalı santrifüj	: Suprafuge 22 - Heraeus Sephatech
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
Çalkalayıcı su banyosu	: Memmert
Liyofilizatör	: Labconco
Homojenizatör	: Ika-Werke
Döner Buharlaştırıcı (Evaporatör)	: BSI

2.3. Deneyleerde Kullanılan Çözeltilerin hazırlanışı

50 mM pH 7.8, %1 Triton x-100 içeren Fosfat Tamponu (CAT enziminin aktivitesini ölçmek için gereken homojenat tamponu): 1.7 g KH_2PO_4 ve 25 μl Triton x-

100 alınarak 200 ml saf suda çözüldü. pH 7.8 'e ayarlanarak son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

CAT Ölçüm Karışımı: pH 7'de 40 mM H₂O₂ içeren 50 mM Fosfat Tamponu: 1020 µl H₂O₂ ve 1.7 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözüldü ve pH 7 'e ayarlandıktan sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

50 mM pH 7.8, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu (GST ve SOD enzimlerinin aktivitesini ölçmek için gereken homojenat tampon): 1.7 g KH₂PO₄ ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü ve pH 7.8 'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

0.11 M Fosfat Tamponu (GST enziminin aktivitesini ölçmek için gereken ölçüm tamponu): 3.02 g KH₂PO₄ alınarak 75 ml saf suda çözüldü ve pH 6.5 'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı.

30 mM Glutasyon Çözeltisi (GST enziminin aktivitesini ölçmek için gereken substrat çözeltisi): 0.046 g glutasyon tartıldı ve 5 ml saf suda çözüldü.

30 mM CDNB (GST enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti): 0.03 g CDNB tartıldıktan sonra 5 ml saf etanolde çözüldü.

SOD Ölçüm karışımı:

A - 0.37 mM Ksantine: 0.0028 g Ksantine alınarak hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

B - 0.73 mM EDTA: 0.01 g EDTA alındı ve hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

C – 183.6 µM NBT (Nitro blue tetrazolium): 0.0075 g NBT alınarak 50 ml saf suda çözüldü.

D – 0.49 M Na₂CO₃ : 2.59 g alınarak 50 ml saf suda çözüldü.

E – 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartıldı ve 50 ml saf suda çözüldü.

167 U/L Xanthine oksidaz (SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti) : Orijinal ambalajından 5.65 µl alındı ve üzerine 43.4 ml (NH₄)₂SO₄ çözeltisi eklendi.

2 M Amonyum Sülfat, (NH₄)₂SO₄: (SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti): 13.2 g (NH₄)₂SO₄ alındı ve 50 ml distile suda çözüldü. (bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı ve soğuk olarak kullanıldı).

0.8 mM CuCl₂ (SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti) : 0.0108 g CuCl₂ alındı ve 100 ml distile suda çözüldü.

0.2 M Fosfat Tamponu (pH 7)., (Bitki ekstraktlarının antioksidant aktivitesini ölçmek için gereken homojenat tampon): 2,72 g KH₂PO₄ 90 ml saf suda çözüldü ve pH 7'e ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Linoleik asit çözeltisi (Bitki ekstraktlarının antioksidant aktivitesini ölçmek için gereken çözelti): 0.2804 g linoleik asit, 0.2804 g Tween 20 ve 45 ml homojenat tamponu karıştırıldı ve pH 7'e ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml'ye tamamlandı.

%30 Amonyum tiyosiyanat çözeltisi (Bitki ekstraktlarının antioksidant aktivitesini ölçmek için gerekli çözelti): 4.5 g amonyum tiyosiyanat 15 ml saf suda çözüldü.

0.02 M Fosfat Tamponu, pH 6.6 (Bitki ekstraktlarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken homojenat tampon): 2.72 g KH₂PO₄ 90 ml saf suda çözüldü ve pH 7'e ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

%1 Potasyum ferrisiyanit çözeltisi (Bitki ekstraktlarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken çözeltisi): 0.505 g potasyum ferrisiyanit 50 ml saf suda çözüldü.

%10 TCA çözeltisi (Bitki ekstraktlarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken çözeltisi): 5 g TCA 50 ml saf suda çözüldü.

% 0.1 Demir III klorür, FeCl₃, çözeltisi (Bitki ekstraktlarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken çözeltisi):0.1 g FeCl₃ 100 ml saf suda çözüldü.

% 7.5 Na₂CO₃ çözeltisi (Bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşiklerini ölçmek için gereken çözeltisi): 7.5 g Na₂CO₃ 100 ml saf suda çözüldü.

Folin Ciocalteu Çözeltisi (Bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşiklerini ölçmek için gereken çözeltisi): Orijinal ambalajdan hazır olarak kullanıldı.

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, Giresun çevresinden Haziran-Eylül aylarında muhtelif zaman aralıklarıyla Dr. Ali Aslan tarafından toplandıktan sonra uluslar arası teşhis yöntemleri kullanılarak tür teşhisi yapıldı^{74,179}. Türün herbaryum örneği Atatürk Üniversitesi-Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Herbaryumu'nda depolanmıştır.

2.5. Deney Hayvanları

Tez çalışmamız için 180-190 g ağırlıktaki toplam 36 adet erkek Wistar rat kullanılmıştır. Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi-Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilmiştir. Hayvanlar deneye alınmadan önce gruplara ayrılmış ve standart şartlar altında muhafaza edilmiştir.

2.6. Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Liken örnekleri toplandıktan sonra yabancı maddelerden temizlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuru örnekler bir havanda sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. 100 g öğütülmüş liken örneği çalkalayıcı bir su banyosunda iki gün süreyle devam ettirilerek saf su ile ekstrakte edildi (60-80 °C, 200 ml x 4). Ekstraktlar daha sonra 5 µm-Hg basınç altında liyofilize edilerek suyu uzaklaştırıldı ve (% 12,5 verimle) 12.5 g liyofilizat elde edildi. Elde edilen liyofilizatlar deneyler yapılmaya kadar -20 °C'ta muhafaza edildi.

2.7. Ratlarda İndometazin-Ülserinin Oluşturulması ve Ekstrelerin Verilmesi

İndometazin ile uyarılan gastrik hasarlı (ülserli) doku üzerine *Usnea longissima*'nın su ekstresinin antiülserojen etkilerini araştırmak üzere yapılan bu çalışma, Guidobono ve arkadaşları¹³⁷ nin yöntemi esas alınarak gerçekleştirildi. 6'şar rattan oluşturulan deney grupları bir gün süreyle aç bırakıldıktan sonra; her bir grupta bulunan ratlara sırasıyla liken ekstreleri (50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda), ranitidin (150 mg/kg) ve musluk suyu oral olarak verildikten 5 dakika sonra da indometazin (25 mg/kg) yine aynı şekilde oral yola verildi. Uygulamalardan 6 saat sonra yüksek dozda anestezi madde (thiopental sodium, 50 mg/kg) kullanılarak hayvanlar sakrifiye edildikten sonra mideleri çıkarıldı. Mideler büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandı. Makroskopik olarak mide incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı. *Usnea longissima* ekstrelerinin antiülserojen etkileri makroskopik ve biyokimyasal analizler yapılmak suretiyle belirlendi. Sonuçlar indometazin, ranitidin ve kontrol grupları ile mukayese edildi. Sağlıklı hayvan grubu kontrol grubu olarak değerlendirmeye alınacağından dolayı bu

gruba yalnızca musluk suyu verildi. Böylece sağlıklı doku (kontrol) ile ekstre, ranitidin ve indometazin verilen gruplar arasındaki korelasyonların istatistiksel olarak analizleri yapıldı.

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 milimetrik kağıt kullanılarak bir büyüteç yardımıyla belirlendi.

2.7.2. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi

Rat mideleri makroskopik olarak incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı. Dokuların enzim aktiviteleri en geç üç gün içerisinde analize alındı. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda SOD, CAT ve GST enzim aktiviteleri literatürlere dayalı olarak uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

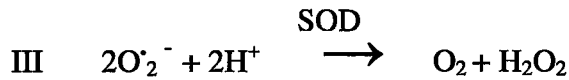
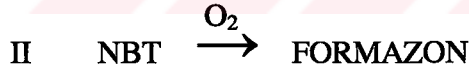
2.7.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Mide dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildikten sonra Mide dokularından 0.5 g tartılarak üzerine 4.5 ml tampon ilave edildi ve sonra da bir ultra-turraks homojenizatörde 15 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar bir süzgeç kağıdından süzildikten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4 °C'de santrifüj edildikten sonra üstte

kalan berrak kısım (süpernatant) enzim aktivitelerinin^{20,180} ve total protein düzeylerinin¹⁸¹ belirlenmesi için kullanıldı

2.7.2.2 .Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Ölçüm Prensi: 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 absorbans verir. Şayet ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H₂O₂'ye dönüştürüldüğü için formazon oluşumu azalacak buna bağlı olarak da 560 nm'de ölçülen absorbans azalacaktır. Absorbanstaki azalmanın miktarı bize SOD aktivitesini verecektir. Özetle; SOD aktivitesi aşağıda verilen II nolu reaksiyonu inhibe etme derecesiyle ölçülebilmektedir.



SOD Ölçümü: SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları (1988) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü¹⁸². Mide dokuları homojenize edildikten sonra elde edilen süpernatantlar aşağıdaki tabloda verilen miktarlarda deney tüplerine pipetlenerek 20 dakika bekletildi ve sonra CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Tabloda yer alan ölçüm karışımı;

0.37 mM Xanthine, 0.73 mM EDTA, 183.6 μ M NBT, 0.49 M Na₂CO₃, 1.2 g / L BSA (bovine serum Albumine) içerecek şekilde ayarlandı.

	KÖR	NUMUNE
Ölçüm karışımı	2.45 ml	2.45 ml
Numune	-	0.5 ml
Distile Su	0.5 ml	-
XO (Ksantin Oksidaz)	50 μ l	50 μ l
25 °C'de 20 dakika inkübasyon (numunelere XO katmak için geçen süre)		
CuCl ₂ (reaks. Sonlanır)	1 ml	1 ml

SOD Aktivitesi'nin Hesaplanması: Oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik quartz küvetler kullanılarak okundu ve geliştirilen formülden elde edilen aktivite değerleri seyreltme faktörü olan 80 katsayısı ile de çarpılıp süpernatantlardaki protein miktarına bölüldükten sonra EU/mg protein (EU/mg.doku / mg protein) olarak ifade edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekerrür yapılarak verildi.

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

2.7.2.3. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Ölçüm Prensi: Aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂'nin CAT vasıtasıyla H₂O 'ya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de ölçülmesi

esasına dayanmaktadır. Harcanan H₂O₂ miktarından CAT aktivitesi aşağıda bahsedilen yönteme göre hesaplanmıştır.

CAT Ölçümü: CAT aktivitesi, Aebi (1984) 'nin raporunda belirttiği prosedür vasıtasıyla ölçüldü¹⁸³. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H₂O₂ çözeltisinden 2 ml, son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde K-fosfat tamponu (pH = 7.8) içerisinde hazırlanan numune çözeltisinden 1 ml ilave edildi ve 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 x mm⁻¹) alınarak (Aebi, 1987) $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 240 nm'de, dakikada 1 mmol H₂O₂'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı¹⁸³. Formül pratik olarak $mmol/min = A/39,4 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. CAT aktivitesi, bulunan EÜ'leri supernatantlarda belirlenen total protein miktarına bölünerek $\mu mol \times (dakika \times mg \text{ protein})^{-1}$ olarak tarif edildi. Deneyle 3 paralel tekerrür halinde yapıldı.

2.7.2.4. Glutasyon S- Transferaz Aktivitesinin Ölçümü

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

GST Ölçümü: Rat mide dokusundan elde edilen homojenatların GST aktiviteleri Habig ve Jakoby (1981) tarafından belirtilen prosedür doğrultusunda belirlendi¹⁸⁴. Son konsantrasyonları: 0.1 M KH₂PO₄ tamponu (pH 6.5), 1 mM CDNB ve 1 mM glutasyon olacak şekilde reaktifler aşağıdaki tabloda verilen miktarlarda 3 ml'lik kuartz küvete pipetlendi. GSH katılır katılmaz küvet altüst edilerek absorbanslar 3 dakika boyunca 15 saniyede bir kaydedildi. 3 dakikalık zaman aralığındaki absorbans değişiminin lineer olduğu kısımdan dakika başına absorbans değişimi tespit edildi.

	Kör	Numune
Ölçüm Tamponu	2.7 ml	2.7 ml
Distile Su	0.1ml	-
CDNB	0.1ml	0.1ml
GSH	0.1ml	0.1ml
Numune	-	0.1ml

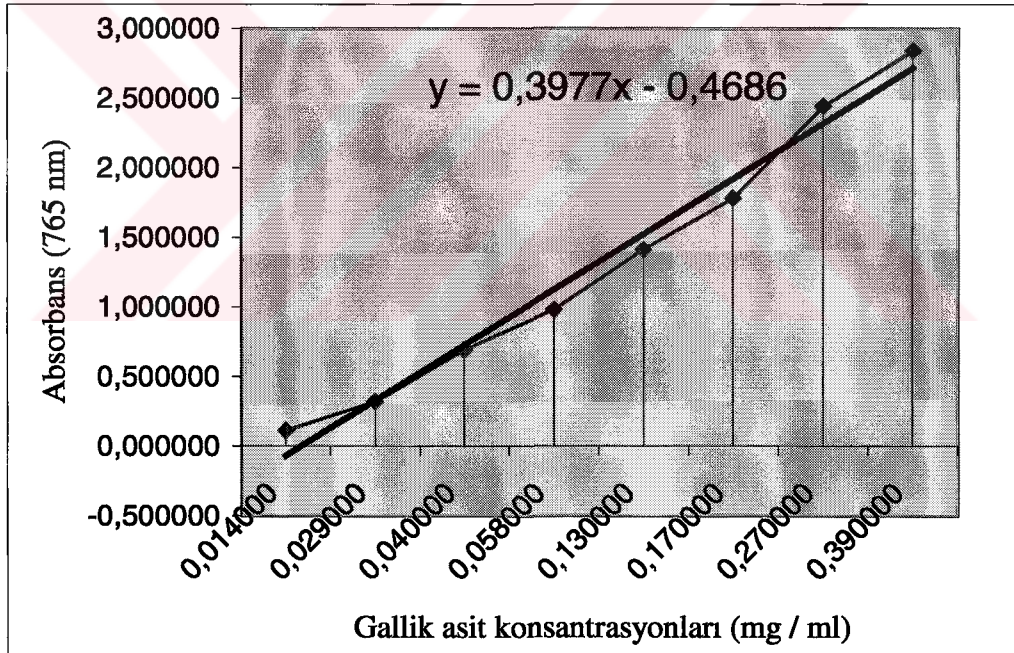
GST Aktivitesi'nin Hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans artışı olan aralıktan dakika başına absorbans azalması ile hesaplandı. Işık yolu (b)= 10 mm, ekstinksiyon katsayısı (ϵ_{CDNB})=9.6 ($\text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) alınarak $A=\epsilon.b.c$ formülünden 340 nm'de, dakikada 1 mmol konjugatın üretilmesini sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak $\text{mmol}/\text{min} = (A / 9.6) \times 300$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. GST aktivitesi, bulunan EÜ'lerinin supernatantlarda belirlenen total protein miktarına bölünerek $\text{mmol} \times (\text{dakika} \times \text{mg protein})^{-1}$ olarak tarif edildi. Her bir ölçüm 3 tekerrür halinde yapıldı.

2.8. Bitki Ekstraktının Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi

Usnea longissima'nın su ekstresinin antioksidant aktivitesi tiyosiyanat yöntemi kullanılarak Mitsuda ve ark. (1996) tarafından belirtilen prosedüre göre belirlendi¹⁸⁵. 1 mg liyofilizat 1 ml saf suda çözüldükten sonra kapaklı deney tüpü içerisinde üzerine 4 ml fosfat tamponu (0.2 M, pH 7) ve 5 ml linoleik asit çözeltisi ilave edildi ve daha sonra 37 °C'ta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun başlatılmasını müteakip her 6 saatte bir %75 etanol ve %30 amonyum tiyosiyanat çözeltilerine 0.1 ml inkübasyon karışımı ilave edilerek vortekslendi. Karışıma %35 HCl içerisinde 0.02 M FeCl₂ çözeltisi ilave edilerek absorbanlar 500 nm'de köre karşı ölçüldü. Kontrol için aynı işlemler yalnızca linoleik asitli karışımda, kör için ise 0.1 ml saf su ilave edilerek tekrarlandı. İnkübasyona kontrolün maksimum absorbansa ulaşması neticesinde son verildi. İnkübasyon karışımından her seferinde 3 tekerrür ile sonuçlar verildi.

2.9. Bitki Ekstraktındaki Total Fenolik Bileşiklerin Miktarlarının Belirlenmesi

Usnea longissima'nın su ekstresinin toplam fenolik bileşiklerinin miktarı Slinkard ve Singleton (1977) tarafından belirtilen prosedüre uygun olarak Folin-Coicalteu çözeltisi kullanılarak ölçüldü¹⁸⁶. 0.5 mg liyofilizat 0.5 ml saf suda çözüldükten sonra kapaklı deney tüpü içerisinde üzerine 2.5 ml Folin-Coicalteu çözeltisi ilave edildi ve 30 °C'ta 5 dakika inkubasyona bırakıldı. Sonra bu karışımın üzerine 2ml Na₂CO₃ ilave edilerek 30 °C'ta 90 dakika süreyle yeniden inkubasyona bırakıldı. 90. dakikanın sonunda 765 nm'de absorbanlar ölçüldü. Gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafikten de yararlanılarak sonuçlar, mg Gallik Asit ekuvalenti(GAE) / g liyofilizat şeklinde verildi.



Şekil 3. Toplam fenolik bileşiklerin miktarının belirlenmeinde kullanılan gallik asit standart grafiği

2.10. Bitki Ekstraktındaki İndirgeme Kuvvetinin Belirlenmesi

Usnea longissima'nın su ekstresinin indirgeme gücü Yen ve Chen (1977) tarafından belirtilen prosedüre uygun olarak belirlendi¹⁸⁷. 0.5 mg liyofilizat 0.5 ml saf suda çözüldükten sonra kapaklı deney tüpü içerisinde üzerine 2.5 ml fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 ml % 1'lik potasyum ferrisiyanid çözeltisi eklendikten sonra 50 °C'ta 30 dakika inkubasyona bırakıldı. % 10'luk TCA çözeltisinden 2.5 ml ilave edilip 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu karışımın üzerine 2.5 ml süpernatant alınarak üzerine 2.5 ml %0.1'lik FeCl₃ ve 2.5 ml saf su ilave edildikten sonra 700 nm'de absorbans ölçüldü. Yüksek absorbans, yüksek indirgeyici gücü temsil etmektedir.

2.11. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 9.0 software programı kullanılarak gerçekleştirildi. 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 % inhibisyon olarak ifade edilmiştir. Her deneye ait verilere ait tablonun hemen altında değişik muamele grupları arasındaki farkın daha iyi görülmesi amacıyla, verilerin ortalamalarına göre hazırlanan diyagramlar sunulmuştur.

Bulgular kısmında sunulan veriler, 3 tekerrür olarak yapılan deney sonuçlarının ortalaması \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Bütün verilere SPSS 9.0 software kullanılarak *one-way variance analyzes (ANOVA)* testi uygulandı ve $p<0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda ise *Scheffe's multiple comparison* testi uygulandı.

3.1. Makroskopik Bulgular

Altışar rattan oluşturulan deney grupları bir gün süreyle aç bırakıldıktan sonra her bir grupta bulunan ratlara sırasıyla farklı dozlarda (50, 100 ve 200 mg/kg) liken ekstreleri, ranitidin (150 mg/kg) ve musluk suyu oral olarak verildikten 5 dakika sonra da indometazin (25 mg/kg) yine aynı şekilde oral olarak verildi. Uygulamalardan 6 saat sonra yüksek dozda anestezi madde (thiopental sodium, 50 mg/kg) kullanılarak hayvanlar sakrifiye edildi ve sonra da mideleri çıkarıldı. Mide büyük kuvarturnun boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandı ve mide dokusu makroskopik olarak incelendi. Makroskopik inceleme sonuçları Tablo 1 ve Şekil 4'de sunulmuştur.

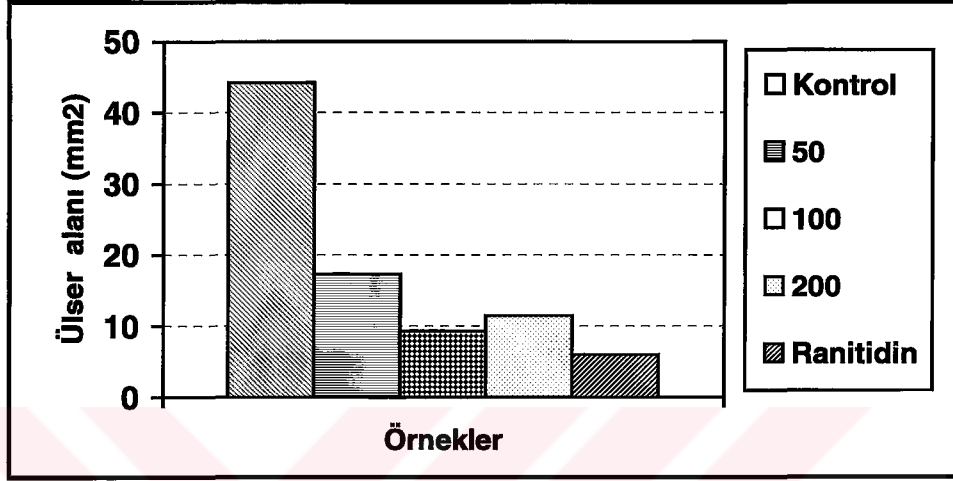
Tablo 1'den görüldüğü üzere ülser alanları indometazin ile muamele edilen kontrol grubu midelerin'de 44.17 ± 2.9 , ranitidin grubunda 6.0 ± 2.1 , *U.longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 17.33 ± 3.39 , 9.33 ± 2.16 ve 11.5 ± 1.87 olarak tespit edildi.

Tablo 1. *Usnea longissima*'nın su ekstresinin farklı dozlardaki (50, 100 ve 200mg/kg) antiülserojen aktivite ölçüm sonuçları

Örnekler	Doz (mg/kg)	N	Ülser alanı (mm ²)	% inhibisyon	p
<i>U.longissima</i>	50	6	17.33 ± 3.39	60.8	<0.05
	100	6	9.33 ± 2.16	78.9	<0.05
	200	6	11.5 ± 1.87	74.0	<0.05
Ranitidine	150	6	6.0 ± 2.10	86.4	<0.05
Kontrol	-	6	44.17 ± 2.86	-	-

Kontrol : Indometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki ülser alanları
Ranitidine : Ranitidine ile muamele edilmiş mide dokularındaki ülser alanları
N : Deneylerde kullanılan rat sayısı

Şekil 4'den de çok net bir şekilde görülebileceği üzere kontrol grubunda meydana gelen ülser uygulanan ranitidin ve *U.longissima*'nın her üç dozu vasıtasıyla önemli oranda ($p<0.05$) azaltılmıştır.



Şekil 4. Ranitidin (150 mg/kg) ve *Usnea longissima*'nın 50, 100 ve 200 mg/kg dozlardaki su ekstresinin antiülser aktivitelerinin karşılaştırılması

Kontrol'de meydana gelen ülser dikkate alındığında ranitidin % 86.4, *U.longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarının ise sırasıyla % 60.8, % 78.9 ve % 74 oranında indometazinin neden olduğu ülseri engellediği belirlenmiştir.

3.2. Biyokimyasal Bulgular

Rat mideleri makroskopik olarak incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı. Dokuların enzim aktiviteleri en geç üç gün içerisinde analize alındı. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda SOD, CAT ve GST enzim aktiviteleri literatürlere dayalı, uygun metodlar kullanılarak tespit edildi.

3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Usnea longissima 'nın su ekstresi (50, 100 ve 200 mg/kg), ranitidin, indometazin ve sağlıklı hayvan gruplarının mide dokularında belirlenen SOD aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 5'de gösterilmiştir. Tablo 3'den görüldüğü üzere SOD aktiviteleri sağlıklı hayvan grubunda 50.0 ± 0.3 , indometazin grubu midelerinde 32.1 ± 0.7 , ranitidin grubunda 51.7 ± 0.8 ve *U.longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 34.1 ± 0.0 , 44.7 ± 2.6 ve 39.5 ± 1.8 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3 ve Şekil 5'den de çok net bir şekilde görülebileceği üzere sağlıklı hayvan grubuna göre indometazinle muamele sonrası meydana gelen SOD aktivitesinde ki inhibisyon ($p < 0.05$) uygulanan ranitidin ile ortadan kaldırılmış ($p > 0.05$) ve *U.longissima*'nın her üç dozu vasıtasıyla önemli oranda ($p < 0.05$) azaltılmıştır.

Sağlıklı hayvan grupları ile mukayese edildiğinde indometazin grubunda meydana gelen SOD inhibisyonun % 35.8, ranitidin grubunda % -3.4, *U.longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırasıyla % 31.8, % 10.6 ve % 21 oranında olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3. Ranitidin (150 mg/kg), indometazin (25 mg/kg) ve *Usnea longissima*'nın farklı dozlardaki (50, 100 ve 200 mg/kg) su ekstresi ile muamele edilmiş rat midelerindeki süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri ölçüm sonuçları. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

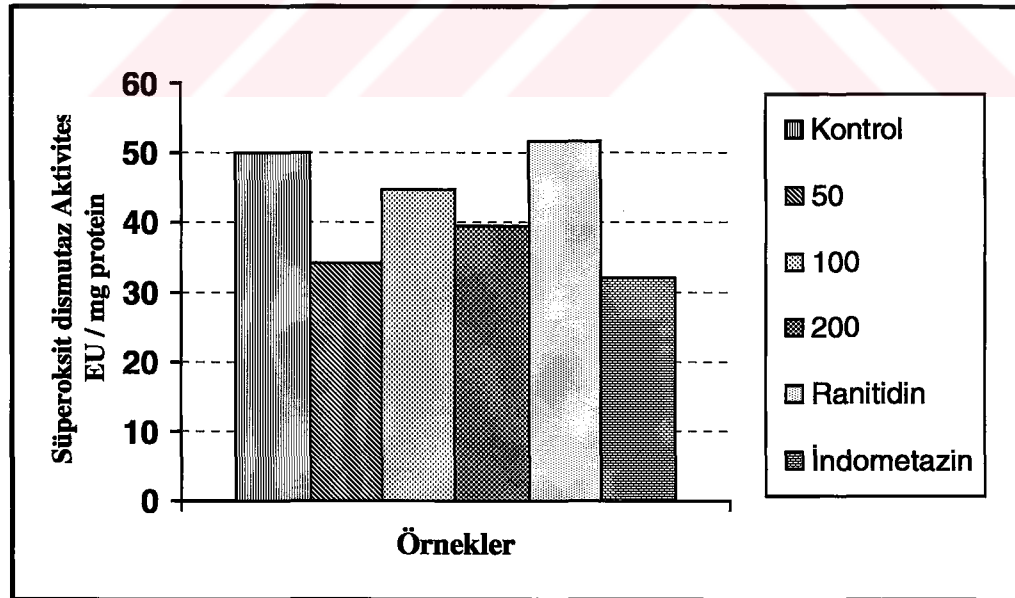
Dokular	Doz (mg/kg)	N	Süperoksit dismutaz		
			aktivitesi EU/mg protein	% Aktivite	p
<i>U.longissima</i>	50	6	34.1 \pm 0.0	31.8	<0.05
	100	6	44.7 \pm 2.6	10.6	<0.05
	200	6	39.5 \pm 1.8	21.0	<0.05
Ranitidine	150	6	51.7 \pm 0.8	-3.4	>0.05
İndometazin	25	6	32.1 \pm 0.7	35.8	<0.05
Kontrol	-	6	50.0 \pm 0.3	-	-

Kontrol: Su ile muamele edilmiş dokular

İndometazin: İndometazin ile muamele edilmiş dokular

Ranitidine: Ranitidine ile muamele edilmiş dokular

N: Deneyleerde kullanılan rat sayısı



Şekil 5. Ranitidin (150 mg/kg), indometazin (25 mg/kg) ve *Usnea longissima*'nın farklı dozlardaki (50, 100 ve 200 mg/kg) su ekstresinin rat mide dokularındaki süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi.

3.2.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi

Usnea longissima 'nın su ekstresi (50, 100 ve 200 mg/kg), ranitidin, indometazin ve sağlıklı hayvan gruplarının mide dokularında belirlenen CAT aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 6'da sunulmuştur. Tablo 4'ten görüldüğü üzere CAT aktiviteleri kontrol (sağlıklı hayvan) grubunda 34.7 ± 0.1 , indometazin grubunda 60.9 ± 1.9 , ranitidin grubunda 57.2 ± 0.3 ve *U.longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 54.6 ± 1.2 , 51.4 ± 0.1 ve 53.9 ± 0.9 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4 ve Şekil 6'dan da çok net bir şekilde görülebileceği üzere kontrol grubuna göre indometazinle muamele sonrası meydana gelen CAT aktivitesinde ki aktivasyon ($p < 0.05$) uygulanan ranitidin ($p > 0.05$) ve *U.longissima*'nın her üç dozu vasıtasıyla önemli oranda ($p < 0.05$) azaltılmıştır. Fakat kontrol seviyesine getirilememiştir.

Kontrol grupları ile mukayese edildiğinde indometazin grubunda meydana gelen CAT aktivasyonun % 74.6, ranitidin grubunda % 56.2, *U.longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırasıyla % 57.3, % 48.1 ve % 55.3 oranında azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 4. Ranitidin (150 mg/kg), indometazin (25 mg/kg) ve *Usnea longissima*'nın farklı dozlardaki (50, 100 and 200 mg/kg) su ekstresi ile muamele edilmiş rat mide dokularındaki katalaz enzim aktiviteleri ölçüm sonuçları. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

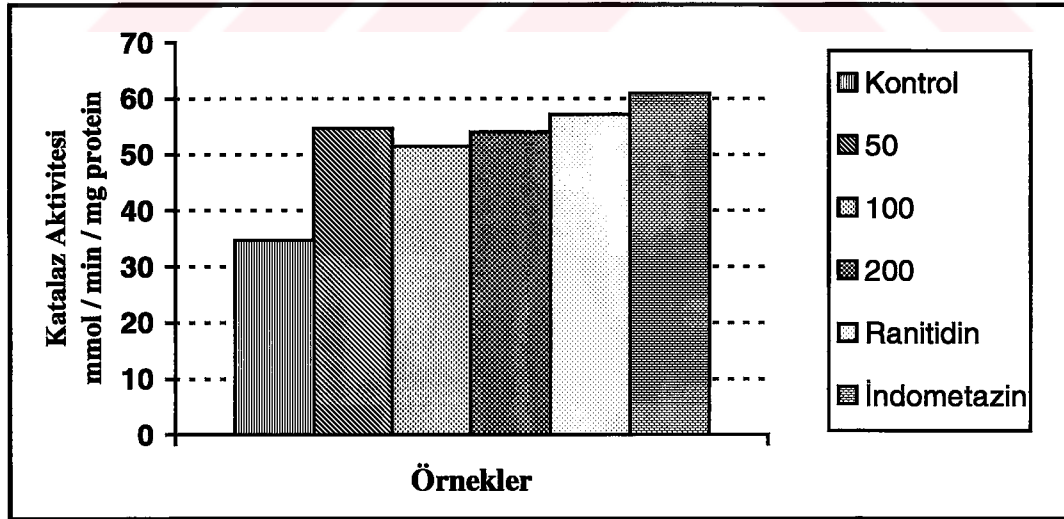
<i>Dokular</i>	<i>Doz</i> (mg/kg)	<i>N</i>	<i>Katalaz Aktivitesi</i> mmol.min ⁻¹ .mg protein ⁻¹	<i>% Aktivite</i>	<i>p</i>
<i>U.longissima</i>	50	6	54.6 \pm 1.2	157.3	<0.05
	100	6	51.4 \pm 0.1	148.1	<0.05
	200	6	53.9 \pm 0.9	155.3	<0.05
Ranitidine	150	6	57.2 \pm 0.3	156.2	<0.05
İndometazin	25	6	60.9 \pm 1.9	174.6	<0.05
Kontrol	-	6	34.7 \pm 0.1	-	-

Kontrol: Su ile muamele edilmiş dokular

İndometazin: İndometazin ile muamele edilmiş dokular

Ranitidine: Ranitidine ile muamele edilmiş dokular

N: Deneyleerde kullanılan rat sayısı



Şekil 6. Ranitidin (150 mg/kg), indometazin (25 mg/kg) ve *Usnea longissima*'nın farklı dozlardaki (50, 100 ve 200 mg/kg) su ekstresinin rat mide dokularındaki katalaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi.

3.2.3. Glutatyon S-transferaz (GST) Aktivitesi

Usnea longissima su ekstresi (50, 100 ve 200 mg/kg), ranitidin, indometazin ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GST aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 7'de verilmiştir. Tablo 5'ten görüldüğü üzere GST aktiviteleri kontrol grubunda 29.4 ± 0.3 , indometazin grubunda 25.8 ± 1.3 , ranitidin grubunda 17.4 ± 0.8 , *U.longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilmiş gruplarda ise sırası ile 28.0 ± 0.0 , 31.7 ± 1.1 ve 27.0 ± 0.5 olarak tespit edilmiştir.

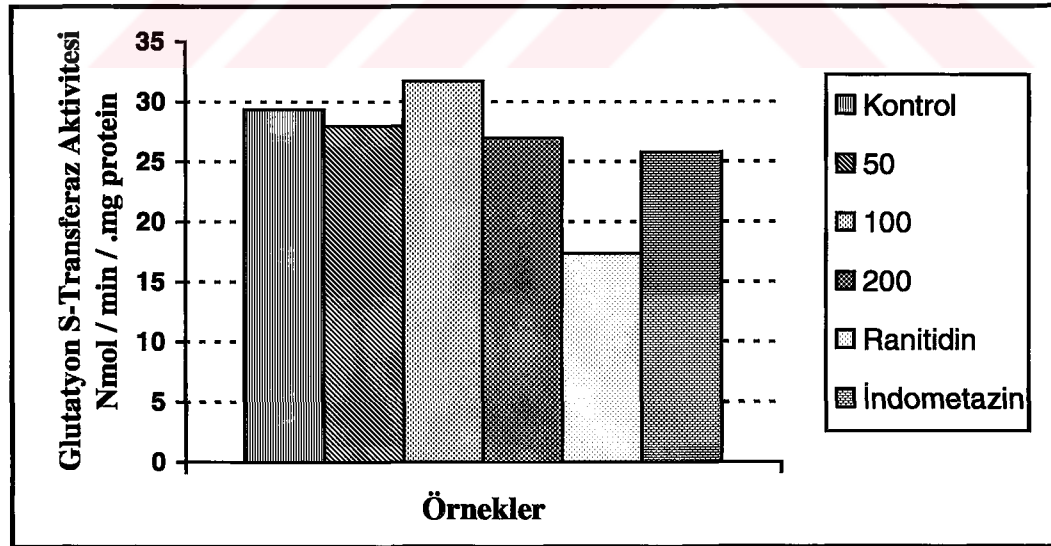
Bu sonuçlara göre kontrol grubuyla kıyaslandığında indometazinle muamele sonrası meydana gelen GST aktivitesinde ki inhibisyon uygulanan ranitidin ve *U.longissima*'nın 100 mg/kg'lık dozu vasıtasıyla önemli ($p < 0.05$) oranda artırılırken, 200 mg/kg'lık dozu vasıtasıyla da önemli ($p < 0.05$) oranda azaltılmıştır.

Kontrol grupları ile mukayese edildiğinde indometazin grubunda meydana gelen GST inhibisyonun % 12.2, ranitidin grubunda % 40.8, *U.longissima*'nın su ekstresinin 50 ve 200 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda sırasıyla % 4.8, ve % 8.2 ve 100 mg/kg dozunda ise % 7.8 civarında extra bir artış oranı gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 5. Ranitidin (150 mg/kg), indometazin (25 mg/kg) ve *Usnea longissima*'nın farklı dozlardaki (50, 100 ve 200 mg/kg) su ekstresi ile muamele edilmiş rat mide dokularındaki glutatyon S-transferaz enzim aktiviteleri ölçüm sonuçları. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Dokular	Doz (mg/kg)	N	Glutasyon S-Transferaz		
			Aktivitesi nmol.min ⁻¹ .mg protein ⁻¹	% Kontrol	p
<i>U.longissima</i>	50	6	28.0 \pm 0.0	4.8	>0.05
	100	6	31.7 \pm 1.1	-7.8	<0.05
	200	6	27.0 \pm 0.5	8.2	<0.05
Ranitidine	150	6	17.4 \pm 0.8	40.8	<0.05
İndometazin	-	6	25.8 \pm 1.3	12.2	<0.05
Kontrol	-	6	29.4 \pm 0.3	-	-

Kontrol: Su ile muamele edilmiş dokular
 İndometazin: İndometazin ile muamele edilmiş dokular
 Ranitidine: Ranitidine ile muamele edilmiş dokular
 N: Deneyleerde kullanılan rat sayısı



Şekil 7. Ranitidin (150 mg/kg), indometazin (25 mg/kg) ve *Usnea longissima*'nın farklı dozlardaki (50, 100 ve 200 mg/kg) su ekstresinin rat mide dokularındaki glutatyon S-transferaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi

3.3. *Usnea longissima*'nın Su Ekstresinin Antioksidan Özellikleri

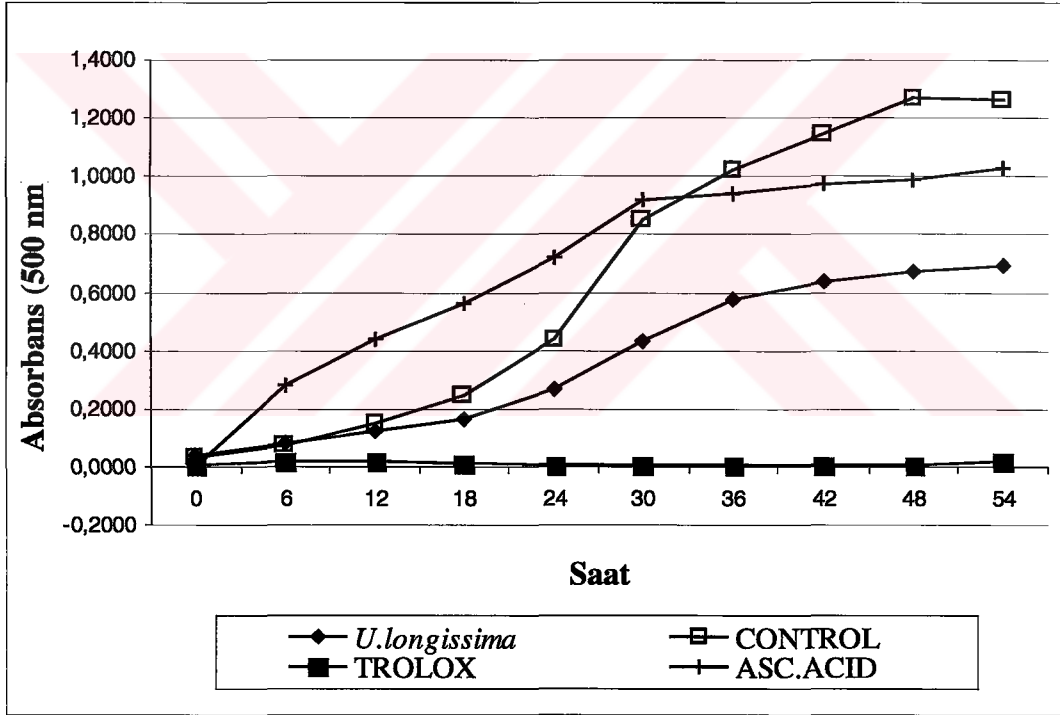
Usnea longissima'nın su ekstresinin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 8'de özetlenmiştir. TFB'ye ait sonuçlar, pozitif kontrol, troloks ve askorbik asit ile mukayese edilerek verilmiştir.

Tablo 6 ve Şekil 8'ten görülebileceği gibi *Usnea longissima*'nın su ekstresi, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla 0.671 ± 0.027 , 0.006 ± 0.001 ve 0.990 ± 0.025 olarak tespit edilmiştir. Kontrole göre karşılaştırıldığında *Usnea longissima*'nın su ekstresinin % 47.08 ve troloks'un % 99.52 peroksit inhibisyonuna sebep olması istatistiksel olarak önemlidir. ($p < 0.05$) Diğer yandan askorbik asidin peroksit oluşumu üzerine (% 22.59) inhibisyon etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur (Tablo 6).

Usnea longissima'nın su ekstresinin toplam fenolik bileşiklerinin ve indirgeme gücünün sırasıyla 18.3 ± 0.010 GAE/g liyofilizat ve 0.100 ± 0.010 (ort. Abs.) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. *Usnea longissima*'nın su ekstresinin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması. Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması (\pm standart sapma) olarak verilmiş ve $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli (*) kabul edilmiştir.

Numune	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
	48 saat sonundaki Ort. Absorbans (500 nm)	% İnhibisyon		
<i>U. longissima</i>	0.671 \pm 0.027	47.08*	0.100 \pm 0.010	18.3 \pm 0.010
Trolox	0.006 \pm 0.001	99.52*	—	—
Askorbik Asit	0.990 \pm 0.025	22.59	—	—
Kontrol	1.270 \pm 0.012	—	—	—



Şekil 8. *Usnea longissima*'nın su ekstresinin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 6 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

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. Çok sayıda madde üretmekte olan likenler pek çok yönden biyolojik aktivite gösterirler⁷⁷⁻⁸². Diğer yandan likenlerden izole edilen çok sayıda molekülün de değişik biyolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir⁷⁷⁻¹⁰³. 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. Konifer yağmur ormanları gibi bolca bulunduğu bölgelerde geleneksel olarak çocuk bezi gibi kullanılmıştır. Ayrıca kadın hijyen 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 bilinmektedir¹²¹. Bunlara ilaveten dünyanın farklı bölgelerinde, halk hekimliğinde terleme, baş dönmesi, üşüme, ağrı ve balgamın önlenmesinde, kemik kırıklarının tedavisinde¹²², hijyenik yatak yapımında¹²⁴, kadınlar için sağlık ürünleri yapımında (hijyenik ped gibi)¹²⁵, idrar yolu hastalıkları ile ülser tedavisinde^{118,126,127} kullanılmıştır. Bu çalışmada, halk hekimliğinde yaygın bir kullanıma sahip olan *Usnea longissima* deney materyali olarak seçilmiştir.

Likenlerin antiülserojen ve antioksidan etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırma vardır^{108,109}. Antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında mevcut araştırmanın bu konuda bir boşluğu dolduracağı inancını taşımaktayız. Bu amaçla, *Usnea longissima*'nın su ekstrelerinin değişik dozlarda antiülserojen etkisi, antioksidan metabolizma üzerine olan etkisi ve antioksidan aktivitesi araştırıldı. Ayrıca, enzim aktivitelerinin antiülser aktivite

mekanizması üzerine olan etkisini araştırmak için ülserli dokularda superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri ölçüldü.

Usnea longissima 'nın su ekstresinin antiülser aktivitesini belirlemek için, 6'şar rattan oluşturulan deney grupları bir gün süreyle aç bırakıldı. Daha sonra, her bir grupta bulunan ratlara sırasıyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda liken ekstresi, ranitidin (150 mg/kg) ve musluk suyu oral olarak verildikten 5 dakika sonra da indometazin (25 mg/kg) yine aynı şekilde oral olarak verildi. Bu uygulamalardan 6 saat sonra ise yüksek dozda anestezi madde (thiopental sodium, 50 mg/kg) verilen hayvanlar sakrifiye edildikten sonra mideleri çıkarıldı, büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandı ve ülserli alanların sayısı ve boyutları makroskopik olarak incelendi.

Araştırmamızda indometazin ile muamele edilen rat midelerinde meydana gelen ülserli doku hasarı (Tablo 1, Şekil 4) *Usnea longissima* 'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda sırasıyla 2.5, 4.7 ve 3.8 kat azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Dozlar arasında en etkili doz 100 mg/kg olarak uygulanan doz olmasına karşın ranitidin ile mukayese edildiğinde antiülserojen etkisi daha azdır. Fakat bu farkın 100 mg/kg doz ve ranitidin için istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

İndometazinin gastrik hasar oluşturmasının sebepleri arasında; mide dokusundaki sitoprotektif prostaglandinlerin sentezini inhibe etmesi¹⁸⁸, LPO'nu artırması¹⁸⁹⁻¹⁹⁵, doku glukoz seviyesini azaltması¹⁹⁶, MPx aktivitesini ve NOS aktivitesini artırması^{197,198} sayılabilir. İndometazinin, etanol ve diğer ajanlar ile oluşturulan mukozal hasarların reaktif oksijen molekülleri ile ilişkili olduğu da öne sürülmüştür¹⁹⁹.

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^{193,194}. Oksidatif hasar daha ileriki aşamalarda kontrol edilemeyen lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve nihayetinde de hücre ölümüne yol açabilmektedir.

Organizmalar ROS'lerin toksisitesine karşı hem enzimatik hem de enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptirler²⁰⁰⁻²⁰². ROS 'lara karşı (özellikle de $[O_2^-]$ süperoksit anyonuna karşı) savunmada önemli süpürücü enzimlerden biri de SOD 'dır. SOD 'ler (sitoplazmik Cu / Zn SOD, Mitokondrial Mn-SOD), O_2^- anyonunun H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizlerken CAT ve GPx ise H_2O_2 'in H_2O 'ya dönüşümünü katalizler²⁰³.

İndometazin ile muamele edilen mide dokularında antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, CAT ve GST) inhibe edildiği konusunda pekçok literatür kaydına rastlanmıştır^{195,204-206}.

Usnea longissima'dan elde edilen su ekstresinin halk arasında ülser tedavisinde kullanıldığına dair bilgiler literatürde kayıtlı^{117,118,127} olmasına karşın antiülserojen etki mekanizması hakkında ise herhangi bir literatür kaydı bulunamamıştır. Mevcut çalışma *Usnea longissima*'dan elde edilen su ekstresinin antiülserojen etkiye sahip olduğunu bilimsel olarak ortaya koymaktadır. Fakat etki mekanizmasının; sitoprotektif prostaglandinlerin ve bikarbonatların sentezini artırarak mı yoksa LPO 'nu azaltarak mı, ve yahut ta MPx ve NOS aktivitesini azaltarak mı etkili olduğu açıklığa kavuşturulamamıştır. Bununla beraber araştırmamızda, *Usnea longissima*'dan elde edilen su ekstresinin antioksidan sistem üzerine pozitif etkileri tespit edilmiştir. Antiülserojen etkinin ekstredeki antioksidan özelliklere sahip bileşenlerin antioksidan

enzim aktiviteleri üzerindeki pozitif etkilerinden kaynaklanabileceği kanaatindeyiz. Bu konunun aydınlatılabilmesi için ayrıntılı araştırmalarımız devam edecektir.

Araştırmamızda indometazin ile muamele edilen rat midelerinde belirlenen SOD aktivitesi (Tablo 2, Şekil 5) kontrol grubuna göre % 35.8 oranında inhibe edilmiştir ($p<0.05$). *Usnea longissima*'dan elde edilen su ekstreleri tarafından 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda ise sırasıyla % 31.8, % 10.6 ve % 21.0 oranında ($p<0.05$) SOD inhibisyonu tespit edilmiştir. Diğer yandan ranitidin ise zayıf bir aktivasyona sebep olduğu ($p > 0.05$) belirlenmiştir. Bu bulgular içerisinde dikkat çekici olan durum indometazin ile muamele edilen mide dokularında meydana gelen SOD inhibisyonu hem *U. Longissima* ekstresi tarafından hem de ranitidin tarafından aktive edilerek kontrol seviyesine yakın değerlere çıkarılmasıdır. *U. Longissima*'nın ekstreleri ile muamele edilen mideler içerisinde SOD aktivitesi üzerine en etkili dozun 100 mg/kg olduğu tespit edildi. 150 mg/kg dozda uygulanan ranitidin ile muamele edilen dokularda ise SOD aktivitesinin kontrol seviyesine ulaştığı belirlenmiş, *U. longissima*'nın 100 mg/kg'lık dozunun meydana getirdiği artış ile mukayese edildiğinde aralarındaki farkın önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

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^{195,204-206} ile uyum içerisindedir. Fakat indometazinin hangi mekanizma ile SOD aktivitesini inhibe ettiği henüz kesin olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Antioksidanların inhibisyonu ROS birikimine yol açar. ROS 'lerin üretildiği yerde SOD 'yi de içine alan antioksidanların varlığı, indometazin ile uyarılan patojenezin kontrol edilmesinde koruyucu bir faktör olarak davranır²⁰⁴. Araştırmamızda

indometazin tarafından inhibe edilen SOD aktivitesinin, *U. Longissima*'nın su ekstresinin değişik dozlarda (özellikle de 100 mg/kg'lık doz) SOD aktivitesini artırdığı ve bunun da oksidatif hasarı kısmen engelleyerek gastrik hasarın giderilmesinde rol oynadığı düşünölebilir. Zira *U. Longissima*'nın su ekstresinin antioksidan aktiviteye sahip olması ve içerdığı fenolik bileşiklerin yapısında bulunması muhtemel olan Cu, Zn ve Mn vasıtasıyla SOD 'nin aktivasyonunda pozitif yönde bir etki göstermesi mümkün olabilir. Zira Cu ve Mn kompleksleri ilavesi ile SOD aktivitesinin arttığı deneysel olarak ispatlanmıştır²⁰⁴. Diğer yandan Cu kompleksinin PGE₂ konsantrasyonunu artırdığı^{207,208}, artan prostaglandinlerin ise gastroprotektif aktiviteye katıldığı düşünölmektedir²⁰⁴. Bu bilgilere dayanarak indometazin tarafından prostaglandin sentezinin engellenerek^{204,209,210} SOD enziminin inhibe edildiğı söylenebilir.

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 bulunurlar²⁰⁴.

SOD veya SOD'ye benzer etki gösteren ajanlar tarafından süperoksitlerin elimine edilmesi, gastrik koruma prosesinde önemli bir faktördür. Nitekim etanol ile uyarılan gastrik hasarı SOD 'nin azalttığı ve serbest radikallerin gastrik mukozal hasarın patojenezine katıldığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir^{135,204}.

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 edildiğı rapor edilmiştir²¹¹. DDC 'nin bikarbonat salgılanması üzerindeki inhibisyon

etkisi SOD ilavesiyle tersine döndürülebilir²¹². Bu bilgilerden yola çıkarak SOD bikarbonat salgılanması prosesinde de rol aldığı söylenilebilir.

Bütün bu verilerden yola çıkarak *U. Longissima*'nın su ekstresinin antiülserojen aktivite göstermesinde, SOD aktivitesini artırmasının önemli bir paya sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Kontrol ve muamele gruplarında tespit edilen CAT aktiviteleri (Tablo 3, Şekil 6) *Usnea longissima*'nın su ekstresinin 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında sırasıyla 54.6±1.2, 51.4±0.1 ve 53.9±0.9, ranitidin de 57.2±0.3 ve indometazinde ise 60.9±1.9 oranında bulunmuştur. Kontrol grubu midelerinde belirlenen CAT aktivitesi ise 34.7±0.1'dir. Bu bilgilerden de anlaşılacağı üzere, tüm muameleler CAT aktivitesini artırmıştır. Kontrole göre belirlenen tüm aktivite artışları istatistiksel olarak ($p<0.05$)'da önemli bulunmuştur. Sonuçların da gösterdiği gibi indometazin tarafından artırılan CAT aktivitesi verilen üç farklı dozdaki ekstreler tarafından bir miktar düşürülmüştür, üstelik ekstre dozlarının ranitidinden daha etkin olarak CAT aktivitesi üzerinde etki gösterdiği ve en etkili dozun da 100 mg/kg olduğu tespit edilmiştir.

Mide dokusunda indometazin vasıtasıyla CAT aktivitesinin artırıldığı literatürlerde belirtilmiştir^{195,213}. Bizim bulgularımızda da indometazin tarafından CAT aktivitesinin artırıldığı tespit edilmiştir. CAT ve GPx enzimleri H₂O₂'yi H₂O'ya dönüştürerek zayıf radikalik etkisini ortadan kaldırır. Çünkü H₂O₂ 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 oldukça önemlidir.

İndometazin vasıtasıyla oluşturulan gastrik hasarın en önemli sebebi olarak prostaglandin sentezinin engellenmesi gösterilmektedir^{188,204,209,210}. 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 gözardı edilmemelidir²¹⁴. 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 eder²¹⁵.

İndometazin H₂O₂ varlığında lipit peroksidasyonunu uyuracak 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.

Bu açıdan değerlendirme yapılacak olursa *Usnea longissima*'nın su ekstresi ile muamele sonrasında mide dokularında CAT enziminin aktivitesinin artırılması gastrik hasarın azaltılması anlamına gelebilir.

Araştırmamızda kontrol grubunda ki GST aktivitesi 29.4 ± 0.3 olup, indometazin ile muamele edilen grupta 25.8 ± 1.3 'lük seviyeye düştüğü, ranitidin grubunda ise aktivite azalmasının 17.4 ± 0.8 ile maksimum olduğu tespit edilmiştir. *Usnea longissima*'nın su ekstreleri 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda sırasıyla 28.0 ± 0.0 ($p > 0.05$), 31.7 ± 1.1 ($p < 0.05$) ve 27.0 ± 0.5 ($p < 0.05$)'lik değerler elde edilmiş ve 50 mg/kg'lık doz ile 200 mg/kg'lık dozlar önemli oranda bir aktivite artışı sağlamıştır. Diğer yandan dikkat çekici olarak 100 mg/kg'lık doz indometazin tarafından inhibe edilen GST aktivitesini kontrol seviyesinin üzerine kadar artırmıştır. Bu sonuçlar *Usnea longissima*'dan elde edilen su ekstresinin GST aktivitesi üzerinde önemli oranda etkin olduğunu göstermektedir.

Çeşitli bitki kaynaklı koruyucu kimyasal bileşenlerin lipid peroksidlerinin seviyesini ayarladıkları rapor edilmiştir. Bu koruyucu kimyasal ajanların çoğu GSH ve GSH-bağlı enzimlerin konsantrasyonunu artırarak etki gösterirler²¹⁶⁻²¹⁸. Diğer yandan bazı kemopreventif ajanların çeşitli dokularda GSH ve GSH-bağlı enzimleri uyardığı da belirlenmiştir²¹⁹. Özellikle GP_x ve GST gibi faz II enzimlerinin uyarıcıları potansiyel kemopreventif ajanlar olarak düşünülmektedir²²⁰. Çeşitli dokulardaki GSH ve GSH-bağlı enzimler (GP_x, GST ve GGT) antioksidan ve detoksifikasyon özelliklerinden dolayı kemoprevensiyon biomarkırları olarak dikkate alınırlar^{221,222}.

Bu açıdan bakıldığında, GST aktivitesinde meydana getirdiği artış nedeniyle *Usnea longissima*'dan elde edilen su ekstresine, potansiyel bir kemopreventif ajan

gözüyle bakılabilir. Ekstrenin bu etki gücü muhakkak ki bileşiminde ki bazı maddelerle ilgilidir. (+)-Usnik asit, barbatik asit, diffractaik asit, 4-O-dimetilbarbatik asit, evernik asit, β -orsinol; β -orsinolkarboksilik asit,^{128,129} likenin¹²⁰ gibi bazı bileşikler *Usnea longissima*'dan izole ve karakterize edilmişlerdir. Ne yazık ki bu bileşiklerin metabolik etkileri ile ilgili çok az sayıda kayıt mevcut olup bulgularımızı mukayese edecek çalışmaları ilerideki araştırmalarımızda üretebileceğimizi ümid ediyoruz.

Usnea longissima'nın su ekstresinin TAA'si; troloksun ve askorbik asit'in standartlarına karşı ölçülmüş TAA'leri sırasıyla 0.671 ± 0.027 , 0.006 ± 0.001 ve 0.990 ± 0.025 olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan, ekstrenin TFB ve İG'lerinin de sırasıyla 18.3 ± 0.010 GAE/g liyofilizat ve 0.100 ± 0.010 (ort. Abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *Usnea longissima*'nın su ekstresinin ılımlı düzeyde TAA'ya sahip olduğunu ve bu aktivitenin önemli bölümünün ihtiva ettiği fenolik bileşiklerden ileri geldiğini işaret etmektedir.

Usnea longissima'nın su ekstresinin TAA, TFB ve İG değerlerinin yüksek oluşu antioksidan potansiyelinin güçlü olduğuna işaret etmektedir.

Bir çok hastalığın önlenmesinde antioksidanlar önemlidir. Biomedikal bilimdeki son gelişmeler, bazı hastalıklardaki serbest radikal (süperoksit , hidroksil radikali-OH[.], singlet oksijen v.b.) içeriğine dikkat çekmektedir. Serbest radikaller biomembranlardaki doymamış yağ asitlerine saldırarak membranlardaki lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Lipid peroksidasyonu ise membran geçirgenliğinde azalma, enzim ve reseptör aktivitesinde azalma ve hücre inaktivasyonuna neden olan membran proteini hasarını meydana getirir²²³⁻²²⁴. Serbest radikallerin DNA'ya saldırması durumunda da kansere neden olan mutasyonlar meydana gelebilir. Bu nedenle, serbest radikal zincir reaksiyonlarını bloke eden antioksidantları belirlemek önemlidir²²⁵⁻²²⁷. Antioksidan

aktivite bugüne kadar pekçok tıbbi önemi olan bitkide belirlenmiştir²²⁸. Likenlerde antioksidan aktivitelerin belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça sınırlı olup ilk yapılan literatür taramalarında yalnızca iki çalışmaya rastlanmıştır^{229,230}. *Usnea longissima*'nın su ekstresinin TAA, TFB ve İG değerlerinin yüksek oluşu da antioksidan potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Mevcut bulgulara dayanarak *Usnea longissima*'nın antiülserojenik etkisinde antioksidan potansiyelin de etkili olduğu kanaatini taşımaktayız.

Sonuç olarak bu çalışmada,

- 1- *Usnea longissima*'nın su ekstresinin indometazin ile oluşturulan ülseri önemli oranda önlediği,
- 2- *Usnea longissima*'nın su ekstresinin, antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine dokuların lehine olacak şekilde modülatör etkiye sahip olduğu,
- 3- *Usnea longissima*'nın su ekstresinin orta düzeyde antioksidan potansiyele ve indirgeme gücüne sahip olduğu ve bu potansiyelin önemli bir kısmının yapısındaki fenolik bileşiklerden kaynaklandığı; antiülserojenik süreçte *Usnea longissima*'nın su ekstresinin bu antioksidan özelliklerinin de etkili faktörler olduğu tespit edildi.
- 4- Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen bulguların “İndometazin ile oluşturulan ülserlerde ROS'ler etkin rol oynadığı” hipotezini desteklediği ve antiülserojenik süreçte önemli parametreler olan “NOS, MPx, COX, GSH, GR ve LPO” seviyelerinin de araştırılmak suretiyle *Usnea longissima*'nın antiülserojen ilaç araştırmalarında değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Sen T, Abdul Salam CA, Pal S, Sen S, Chaudhuri AKN. Effect of dothiepin on gastric ulceration mediated by lipid derived eicosanoids. *Life Sciences*. 2000; 66 (23): 325-330.
3. Wallace JL, Granger DN. Pathogenesis of NSAID gastropathy: are neutrophils the culprits? *Trends in Pharmacological Sciences*. 1992; 13: 129-131.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Kauffman G. Aspirin induced gastric mucosal injury: lessons learned from animal model. *Gastroenterology*. 1989; 96: 606-614.
8. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PD, Howley CJ. Mechanism of gastric and duodenal damage and protection. *Hepatogastroenterology*. 1992; 39 (Suppl. 1): 31-36.

9. Ito S, Lacy ER. Morphology of rat gastric mucosal damage, defence and restitution in the presence of luminal ethanol. *Gastroenterology*. 1985; 88: 250–260.
10. Hudson N, Everitt S, Edwards T. Elevation of gastric mucosal leukotriene B4 levels of patients on long-standing NSAID therapy. *Gastroenterology*. 1991; 100: A86.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biol. Med.* 1997; 23: 8-18.
16. 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.
17. 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.

18. 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
19. 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.
20. 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.
21. Itoth M, Guth PH. Role of oxygen derived free radicals in hemorrhagic shock induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology*. 1985; 88: 1165–1167.
22. Das D, Banerjee RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1993; 125: 115–125.
23. Hetil O. Mechanism of free radicals in gastrointestinal and liver diseases. *Journal of Clinical Biology*. 1993; 134: 675– 683.
24. 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.
25. 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.
26. 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.

27. Villegas I, Martín MJ, La Casa C, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. *Inflamm Res.* 2000; 49: 361–366.
28. Sánchez S, Martín MJ, Ortiz P, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Effects of dipyrrone on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa. Comparison with acetaminophen and diclofenac. *Dig Dis Sci.* 2001; (in press.)
29. Van der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Rad Biol. Med.* 1992; 12: 499–513.
30. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Inuma S et al. 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.
31. 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.
32. Halliwell BJ, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Clarendon Press. 1989.
33. Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 1987; 142: 23–30.
34. 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.

35. Sakurai K, Yamasaki K. Protective effect of rebamipid against hydrogen peroxide-induced hemorrhagic mucosal lesions in rat stomach. *Jpn J. Pharmacol.*, 1994. 64: 229–234.
36. 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.
37. 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.
38. Tanaka J, Yuda Y. Lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rat. *Biol. Pharm. Bull.*, 1996. 19: 716-20.
39. Anderson D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.*, 1996. 350 (1): 103-108.
40. Bast A, Haenen GRM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.*, 1991. 91 (3): 1-13.
41. Conner, EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 1996. 12: 274-277.
42. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 1995. 33 (7): 601-617.
43. Özdemir G. Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP). Roche Bilimsel Eserler Serisi, İstanbul, 1993. S: 20-26.

44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Strubelt O, Hoppenkamps R., Relations between gastric GSH and the ulcerogenic action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1983. 262: 268–278.
48. 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.
49. 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.
50. Bjarnason I, Zanelli G, Smith T *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology*, 1987. 93: 480–489.
51. Hiroyuki Mizoguchi, Yoshihiro Ogawa, Kenji Kanatsu, Akiko Tanaka, Shinichi 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.
52. 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*; 2003. (İncelemede).
53. Suleyman H, Altinkaynak K, Gocer F, et al. Effect of nimesulide-on the indomethacin- and ibuprofen-induced ulcer in rat gastric tissue. *Pol J Pharmacol*, 2002. 54 (3): 255-259.
54. 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.
55. 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.
56. 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.*
57. 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.*
58. Süleyman H, Gepdiremen A, Banoğlu NZ, Sadeler D. *Sophora japonica* ekstresinin stres ülserine etkisi. *Yeni Tıp Dergisi*, 1996. 13 (6): 373-374.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.

67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Tanaka S, Yoon YH, Fukui H, Tabata M, Akira T, Okano K, Iwai M, Iga Y. and Yokoyama K. Antiulcerogenic Compounds isolated from *Chinase cinnamon*. *Planta Med.*, 1989. 55 (3): 245-248.
72. Suleyman H, Demirezer LO, Kuruuzum-Uz A, et al. Gastroprotective and antiulcerogenic effects of *Rumex patientia* L. extract. *Pharmazie*, 2002. 57 (3): 204-205.
73. Suleyman H, Demirezer LO, Buyukokuroglu ME, et al. Antiulcerogenic effect of *Hippophae rhamnoides* L. *Phytother. Res.* 2001. 15 (7): 625-627.
74. Aslan A. Lichens from the Regions of Artvin, Erzurum, and Kars(Turkey). *Israel Journal of Plant Sciences*, 2000. 48: 143-155.
75. Aslan A. and Öztürk A. Oltu(Erzurum) Yöresine Ait Liken Florası Üzerine Çalışmalar. *Tr. J. of Botany*, 1994. 18: 103-106.

76. 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.
77. Culberson CF. *Chemical and Botanical guide to Lichen Products*. The Univ. of North Carolina Press. Chapel Hill. 1969.
78. Huneck S. and Yoshimura I. *Identification of Lichen Substances*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1996.
79. Huneck S. *The Significance of Lichens and Their Metabolites*. *Naturwissenschaften*, 1999. 86: 559-570.
80. Tanker N, Koyuncu M. and Coşkun M. *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Basımevi-Ankara. 1998.
81. Lawrey JD. *Biological Role of Lichen Substances*. *The Bryologist*, 1986. 89(2): 111-122.
82. Zeybek U. and John V. *Likenler(Lichenes), Kimyasal Bileşikleri ve Tıbbi Kullanımları*. *Pharmacia-JTPA*, 1992. 32(1): 37-48.
83. 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 Integrase: Discovery of Novel Inhibitors Through 3D Database Searching*. *J. Med. Chem.*, 1997. 40: 942-946.
84. 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.

85. Raju KR, Appa Rao AVN. and Rao PS. Leprapinic Acid Derivates with Antibacterial Activity. *Fitoterapia*, 1985. 56: 221-226.
86. Aslan A, Güllüce M. and Öğütçü H. Bazı Likenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma. *Biyoteknoloji(Kükem) Dergisi*, 1999. 22/2: 19-26.
87. Dülger B, Gücin F. and Aslan A, *Cetraria islandica* (L.) Ach. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Tr. J. of Biology*, 1998. 22: 111-118.
88. Dülger B, Gücin F, Kara A. and Aslan A. *Usnea florida*(L.) Wigg. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Tr. J. of Biology*, 1997. 21: 103-108.
89. Gücin F, Dülger B. and Aslan A. *Pseudoevernia furfuracea*(L.) Zopf. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 1997. 7(25): 22-24.
90. Schindler H. Zur Geschichte der Anwendung von Flechten(Lichens) in der Medizin. *Carolina*, 1988. 46: 31-36.
91. Kumar KCS. and 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.
92. 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.
93. Braasch J. and Jacopsen P. Flechten und Ihre Allergene. *Allergologie*, 1991. 14: 99-104.
94. Huneck S. and Schreiber K. Wachstumsregulatorische Eigenschaften von Flechten- und Moos-Inhaltsstoffen. *Phytochemistry*, 1972. 11: 2429-2433.
95. Lawrey JD. Lichen Secondary Compounds: Evidence for a Correspondence Between Antiherbivore and Antimicrobial Function. *Bryologist*, 1989. 92: 326-331.

96. Ingolfsson K, Wiedemann B, Birgisdóttir M, Nenniger A, Jonsdóttir S. and Wagner H. Inhibitory Effects of Baecomycesic Acid from the Lichen "*Thamnolia subulisformis*" on 5-Lipoxygenase in vitro. *Phytomed*, 1997. 4: 125-129.
97. 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.
98. Bironaite DA, Cenas NK, Medentsev AG, and Akimenko VK. The Inhibition of Glutathione Reductase by Quinones. *Z. Naturforsch*, 1991. 46: 966-971.
99. 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.
100. Pengsuparp T, Cai L, Constant H, Fong HHS, Lin L-Z, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Cordell GA, Ingolfsson K, Wagner H. and Hughes SH. Mechanistic Evaluation of new Plant-Derived Compounds that Inhibit HIV-1 Reverse Transcriptase. *J. Nat. Prot.*, 1995. 58:1024-1028.
101. 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.
102. 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.
103. Seifert P. and Bertram C. Usnic Acid-Natural Preservation from Lichens. *Seifen Öle Fette Wachse*, 1995. 121: 480-485.

104. 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.
105. 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.
106. Kirschbaum U, Wirth V. Flechten Erkennen, Luftgüte Bestimmen. Eugen Ulmer, Stuttgart. 1995.
107. 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.
108. 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 2002. (in press).
109. 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).
110. İlçim A, Dığrak M, Bağcı E. Bazı bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Tr. J. Of. Biology, 1998; 22 : 119-125
111. Güner H. Likenlerin biyolojisi ve ege bölgesinde bulunan bazı liken türleri. izmir, Ege Üniv. Fen fak. 1986; 92
112. 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,

113. Karamanoğlu K. Türkiye'nin önemli liken türleri. Ankara Ecz. Fak. Mec. 1971; 1: 53-75.
114. Smith AL. Lichens. Surrey, England. The richmond publishing Co. Ltd. 1975
115. 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.
116. 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.
117. Vartia KO. Antibiotics in lichens. I. Ann-Med. ex; tl. Biol. Fenn. 27 : 46-54. II Ebenda. 1950; 28 : 7-19.
118. Vartia KO. Antibiotics in lichens. Pages 547-561 In Ahmadjian, V, Hale, ME, eds. The Lichens. 1973; Page 547.
119. Kremer BP. Trennung und Nachwess pflanzlicher polyole. Biologie in unserer zeit. 1982; 12 : 91-94.
120. Chicita F, Culberson. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products, The University of North Carolina Press. Chapel Hill. 1969; 329-331.
121. Brodo MI, Sharnoff SD, Sharnoff S. Lichens of north ammerica, Yale University press/New Haven and London, 1999; pp. 721-723.
122. Brij Lal, Upreti DK. Ethnobotanical notes on three Indian lichens. Lichenologist 1995; 27(1): 77-79.
123. Turner NJ. Plants in British Columbia Indian Technology. Handbook No. 38, British Columbia Provincial Museum. 1979; Page 47.
124. Compton BD. 1993. Moerman, D.. 1998. Ethnobotany of Native America

125. Turner NJ, Thomas J, Carlson RT. Ethnobotany of the Nitinaht Indians of Vancouver Island. British Columbia Prov Mus Occas. 1983; Pap. No. 24 : 165.
126. Hu S-y, Kong YC, But PPH. An Enumeration of the Chinese Materia Medica. The Chinese University Press, Hong Kong. 1980; Page 112.
127. Chopra RN, Chopra IC, Handa KL, Kapur LD. Indigenous Drugs of India Academic Publishers, Calcutta & New Delhi. 1958; Page 645.
128. Yamamoto, Yoshikazu, Miura, Yasutaka, Kinoshita, Yasuhiro, Higuchi, Masako, Yamada, Yasuyuki, et al. 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: 8 1388-1390.
129. Nishitoba Y, Nishimura H, Nishiyama T, Mizutani J. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. Phytochemistry. 1987; 26: 12 3181-3186.
130. Mozsik G, Jovar T. Biochemical and pharmacological approach to the genesis of ulcer disease. Dig Dis Sci. 1988; 33: 92-105.
131. Lacy ER, Ito S. Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. Gastroenterology. 1982; 83:619-625.
132. 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
133. Ohya Y, Guth PH. Ethanol-induced gastric mucosal blood flow and vascular permeability changes in the rat. Dig Dis Sci. 1988; 33: 883-888
134. 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.

135. 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.
136. Terano A, Hirashi H, Ota S. and et al. Role of oxygen-derived free radicals in ethanol-induced damage in rat stomach. 1986 (abstract).
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastro-intestinal mucus. *Lancet.* 1984; 1328-1329.
143. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet.* 1994; 344: 721-724.
144. Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982; 47: 412-426.

145. Weiss JS, Lobuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest.* 1982; 47 : 5-16.
146. Stein HJ, Esplugues J, Whittle BJR. Direct cytotoxic effect of oxygen radicals on the gastric mucosa. *Surgery.* 1989; 106: 318-324.
147. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide; Roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982; 60: 1346-1351.
148. Panes J, Grandner DN. Neutrophils generate oxygen free radicals in rat mesenteric microcirculation after abdominal irradiation. *Gastroenterology.* 1996; 111 : 981-989.
149. Smith SM, Holm-Rutigli L, Michael AP. and et al. Role of neutrophils in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology* 1987; 93 : 466-471.
150. Ghanayem BI, Boor PJ, Ahmed AE. Acrylonitrile-induced gastric mucosal necrosis : Role of gastric glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 232: 570-577.
151. Boyd SC, Sasame HA, Boyd MR. Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by diethylmaleate given subcutaneously to rats. *Life Sciences.* 1981; 28:987-992.
152. 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.
153. Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science.* 1981; 214: 200-202.
154. Takeuchi K, Okade M, Niida H. and et al. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol : relation to microvascular permeability , gastric motility and cytoprotection. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1989; 248: 836-840.

155. Lash LH, Hogen TM, Jones DP. Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 83: 4641-4645.
156. Mc Cormick JR, Harkin MM, Johnson KJ. and et al. Suppression by superoxide dismutase of immune-complex-induced pulmonary alveolitis and dermal inflammation. *Am J Pathol.* 1981; 102: 55-61.
157. Romano M, Razandi M, Raza A. and et al. Cysteamine protects gastric epithelial cells monolayers against drug induced damage : evidence for direct cellular protection by sulphhydryl compounds. *Gut.* 1992; 33 : 30-38.
158. Adams JD, Lauterburg BH, Mitchell JR. Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983; 227(3): 749-754.
159. Dupuy D, Szabo S. Protection by metabisulfites against ethanol-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology.* 1986; 91: 966-974.
160. Lamont JT, Ventola AS, Maull A. and et al. Cysteamine and prostoglandin F stimulate rat gastric mucin release. *Gastroenterology.* 1983; 84 : 306-313.
161. Grisham MB, Von Ritter C, Smith BF. and et al. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am J Physiol.* 1987; 253 : G93-G96,
162. Robert A, Lancaster C, Davis JP. and et al. Cytoprotection by prostoglandin occurs in spite of penetration of absolute ethanol into the gastric mucosa. *Gastroenterology.* 1985; 88: 328-333.
163. 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
164. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. *Feryal Matbaacılık Sanayi ve Tic Ltd Şti.* 1997; 3. Cilt, 7.Baskı : 2818-2856.

165. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları.1995: 1-80.
166. Cadet JL. Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. *Int J Neurosci* 1988; 40: 13-18.
167. Mahadik SP, Scheffer RE. Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996; 55(1-2): 45-54.
168. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease; an overview. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 1-85.
169. Mc Cord JM. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New Eng J Med*. 1985; 312: 159-163.
170. Jesberger JA. and Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci*. 1991; 57: 1-17.
171. Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Arc Biochem Biophys*. 1978; 191 : 351-357.
172. Mc Cord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J Biol Chem*. 1970; 245 : 1374-1377.
173. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 - dioxygenase reaction. *J Biol Chem*. 1971; 246: 7825.
174. Egan RW, Paxton J, Kuehl FA. Mechanism for irreversible self deactivation of prostoglandin synthetase. *J Biol Chem*. 1976; 251 : 7329-7335.
175. Hemler ME, Cook HW, Lands WE. Prostoglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys*. 1979; 193 : 340-345.
176. Comporti M. Lipid Peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest*. 1985; 53 : 599-622.

177. Perry MA, Wathwa S, Parks DA. and et al. Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology*. 1986; 90: 362-367.
178. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D. and et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion : protection by melatonin.
179. Aslan A, Yazici K, Karagoz Y. Lichen flora of the Murgul district, Artvin, Turkey. *Israel J Plant Sci*. 2002; 50 (1): 77-81.
180. 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.
181. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
182. Sun Y, Larry WO, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988; 34/3: 497-500.
183. Aebi H. Catalase. *Method Enzymol*. 1984; 105: 121-126.
184. Habig WH, Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. *Methods. Enzymol*. 1981; 77: 398-405.
185. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 1996; 19: 210-214.
186. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J Enol Vitic*. 1977; 28: 49-55.
187. Yen GH, Chen HY. Antioxidant activity of a various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem*. 1997; 43: 27-32.

188. 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.
189. 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
190. 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.
191. 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.
192. 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.
193. 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.
194. 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.

195. Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand j Gastroenterol.* 1969; 4: 265-267.
196. 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.
197. 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.
198. 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.
199. Elliot SN, Wallace JL. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can. J. Gastroenterology.* 1998; 12: 559-568.
200. 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.
201. Groot H. Reactive oxygen speices in tissue injury. *Hepatogastroenterology.* 1994; 41: 328-332.
202. Smith SM, Kvietys PR. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Crit Care Med.* 1988; 16: 892-898.
203. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 481-493.

204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. Franco L, Velo GP. A copper-complex reduced gastric damage caused by acetyl salicylic acid and ethanol. *Prostaglandins.* 1996; 51: 331-338.
208. Franco L, Doria D. Prostaglandins and nitric oxide in copper-complex mediated protection against ethanol induced gastric damage. *Pharmacol Res* 1997; 30: 395-399.
209. Robert A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterology.* 1975; 69: 1045-1047.
210. 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.
211. Takeuchi K, Takehara K, Ohuchi T. Diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor, reduces indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Digestion* 1996; 57: 201-209.
212. 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.

213. 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.
214. 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.
215. 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.
216. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matasuura H, and Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta med*. 1994; 60: 417-420.
217. Stadler RH, Turesky RJ, Muller O, Markovic J, and Leong Morgenthaler PM. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res*. 1994; 308: 177-190.
218. Pretera T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak C, and Talalay P. The electrophilic counter attack responses: protection against neoplasia and toxicity. *Adv. Enzyme. Regul*. 1993; 33: 281-296.
219. Van Lieshout EMM, Peters WHM, and Jansen JBMJ. Effect of oltipraz, α -tocopherol, β -carotene and phenyl isothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*. 1996; 17: 1439-1445.

220. Aruna K. and Sivaramakrishnan VM. Plant products as protective agents against cancer. *Ind. J. Exp. Biol.* 1990; 28: 1008-1011.
221. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione S-transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 1988; 202: 343-361.
222. Hayes JD. and Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family; regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995; 30: 445-600.
223. Ames BN, Shigenaga MK. and Hagen TM. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993; 90: 7915-7922.
224. Dean RT, Giese MJ. and Davies MJ. Reactive Species and their Accumulation on Radical Damaged Proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 1993; 18: 437-441.
225. Cerutti P. Oxy-Radical and Cancer. *Lancet*, 1994. 341: 862-863.
226. Yen GC. and Hsieh CL. Antioxidant Activity of Extracts from Du-Zhong(*Eucommia ulmoides*) toward Various Lipid Peroxidation Models in Vitro. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 3952-3957.
227. Pietta P, Simonetti P. and Mauri P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 4487-4490.
228. Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M., Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 3954-3962.
229. Hidalgo ME, Quilhot FW. and Lissi E. Antioxidant Activity of Depsides and Depsidones. *Phytochemistry*, 1994; 37(6): 1585-1587.
230. Bilaloğlu V, Gülçin İ, Oktay M, Yıldırım A. and Aslan A. Bazı Liken Türlerinin Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi. XIII. Ulusal Kimya Kongresi, Samsun. 1999.