

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

***LOBARİA PULMONARİA* İSİMLİ LİKENDEN ELDE EDİLEN
FENOLİK BİR BİLEŞİĞİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU, ANTİÜLSEROJENİK ÖZELLİKLERİ VE
ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fadime ATALAY

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

**Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2008**

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

**LOBARİA PULMONARIA (L.) HOFFM İSİMLİ LİKENDEN ELDE EDİLEN
FENOLİK BİR BİLEŞİĞİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU,
ANTIÜLSEROJENİK ÖZELLİKLERİ VE ANTİOKSİDANT ENZİM
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

FADİME ATALAY

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28.08.2008
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 12.09.2008
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU
Jüri üyesi : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVOĞLU
Jüri üyesi : Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN
Jüri üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR
Jüri üyesi : Doç. Dr. Ali ASLAN

Enstitü Müdürü

: Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2008

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	X
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Mide Ülseri	7
2.2. Antioksidanlar	15
2.2.1. Serbest radikaller	16
2.2.2. Serbest radikal çeşitleri	18
2.2.3. Serbest radikal kaynakları	23
2.2.4. Serbest radikallerin etkileri	28
2.2.5. Antioksidan savunma sistemleri	31
2.2.5.1. Endojen (Doğal) antioksidanlar	32
2.2.5.2. Ekzojen antioksidanlar	40
2.2.5.3. Gıda antioksidanları	41
2.2.6. Antioksidan etki tipleri	42
2.3. Likenler	42
2.3.1. <i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm	49
3. MATERYAL ve METOD	54
3.1. Deneylerde kullanılan kimyasallar	54
3.2. Deneylerde kullanılan cihazlar	54
3.3. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	55
3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	55
3.5. Liken Örneği	59
3.6. Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu ve “ <i>Rizonil Alkol</i> ” İzolasyonu	59
3.7. Deney Hayvanları	62

3.8. İndometazin ile Ratlarda Ülserinin Oluşturulması ve Rizonil Alkol, Famotidin, Ranitidin, Omeprazol ve Lansoprazol'ün Uygulanması	63
3.9. Mide Dokusunun Makroskopik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi ...	64
3.9.1. Mide Dokusunun Makroskopik İncelenmesi	64
3.9.2. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi	65
3.9.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	65
3.9.2.2. Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü	66
3.9.2.3. Total glutatyon (GSH) miktarı ölçümü	67
3.9.2.4. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü	68
3.9.2.5. Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü	70
3.9.2.6. Glutatyon peroksidaz (GPO) aktivitesinin ölçümü	71
3.9.2.7. Glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü	72
3.9.2.8. Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinin ölçümü	73
3.9.2.9. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü	74
3.9.3. İstatistiksel Analizler	75
4. BULGULAR	76
4.1. İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları	76
4.2. Rizonil Alkolün Spektral Verilerle Yapısının Aydınlatılması	77
4.3. İndometazin ile Oluşturulan Ülser Modeli Üzerine Deneysel Bulgular ...	88
4.4. Biyokimyasal Bulgular	90
4.4.1. LPO aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri	91
4.4.2. SOD aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri	93
4.4.3. CAT aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri	95
4.4.4. GPO aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri	97
4.4.5. GSH aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri	99
4.4.6. GST aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri	101
4.4.7. GR miktarı üzerine rizonil alkolün etkileri	103
4.4.8. MPO miktarı üzerine rizonil alkolün etkileri	105
5. TARTIŞMA	107
6. KAYNAKLAR	118

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarımın başından sonuna kadar her anında desteğini esirgemeyen, en önemlisi sabrın ne olduğunu bana sabrederek gösteren ve organik kimyayı tüm sıkıntılara rağmen tekrar sevdiren sayın Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR'a ve likenlerin o büyülü dünyasıyla beni tanıştıran ve ne zaman ihtiyacım olsa araziye çıkarak liken temin eden ve de her türlü desteği sağlayan sayın Doç. Dr. Ali ASLAN'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 hocalarım; Sayın Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Zekai HALICI'ya,

Üniversitemizin en yoğun çalışan laboratuvarlarında o yoğun temposuna rağmen her türlü teknik, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Doç Dr. Cavit KAZAZ'a,

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

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

Aynı laboratuarda çalışmaktan onur duyduğum ve her türlü yardımlarını gördüğüm, sayın Yrd. Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU, sayın Murat KOÇ, sayın Sevil TANAS ve sayın Selma MUTLU'ya,

Ve son olarak ta aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Fadime ATALAY

ŞEKİLLER LİSTESİ	Sayfa No :
Şekil 1. Midenin yerleşimi ve ülserli midenin görünümü	8
Şekil 2. ROS'ler ile vücut savunmaları arasındaki denge bozulmamalıdır	16
Şekil 3. Genel anlamda antioksidan sistem elemanlarını bir arada gösteren şema	32
Şekil 4. Glutasyon'un molekül yapısı	38
Şekil 5. Likenlerin simbiyont yapıları	45
Şekil 6. <i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm'nın doğal ortamında çekilmiş resimleri	50
Şekil 7. Araştırmada kullanılan Wistar ratları gösteren fotoğraflar	57
Şekil 8. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	67
Şekil 9. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	68
Şekil 10. Rizonaldehit (LP-III)'in kimyasal yapısı	77
Şekil 11. Rizonil alkol (LP-IV)'ün molekül yapısı	78
Şekil 12. Rizonil alkol (LP-IV)'ün UV spektrumu	79
Şekil 13. Rizonil alkol (LP-IV)'ün IR (CHCl ₃) spektrumu	80
Şekil 14. Rizonil alkol (LP-IV)'ün ¹ H-NMR spektrumu	81
Şekil 15. Rizonil alkol (LP-IV)'ün ¹³ C-NMR (DMSO-d ₆ , 100 MHz) spektrumu	82
Şekil 16. Rizonil alkol (LP-IV)'ün DEPT ¹³ C-NMR (DMSO-d ₆ , 100 MHz) spektrumu	83
Şekil 17. Rizonil alkol (LP-IV)'ün 2D- ¹ H- ¹³ C-Heteronükleer COSY (HETCOR) (DMSO-d ₆) spektrumu	85
Şekil 18. Rizonil alkol (LP-IV)'ün 2D- ¹ H- ¹³ C-Heteronükleer COSY (HETCOR) (DMSO-d ₆) spektrumu	85
Şekil 19. Rizonil alkol (LP-IV)'ün HMBC (DMSO-d ₆) spektrumu	86
Şekil 20. Rizonil alkol (LP-IV)'ün HMBC (DMSO-d ₆) spektrumu	86
Şekil 21. Rizonil alkol (LP-IV)'ün iki ve üç bağ üzerinden H-C korelasyonları	87
Şekil 22. İndometazin (IND) uygulaması sonrasında sağlıklı ve muamele grubu sıçanlara ait mide dokularının makroskopik görünümü	88
Şekil 23. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun IND tarafından rat midelerinde oluşturulan ülserler üzerine etkilerini gösteren diyagram	90

Şekil 24. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipid peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram	92
Şekil 25. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	94
Şekil 26. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	96
Şekil 27. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon peroksidaz (GPO) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram.....	98
Şekil 28. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutatyon (GSH) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram	100
Şekil 29. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	102
Şekil 30. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram	104

TABLolar LİSTESİ	Sayfa No :
Tablo 1. Liken türlerinden izole edilen bileşiklerin farklı çözücü sistemlerindeki Rf değerleri	77
Tablo 2. <i>Lobaria pulmonaria</i> 'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün rat midelerinde deneysel olarak indometazin (IND) ile oluşturulan hasarlar üzerine etkileri	90
Tablo 3. <i>Lobaria pulmonaria</i> 'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipit peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkileri	92
Tablo 4. <i>Lobaria pulmonaria</i> 'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkileri	94
Tablo 5. <i>Lobaria pulmonaria</i> 'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri	96
Tablo 6. <i>Lobaria pulmonaria</i> 'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon peroksidaz (GPO) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.	98
Tablo 7. <i>Lobaria pulmonaria</i> 'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutatyon (GSH) miktarları üzerine etkileri	100
Tablo 8. <i>Lobaria pulmonaria</i> 'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkileri	102

Tablo 9. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkileri 104

Tablo 10. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri üzerine etkileri 106

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT	: Katalaz
CCl ₄	: Karbontetraklorür
CCl ₃	: Triklorometil
COX	: Siklooksijenaz enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GAE	: Gallik Asit eşdeğeri
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
GPO	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HSV	: Herpes simplex virüs
HO·	: Hidroksil Radikali
HO ₂ ⁻	: Peroksil
IND	: İndometazin
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NO [·]	: Nitrik oksit
NO ⁺	: Nitronyum iyonu
NO ₂ ⁻	: Azot protoksit
NSAID	: Steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar
NBT	: Nitro blue tetrazolium
O ₂ ^{·-}	: Süperoksit radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
PGE	: Prostaglandin
PMN	: Polimorfo nükleer
PUFA	: Polidoymamış yağ asiti
RAN	: Ranitidin
RNA	: Ribo nükleik asit
RO [·]	: Alkoksil radikalleri
ROO [·]	: Peroksil radikalleri
ROS	: Reaktif Oksijen türleri
RSO [·]	: Sülfenil radikali
RSO ₂ [·]	: Tiyol peroksil radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAA	: Total antioksidan aktivite
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TFB	: Toplam fenolik bileşikler
WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı

ÖZET

***LOBARİA PULMONARIA* İSİMLİ LİKENDEN ELDE EDİLEN FENOLİK BİR BİLEŞİĞİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU, ANTİÜLSEROJENİK ÖZELLİKLERİ VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmada, *L. pulmonaria* adlı liken türünden rizonil alkol (RA) adlı liken metaboliti izole edildi ve indometazin ile oluşturulan gastrik hasarlar üzerine *in vivo* etkileri araştırıldı. RA'nın önemli oranda gastroprotektif etki gösterdiği ilk defa tarafımızdan bulundu.

Antiülser etki ile antioksidan savunma sistemi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak üzere sıçanların mide dokularında lipid peroksidasyonu (LPO) ve glutatyon (GSH) miktarları ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPO) aktiviteleri ölçüldü. Bunun yanı sıra tüm dokularda miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi de belirlendi.

İndometazin ile ülser oluşturulmuş mide dokularında GSH miktarı, SOD, GPO ve GST aktiviteleri düşük bulundu. Bunun aksine LPO miktarı ile KAT, GR ve MPO aktiviteleri ise yüksek bulundu. Bu sonuçlar reaktif oksijen sınıfları (ROS) ve oksidatif stresin gastrik mukozal hasarlarda önemli bir rol oynadığını ve indometazinin antioksidan savunma sistemi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir. İndometazin uygulanan dokuların aksine rizonil alkol ve referans ilaçların uygulandığı gruplarda GSH miktarı ile SOD, GPO ve GST aktivitelerinin artması LPO miktarı ile KAT ve GR aktivitelerinin ise azalması gastrik mukozada üretilen ROS'ların olumsuz etkilerinin uzaklaştırıldığı fikrini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Likenler, rizonilalkol, indometazin, ülser, oksidatif stres, antioksidan enzimler, nötrofil infiltrasyonu

SUMMARY

INVESTIGATE THE ISOLATION, CHARACTERIZATION, ANTIULGER PROPERTIES AND EFFECTS ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES OF A PHENOLIC COMPOUND ISOLATED FROM A LICHEN SPECIES, *LOBARIA PULMONARIA*.

In the present study, a phenolic lichen metabolite named as rhizonylalchol was isolated from *L. pulmonaria* and *in vivo* effects on indomethacin induced ulcer model was investigated. It is firstly reported that, rhizonylalchol exhibited significant gastroprotective effect.

In order to discuss the relationship between antiulcerogenic activity and antioxidant defence systems, the levels of lipid peroxidation, the amount of reduced-glutathione (GSH) and the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPO), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) were determined in the stomach tissues of rats. In addition myeloperoxidase activity was determined in the stomach tissues too.

The amount of GSH and activities of SOD, GPO and GST in indomethacin-administrated tissues reduced, contrarily the lipid peroxidation levels and activities of GR and CAT increased. These results suggested that reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress play important role in the gastric mucosal damages and indomethacin also has negative effects on the antioxidant defence systems. In contrast to indomethacin, the increase in the amount of GSH and activities of SOD, GPO and GST and the decrease in lipid peroxidation levels and activities of GR and CAT in rhizonylalchol and reference drugs administrated groups, supports the reduction of negative effects of reactive oxygen (ROS) radicals, produced in gastric mucosa.

Keywords: Lichen, rhizonylalchol, indomethacin, ulcer, oxidative stress, antioxidant enzymes and neutrophil infiltration

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ülser; mide ve duodenumun multifaktöriyel-kronik enflamatuvar bir hastalığıdır. Hastalığı meydana getiren faktörler asit sekresyonu ve koruyucu mukoza bariyerindeki bozukluklara ilave olarak genetik yatkınlık (irsiyet), stres, kortizon türü ilaçlar, aspirin ve indometazin gibi NSAİİ (Non steroid antienflamatuvar ilaçlar)'ler, *Helicobacter pylori*, Herpes Simplex virüsü (Tip I / HSV-1) ile sigara ve alkol kullanımıdır¹.

Ülseri meydana getiren önemli sebeplerden biri düzenli NSAİİ kullanımıdır. NSAİİ'lerin ülser yapıcı etkileri, enflamatuvar bozukluklardaki kullanımlarının en büyük dezavantajı olmaya devam etmektedir. NSAİİ'ler tarafından uyarılan gastrik mukozal ülserasyon temel olarak sitoprotektif prostaglandinlerin eksikliğine bağlanır. Bu prostaglandinlerin eksikliği midede gastrik asitlerin, safra tuzlarının ve etil alkolün tahrip edici etkilerini artırmaktadır.

Aspirin ve indometazin'in siklooksijenaz (COX) enzim sistemini inhibe ederek antienflamatuvar aktivite gösterdikleri düşünülmektedir. Aspirin ve indometazin gibi antienflamatuvar ilaçların COX enzim sistemini bloke etmesi ile prostaglandin biyosentezinin baskılanması ve gastrik mukozal bariyerin bozulması sonucu gastrik hasarın oluşumuna neden olur. Daha önceki araştırmalarda COX enziminin engellenmesi sonucunda araşidonik asit metabolizmasının 5-lipoksijenaz yolunda bir artış meydana geldiği ve bunun da lökotrienlerin ve hidroperoksieikozatetraenoik asidin oksijeninden türevlenen gastrik mukozada tahribata sebep olan radikallerin aşırı üretimi ile sonuçlandığı kaydedilmiştir²⁻⁶. Daha önce de belirtildiği gibi ülser midedeki koruyucu ve saldırgan faktörlerin etkileşimi sürecindeki düzensizlikten meydana gelmektedir. İndometazin uyarmalı ülser oluşumu temel olarak COX inhibisyonu ile ilişkilidir ve COX inhibisyonun da prostaglandin biyosentezini baskılayarak

gastrointestinal hasara karşı bir savunma faktörü olan mukus oluşumunu engellediği rapor edilmiş olmasına rağmen⁷⁻⁹ indometazin uyarımlı mide ülserlerinin oluşum mekanizması ayrıntılı olarak henüz tam olarak aydınlanmamış olup bu konuda alternatif sebepler üzerine tartışmalar hala devam etmektedir.

Prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışının azalması, topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi indometazin uyarımlı mide ülserlerinin sebeplerinden bazılarıdır¹⁰⁻¹⁴. İndometazin gibi NSAİİ'ler tarafından uyarılan akut gastrik deneysel lezyonlarda oksijenden türevlenen serbest radikallerin de önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar yayımlanmıştır¹⁵⁻²¹. Bu çalışmalarda önemli miktarlarda üretilen oksijen metabolitlerinin ise dokuyu dejenere ederek ülsera sebep oldukları bildirilmiştir^{5,6}.

Diğer birçok doku hasarı gibi gastrik ülser de süperoksit anyonlarının oluşumuyla ilgilidir. Ayrıca gastrik mukozadaki ülserin tedavisinde antioksidan enzimlerin koruyucu etkilerine ve karşılıklı olarak bu enzimlerin birbirlerini etkilemelerine de dikkat çekilmiştir²²⁻³⁸. Canlı dokulardaki hücreler serbest radikallerin hasarlarını önleyebilecek veya tamir edebilecek pek çok savunma mekanizmasına sahiptir. Serbest radikallerin tahribatları, primer olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPO) gibi enzimler ve sekonder olarak da antioksidan vitaminler, glutatyon (GSH), birçok makro ve mikro moleküller tarafından azaltılır³⁹⁻⁴³. Şayet süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif maddeler aşırı üretilirse, membran lipitlerinin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve ekstraselüler matriks glikozaminoglikanlarının zarar görmesine bağlı olarak doku hasarı prosesi başlayabilir.

Gastrik ülser oluşumunu tetikleyen mekanizmalardan birisinin de bu mekanizma olabileceği pek çok araştırmacı tarafından da işaret edilmiştir^{15-17,20,24,30,36}.

Serbest radikalleri etkisizleştiren sekonder moleküllerden biri olan GSH, gastro intestinal dokuları makro molekül içeren lipidlerin oksidatif hasarlarından korumada önemli görev üstlenmiştir^{17,20,36,44-46}. Günümüze kadar pek çok etken maddenin, çok sayıda bitki ekstresinin ve bazı gıda kaynaklarının indometazin ile uyarılan gastrik hasar üzerine pozitif etkilerinin olduğu rapor edilmiştir^{17,25-28,31,35,36,47-73}.

Likenler, simbiyotik ilişki içerisinde uyumlu bir şekilde yaşayan bir fungus ve bir algden oluşur. Bu simbiyotik yaşam formu genellikle “sekonder metabolitler” olarak isimlendirilen çok sayıda madde üretir. Önceki dönemlerde bu maddeler fungal ürünler olarak tariflenirdi. Fakat sonraki yıllarda likenlerin simbiyotik partnerlerinin kültür ve ayrımı yapılmaya başlandığında^{74,75} bu maddelerin daima fungal partner tarafından üretildiği bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir⁷⁵⁻⁷⁷. İlginçtir ki, liken sekonder metabolitleri bitkiler tarafından da sentezlenememektedir⁷⁸.

Likenler ve onların metabolitlerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve kullanım alanlarının tespit edilmesine yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalardan bir kısmı; antiviral^{79,80}, antimikrobial⁸¹⁻⁹⁴, antitümöral⁹⁵⁻⁹⁷, allerjen⁹⁸, bitki büyüme inhibitörü⁹⁹, antiherbivor⁹⁹ enzim inhibitörü^{100,101} şeklinde sıralanabilir. Diğer yandan parfüm sanayiinde⁷⁷, kozmetik krem sanayiinde¹⁰² ve hava kirliliğinin belirlenmesinde¹⁰³⁻¹⁰⁵, faydalanılan likenler pek çok ülkede de besin olarak kullanılmaktadır^{75,106}. Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri çok özel moleküllerden ileri gelmekte^{75,77} 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.

Diğer yandan son zamanlarda artan bir ilginin sonucunda liken ekstrelerinin ve liken metabolitlerinin antioksidan özellikleri araştırılmış^{83-85,88,89,107-110} ve bu araştırmaların çoğunluğu da bizim araştırma ekibimiz tarafından gerçekleştirilmiştir^{92,93,111-115}.

Literatürde liken ekstrelerinin ve liken metabolitlerinin antiülser etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Ülserin önlenmesinde oksidatif süreç üzerinde likenlerin etkili olup olmadığının tespit edilmesi hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Çalışma ekibimiz bu boşluğu biraz olsun doldurabilmek amacıyla bu konuda çalışmalar yapmaktadır^{52,111,113,114,116-120}.

Mevcut araştırmada çalışılan liken türü olan *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm, Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya'nın dağlık kesimlerinde özellikle ağaçlarda yayılış gösteren bir türdür. Ülkemizde genel olarak Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır¹²¹. Bu bitki halk tıbbında egzama, solunum sistemi ile ilgili hastalıklar ve artrit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer yandan bazı ülkelerde yiyecek olarak kullanımının yanı sıra kozmetik sanayinde de kullanıldığı rapor edilmiştir¹²²⁻¹²⁴. Parfüm sanayinde koku verici olarak da kullanılmaktadır¹²⁵. Ayrıca, Fransa'da bu türden orman çayı adı verilen bir tür aromatik içki yapılmaktadır¹²⁶. Diğer yandan, bu likenden hazırlanan ilaçlar uzun süre solunum düzensizliklerinin tedavi edilmesinde kullanılmıştır. *L. pulmonaria* (L.) Hoffm'dan hazırlanan çay laksatif (barsak gevşetici) olarak da kullanılmıştır. Ayrıca bir de kremi hazırlanmıştır^{126,127}.

Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. biranın mayalanmasında şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) yerine kullanılmış nadir liken türlerinden birisidir. Bu liken ile yapılan biranın şerbetçi otu ile yapılan birayla tamamen aynı olduğu ancak organizmayı daha çok uyuşturduğu tespit edilmiştir¹²⁵.

Veteriner homeopatisinde (benzeri benzerle tedavi), gıda ürünü olarak kullanılabilen türlerde ana tentür oral veya parenteral kullanım için olmaktadır. Bu tentürün düşük konsantrasyonları insan homeopatisinde de kullanılır¹²⁸. Bu likenin başlıca komponentleri gryphoric asit, stictic asit ve norstictic asittir^{76,129}. Bunlardan gryphoric asit anti-proliferatif etki göstermektedir¹³⁰. Bu likenden elde edilen bir polisakkaritin kemik iliği hücrelerini radyasyona karşı koruduğu ve hematopoetik kök hücrelerini desteklediği de belirlenmiştir¹³¹. Bütün bu bilgilere ilaveten bu liken türü araştırma ekibimizin de dikkatini çekmiş ve bu liken türü üzerinde ekibimizde bazı araştırmalar yapmıştır. Bu likenden elde edilen su¹¹⁶ ve metanol¹²⁰ ekstrelerinin gastroprotektif, su ekstresinin ise anti-enflamatuvar¹¹⁶ etkilere sahip olduğu araştırma ekibimiz tarafından tespit edilmiştir. Bu çalışmalarımızı bu likenden molekül izolasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları izlemiş, karakterize edilen bazı moleküllerin (stiktik asit, isidioforin ve rizonaldehit) antiülserojenik etkileri ve antioksidan sistem ile mekanistik ilişkileri araştırılmış ve bu konuda bir doktora tezi sonuçlandırılmıştır¹¹⁴.

Mevcut araştırma *Lobaria pulmonaria* isimli liken türü üzerinde bugüne kadar araştırma ekibimizin yapmış olduğu çalışmaların bir devamı niteliğindedir. Bu araştırmada *L. pulmonaria*'nın aseton ekstresinden yukarıdaki maddelerden farklı bir molekül saflaştırılarak kimyasal yapısı rizonil alkol olarak karakterize edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, Rizonil alkolün antiülserojenik etkisi sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde belirlendi ve sıçan mide dokularındaki antioksidan sistemin

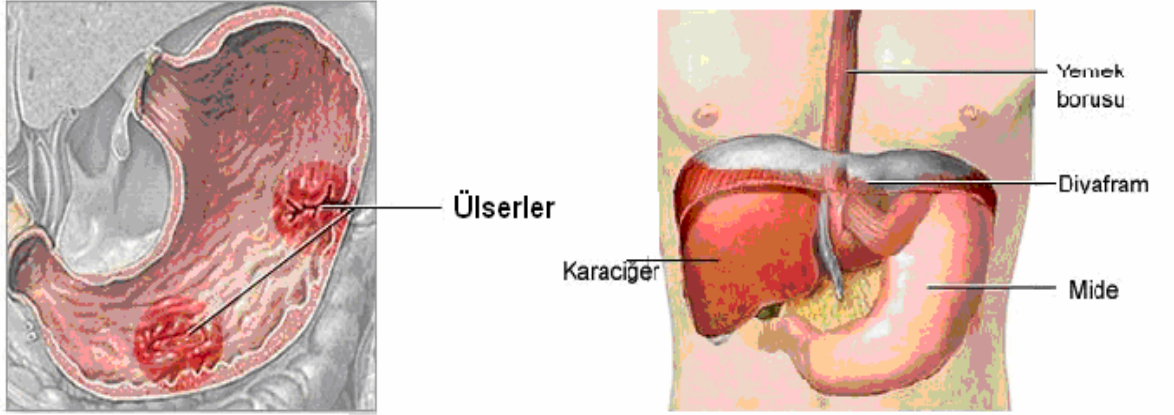
çeşitli parametreleri (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon s-transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, miyeloperoksidaz gibi enzimler ile glutatyon ve lipit peroksidasyon düzeyleri) üzerine etkileri belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide Ülseri

Mide diyaframın (göğüsle karın boşluğunu birbirinden ayıran kas bölme) altında, epigastrik (mide hizasındaki karın duvarına ait), umbilikal (göbeğe ait) ve sol hipokondriak (lokmaaltı) bölgede yer alan sindirim sisteminin en geniş bölümüdür (Şekil 1). Midenin belirli bir şekli yoktur. Ancak içerisi orta derecede dolu olan ve iki ucundan tutulmuş sarkık bir torbaya benzetilebilir. Midenin iç hacmi yaşa göre değişir. Yeni doğanda 30 cm^3 , pubertede 1000 cm^3 ve erişkinde 1500 cm^3 kadardır¹³².

Mide fizyolojik olarak, besinlerin sindiriminde önemli rol oynayan ve sindirim enzimleri, hormonlar, hidroklorik asit, B12 vitamininin ince bağırsağın son kısmından emilmesi için varlığı şart olan intrinsik faktör gibi salgıları yapan, hem ekzokrin (salgılarını kanallar aracılığıyla vücut boşluklarına veya dışarı salan bez sistemleri) hem de endokrin (salgılarını bir kanal sistemi olmaksızın doğrudan kan akımına veren bez sistemi) bir organdır. Anatomik olarak beş kısımda incelenmesine rağmen histolojik olarak kardial, fundus, korpus ve pilor olmak üzere dört kısımda incelenir. Bununla birlikte fundus ve korpus mikroskobik yapı olarak aynı olduğundan histolojik olarak sadece üç bölge ayırt edilebilir. Mide histolojik olarak içten dışa doğru tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere 4 tabakadan meydana gelir¹³³.



Şekil 1. Midenin yerleşimi ve ülserli midenin görünümü.

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

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

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

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

Midenin üç temel fonksiyonu vardır:

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

Midede sindirim ve kimüs oluşumu, mide salgısı ile sağlanır. 24 saatte 2–3 litre mide özsuyu salgılanır. Bu salgı içinde pepsin, HCl, intrinsik faktör, mukus ve su bulunur. Mide cerrahi anatomi açısından, proksimal (organın gövdeye bağlanma noktasına yakın kısmı) mide cerrahi bölümü ve distal (organizmada ya da bir yapının bağlanma yerinden uzakta olan herhangi bir bölgesi) mide cerrahi bölümü olarak iki ana bölümden oluşur.

Midenin ön duvarı ve arka duvarı uzun eksen boyunca sağ ve solda birer eğrilikle birleşmişlerdir. Sağ taraftaki konkav eğriliğe kurvatura minör, sol taraftaki konveks eğriliğe kurvatura majör denir. Midenin küçük kurvatürü kardias ile pilor arasında ve diyaframın sağ krusunun çapraz yapan lifleri önünde uzanır. Büyük kurvatür üstte gastrointestinal ligaman, altta omentum majus ile bağlantılıdır. Omentum majusun iki yaprağı arasında sağ ve sol gastroepiploik damarlar bulunur^{134,135}. Torba şeklinde olduğundan şekli; doluluk derecesine, kasının kasılma durumuna (tonus), solucanvari hareketlerine, vücut yapısına, ayakta ya da yatar vaziyette oluşuna, komşu organların durumuna göre değişir. Mide boş iken yukarıya ve aşağıya, dolu iken arkaya ve öne bakar. Bu nedenle yüzlere anterosuperior ve anteroinferior yüzler denir^{134,135}.

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

olmakla beraber sonuç olarak enflamasyon meydana gelmekte ve bunun sonucunda ise peptik ülser oluşmaktadır^{134,135}.

Peptik ülser; mide mukozasının ileri derece enflamasyonu anlamına gelir. Mide ve duodenumun multifaktöriyel-kronik enflamatuvar hastalığıdır; gastrointestinal sistemin herhangi bir yerinde asit-pepsinle temas etmiş bir mukoza deliği olarak da tanımlanmaktadır. Özellikle erişkinlerin ileri yaşlarında yaygın olmak üzere tüm toplumda hafif ve orta şiddette ülser oldukça sık olarak görülmektedir. Gastritte enflamasyon yüzeysel olduğundan çok zararlı değildir. Hâlbuki peptik ülser, mukozanın, mide sıvısının sindirim işlevi sonucu ortadan kaldırılmış alanıdır ve yüzeysel olmayıp daha derinlere inmektedir¹³⁴. Gastrointestinal (GI) ülserasyonda enflamatuvar cevap genellikle yıkıcıdır. Çünkü hepsi doku nekrozu ve gastrik ülserasyon patogenezinin yol açan lipid türevli eikosanoidlerin yanı sıra lokal enflamasyon araçlarının salınımıyla birlikte görülür. Çalışmalar parental lökotrien uygulamasının gastrik vazokonstriksiyon, vasküler permeabilitede artış, gastrik mukozada yıkım, asit ve pepsin sekresyonunda artış meydana getirdiğini göstermiştir³.

Eğer vasküler hasar varsa, süperfisyal mukozal kapiller kan akımı yavaşlar ve dolaşımdan plazma sızar. Bu durum mukozal kan damarlarında dolaşımın tamamen durması sonucu konjesyonu hızlandırır. Nekrotik yüzey epitelinin dökülmesi ile oluşan erozyon, hipoksik ortamda genişler ve böylece hemorajik derin erozyon ve ülser meydana gelir. Şayet vasküler hasar minimal derecede ise veya yoksa kan akımı devam eder ve süperfisyal mukozal hücre hasarına rağmen gastrik pit'deki proliferatif zon çabucak hasarı karşılar ve hücre proliferasyonu gelişir. Eğer vasküler hasar yoksa veya az ise süperfisyal epitelin %95'i etanolla yıkıldığı halde hasardan 15–60 dakika sonra derindeki kübik hücreler yüzeyi kaplar. Vasküler hasar ve derin hemorajik erozyon veya

ülserlerin yokluğunda, gastrik mukozanın epitelyal yenilenmesi son derece hızlı ve yeterlidir. Başka bir deyişle eğer vasküler hasarı farmakolojik olarak dikkate alırsak, gastrik mukozal epitel doğal ve yeterli tamir kapasitesinden dolayı kendi kendine iyileşir^{136,137}.

Belirtildiği üzere gastrik hasarın midedeki savunma ve yıkıcı faktörlerin etkileşim sürecindeki düzensizlikten ileri geldiği iyi bilinmektedir. Gastrik hasar; mide ve duodenumda mukus, bikarbonat, prostaglandin sentezi gibi mukozal koruma mekanizmaları ile mukozaya zarar verebilen asit-pepsin arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkar. Asit sekresyonu ve koruyucu mukoza bariyerindeki bozukluklara ilave olarak genetik yatkınlık (irsiyet), stres, travma, sepsis, hemorajik şok, yanıklar, pulmoner ve karaciğer hastalıkları, rezerpin, epinefrin, steroidler, sigara kullanımı, alkol, aspirin ve indometazin gibi nonsteroid antienflamatuar ilaçlar (NSAİİ), *Helicobacter pylori* ve *Herpes simplex* virüsü (Tip I/HSV-1) hastalığı meydana getiren faktörlerdir. Hastaların yaklaşık %60-80'inde etiyolojik faktör bilinmemekle beraber hastalık gelişimindeki fizyopatoloji birbirlerine benzerdir^{1,2,5,6,134,138}. Bunun yanı sıra, insanlarda kronik ülserlerin %75-85'i *Helicobacter pylori* enfeksiyonu gösterilmiş olup, bu bakteri polimorfonükleer lökositlerin oksidatif baskısına yol açar. Bunun sonucunda önemli miktarda oksijen metabolitleri üretilir ve bu metabolitler ise dokuyu dejenere ederek ülsera sebep olur^{5,6}.

Hayvanlarla yapılan araştırmalarda, ülser hastalığının sadece insanlarda değil aynı zamanda rat, kedi, köpek, sığır, domuz, kuzu ve tavuklarda da görüldüğünü göstermiştir. Ülser hayvanlar arasında en yaygın olarak kedi, köpek gibi evcil hayvanlarda görülmektedir. Kedi ve köpeklerde gastrik hasar oluşmasının birçok nedeni olmakla beraber dengesiz yağ, karbohidrat ve protein içeren besin maddelerinin

alınması ve çevresel stres yapıcı ajanların etkisinin de rolünün olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tavuk ve domuzlarda da çevresel stres ve beslenme faktörlerinin gastrik hasara neden olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan sığırlarda iklim, yaş ve sütten kesimin gastrik hasar oluşmasını etkilediği aynı zamanda beslenmenin, parazitik faktörlerin, savunma ve saldırgan faktörlerdeki değişikliklerin gastrik hasar oluşumu ile paralellik gösterdiği görülmektedir^{139,140,141}.

Non steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) günümüzde özellikle romatizmalı hastalıklarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlara bağlı olarak özofagus, mide, duodenum ve böbreklerde önemli yan etkiler görülmektedir¹⁴². Endoskopik taramalarda NSAİİ kullanan bireylerin %35-60'ında midede erozyonlar ve submukozal kanamalar ile %10-25'inde mide ve duodenumda ülserler görülmektedir. Özellikle yaşlılarda bu oranlarda ve komplikasyon riskinde daha fazla artış olmaktadır^{142,143}. Ayrıca NSAİİ kullananların yaklaşık % 10'unda ölüm bildirilmiştir. NSAİİ bağlı gelişen gastroduodenal lezyonlar akut olarak 1-2 hafta içinde, kronik olarak ise dört hafta ve sonrasında gelişir¹⁴².

Daha öncede belirtildiği üzere ülseri meydana getiren önemli sebeplerden biri de NSAİİ kullanımıdır. NSAİİ kullanımı gelişen toplumlarda kullanım sıklığı oldukça artan ilaç gruplarından biridir. Ayrıca sosyoekonomik şartların daha iyiye gitmesi sonucu artan ortalama insan ömrü nüfustaki yaşlı oranını artırmış olup kronik hastalıklara bağlı NSAİİ kullanımını artıran bir başka neden haline gelmiştir. NSAİİ'lerin ülser yapıcı etkileri, enflamatuvar bozukluklardaki kullanımlarının en büyük dezavantajı olmaya devam etmektedir. NSAİİ'ler tarafından uyarılan gastrik hasarların oluşum mekanizması ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır. Bunlar arasında prostaglandin

biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışında bir azalmanın olması, topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi sayılabilir^{9,12,14}.

Aspirin ve indometazin'in siklooksijenaz (COX) enzim sistemini inhibe ederek anti-enflamatuar aktivite gösterdikleri düşünülmektedir. 1990'lara kadar vücutta tek tip COX olduğu zannedilirken daha sonra COX enziminin COX-1 (yapısal) ve COX-2 (indüklenebilir) olmak üzere iki izozimi olduğu anlaşılmıştır. Bu iki izozimin genetik kodlamaları da farklıdır¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. 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 indüklenebilir¹⁴⁸. NSAİİ'lerin gastrik yan etkilerinden COX-1 inhibisyonu, anti-enflamatuar etkilerinden ise daha çok COX-2 inhibisyonu sorumludur¹⁴⁹. Aspirin ve indometazin, COX-1'e olan selektiviteleri COX-2'ye nispeten daha yüksektir. Hâlbuki flurbiprofen COX-2'yi COX-1'e göre daha fazla inhibe eder. COX-2 etkileri COX-1'e göre daha fazla olan NSAİİ'lardan meloksikam, tenoksikam ve nabumeton halen tıbbi kullanımı yaygın olan ilaçlardır^{136,147}.

Aspirin ve indometazin gibi anti-enflamatuar ilaçların COX enzim sistemini bloke etmesi ise prostaglandin biyosentezinin baskılanması ve gastrik mukozal bariyerin bozulması sonucu gastrik hasarın oluşumuna neden olur.

Daha önceki araştırmalarda COX enziminin inhibisyonu sonucunda araşidonik asit metabolizmasının 5-lipoksijenaz yolunda bir artış meydana geldiği ve bunun da lökotrienlerin ve hidroperoksieikosatetraenoik asidin oksijeninden türevlenen gastrik mukozada tahribata sebep olan radikallerin aşırı üretimi ile sonuçlandığı kaydedilmiştir^{2,3}.

Oksijen radikallerinin stres, etanol ya da NSAİİ'lerle oluşturulan akut deneysel gastrik lezyonların patogeneziindeki rolü de çok iyi bilinmektedir^{15,21,22}. Bununla beraber gastrik bikarbonat ve mukus sekresyonunun azalması indometazinin hasarlayıcı etkisine yardım eder¹⁵⁰. NSAİİ'lerin gastrik hasar oluşturmadaki temel mekanizmaların başında reaktif oksijen türlerinin artırması ve prostaglandin miktarını düşürmesi gelmektedir. Bu reaktif serbest radikallerin miktarındaki artış ve buna paralel olarak prostaglandinlerin eksikliği midede gastrik asitlerin, safra tuzlarının ve etanol'ün tahrip edici etkilerini artırmaktadır. Reaktif oksijen radikallerinin gastrik ve duodenal mukozaya verdiği tahrip edici ülseratif etkileri (kanamalarda dâhil olmak üzere), hayvanlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede araştırılmıştır^{5,151,152}.

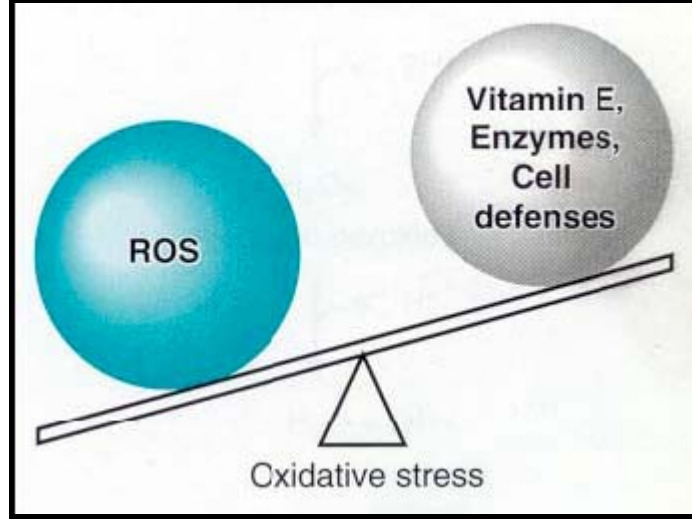
İndometazin gibi NSAİİ'ler kullanılarak oluşturulan deneysel akut gastrik lezyonlarda oksijenden türevli serbest radikaller ve lipid peroksidasyonunun önemli rollerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca bu çalışmalarda lipit peroksit ve hidrojen peroksitin gastrik mukozal hücrelerde birikiminin hızlanmasına rağmen glutatyon peroksidaz aktivitesinin azaldığı görülmektedir. Hidroksil, süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit, peroksinitrit gibi radikallerin çeşitli reaksiyonlarla dokularda oluşturduğu hasarların yanısıra gastrik hasar oluşumunda da birçok reaksiyonu yönlendirdikleri görülmektedir. Bu yüzden gastrik mukozadaki ülser formasyonunun giderilmesinde antioksidan enzimlerin koruyucu fonksiyonlarının olduğu düşünülmektedir^{15-19,29,141,153,154}.

Hücreler reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini önleyebilecek veya oluşan zararlı etkileri tamir edebilecek birçok mekanizmaya sahiptir. Reaktif oksijen türlerinin tahribatları, primer olarak enzimler ve sekonder olarak da antioksidan vitaminler, glutatyon (GSH) ve melatonin gibi birçok makro ve mikro moleküller tarafından

azaltılarak serbest radikallerin hücrelerde düşük ve belirli konsantrasyonlarda tutulmaları sağlanır^{155,156}. Şayet süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($HO^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri aşırı üretilirse, membran lipidlerinin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve ekstraselüler matriks glikozaminoglikanlarının zarar görmesine bağlı olarak doku hasarı prosesi başlayabilir. Gastrik hasar oluşumunu tetikleyen mekanizmalardan birisinin de bu mekanizma olabileceği pek çok araştırmacı tarafında öne sürülmüştür^{15-17,20,30,36}. Serbest radikalleri etkisizleştiren sekonder moleküllerden GSH ise, gastrointestinal doku lipidlerini oksidatif hasardan korumada önemli görev üstlenmiştir^{33-36,45,46,155-157}. Bu gün bilinen pek çok etken madde ve bitki ekstraktları'nın indometazin ile uyarılan gastrik hasar üzerine pozitif etkileri gösterilmiştir¹⁵⁸⁻¹⁶².

2.2. Antioksidanlar

Serbest radikallere karşı (antioksidan savunma sistemleri, antioksidanlar) reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Organizmalarda reaktif oksijen radikallerinin üretimi ve yıkılması arasında sürekli bir denge vardır. Bu dengenin reaktif oksijen radikalleri lehine kayması oksidatif stresi artırırken (Şekil 2) organizmalar pek çok hastalığın ortaya çıkmasına elverişli hale gelmiş sayılır¹⁶³. Bu yüzden öncelikle serbest radikalleri iyi tanımak gereklidir.



Şekil 2. Reaktif oksijen radikallerinin (Reactive oxygen species; ROS) ile vücut savunmaları arasındaki denge bozulmamalıdır.

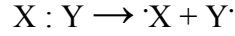
2.2.1. Serbest radikaller:

Serbest radikaller orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir¹⁶⁴.

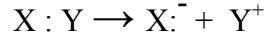
Elektronlar atomlar içerisinde orbital olarak bilinen uzay bölgelerinde en fazla iki tane olacak şekilde ve birbirlerine zıt konumda bulunmaktadır. Demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezken bazı atom kombinasyonları (nitrit dioksit, nitrik oksit) bir orbitalinde tek elektron bulunduran dağılımları nedeni ile radikal özellik gösterirler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dizilişlerinin yanında

termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile de değerlendirilmelidir. Serbest radikaller üç yolla meydana gelir¹⁶⁵.

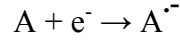
1. Hemolitik bağ ayrılması ve bir elektronun bir molekülden diğerine transfer edilmesi sonucu oluşan serbest radikallerdir. En yaygın görülen serbest radikal oluşumu hemolitik bağ ayrılmasıdır.



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



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

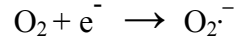


Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlamaktadır. Oksijen atomu orbitallerindeki elektronların farklı dizilimi ile de süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna da neden olur. Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalleri de yer almaktadır. Oksijenli (aerobik) solunum yapan canlılar dışardan aldıkları besin maddelerini oksijeni kullanarak enerjiye çevirirler. Dolayısıyla aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin en fazla olduğu canlı grubudur. Bu

yüzden aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin etkilerine daha fazla maruz kalırlar¹⁶⁶.

2.2.2. Serbest radikal çeşitleri:

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



Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) hemen hemen bütün aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Süperoksit radikalının eozinofil, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi fagositik hücreler tarafından üretilerek radikal oluşunu artırdığı bilinmektedir¹⁶⁶.

Süperoksit radikali nadir olarak oksidatif hasara neden olur. Çünkü süperoksit dismutaz enzimi ile hızlı bir şekilde hidrojen peroksit (H_2O_2) çevrilir. Buna ilaveten asidik durumlarda H_2O_2 ve peroksil ($HO_2^{\cdot}$) radikallerini üreten spontan reaksiyona da uğrayabilir. Süperoksit radikallerinin asıl zararları hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır¹⁶⁷.

İki süperoksit radikalının bir araya gelmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



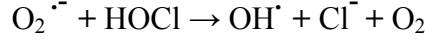
Süperoksit radikali ve peroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.



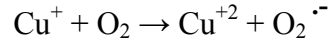
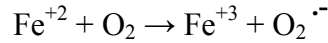
Süperoksit radikalinin nitrik oksit radikali ile birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlamaları sonucu peroksinitrit meydana gelir¹⁶⁸.



Hidroklorik asit (HOCl) oksijen metabolitleri ile reaksiyona girme özelliğine sahip olması nedeniyle ilgi uyandırmıştır. Hidroklorik asitin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda oldukça güçlü oksidan olan hidroksil (OH $\cdot$) radikalının oluştuğu görülmüştür¹⁶⁹.

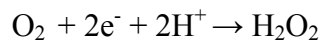
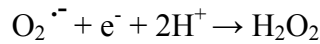


Süperoksit anyonu hem indirgeyici hem yükseltgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitler nitrobluetetrazolium ve sitokrom c'yi indirger. Redükta olarak görev yaptığında ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise epinefrinin oksidayonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksit indirgenir¹⁷⁰. Diğer taraftan geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir.

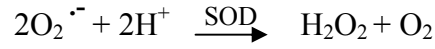


Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olup serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir¹⁷¹.

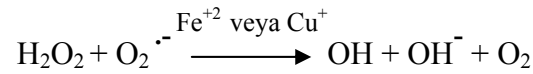
Hidrojen peroksit (H₂O₂): Asidik ortamda moleküler oksijenin ortamdaki iki elektron alması veya süperoksit'in bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir¹⁷².



Biyolojik sistemlerdeki hidrojen peroksitin asıl kaynağı herhangi bir sistem tarafından üretilen süperoksit radikalının dismutasyon reaksiyonudur. Ayrıca ürat oksidaz, glukoz oksidaz, ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler iki elektronunu oksijene vererek H_2O_2 oluştururlar.

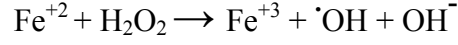
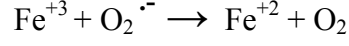


Hidrojen peroksit kendi başına çok zayıf oksidan özellik gösterir. Çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir. Hidrojen peroksit gerektiğinde hücreler tarafından selenyum içeren glutation peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılabilir. H_2O_2 serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir¹⁷².

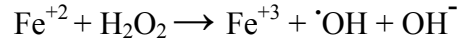
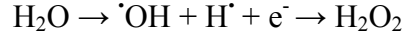


Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz olarak meydana gelebilir. Ancak katalizör olmadığı zaman çok yavaş ilerler. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demir'e (Fe^{+2}) indirgenir. Daha sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile

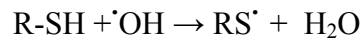
hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir^{173,174} reaksiyonun mekanizması aşağıdaki şekildedir.



Hidroksil radkali ($\text{OH}\cdot$): Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında yani fenton reaksiyonu sonucu ve suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılması ile oluşan son derece reaktif oksidan radikaldır. Hidroksil radikali özellikle biyolojik moleküller üzerine saldıran ve oluştuğu yerde büyük hasarlara neden olan oldukça hareketli bir oksidandır¹⁷⁵.



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



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

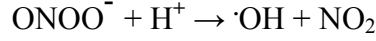
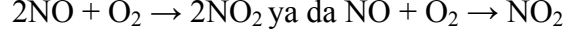
Belki de $\text{OH}^\cdot$ en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu artırmasıdır. Bu durum hidroksil radikallerinin membrana yakın bir yerde üretilmesi ve membran fosfolipid zincirinin yağ asidi tabakasına atak yapması ile meydana gelir. Ayrıca hidroksil radikalının araşidronik asit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

Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$): Singlet oksijen eşleşmemiş elektron ya da elektronlara sahip olmadığından dolayı bir serbest radikal değildir. Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Ancak orbitalinde içerdiği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer reaktif oksijen türleri ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen özellikle fotokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir^{163,176}.

Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) ve nitrojen dioksit ($\text{NO}_2^\cdot$): Nitrik oksit ve nitrojen dioksit eşleşmemiş elektronları ile birer radikaldirler. Nitrojen dioksit, nitrik oksitin oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir. NO_2 oldukça zehirli ve çok güçlü bir oksidandır. Oksijen redüksiyonu sırasında NO_2 'ye maruz kalması durumunda araşidronik asit metabolizmasının NO_2 konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Düşük miktarda NO_2 'nin araşidronik asit metabolizmasını büyük oranda artırdığı gözlenmiştir^{172,177,178}.

Nitrik oksit L-arjinin amino asitinden in vivo olarak üretilmektedir. NO kokusuz, renksiz ve az indirgenebilen oksidan bir gazdır. Son yıllarda radikal olan nitrik oksit üzerinde oldukça fazla durulmaya başlanmıştır. Nitrik oksit eşleşmemiş elektronları sayesinde süperoksit, tiol grupları ve nitrojen dioksit ile hızlı reaksiyonlar oluşturmaktadır. Diğer radikallerle birlikte diabetes mellitus, septik şok, kalp

bozuklukları, Alzheimer hastalığı ve gastrik ülserlerin oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir^{172,178,179}.



Diğer Serbest Radikaller: Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($\text{R}^\cdot$), peroksil radikalleri ($\text{ROO}^\cdot$), alkoksil radikalleri ($\text{RO}^\cdot$), tiyol radikalleri ($\text{RS}^\cdot$) gibi önemli serbest radikallerde oluşabilir. Bunlardan özellikle polidoymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol radikalleri de tekrar oksijenle reaksiyona girerek sülfenil ($\text{RSO}^\cdot$) yeva tiyol peroksil ($\text{RSO}_2^\cdot$) vb. gibi radikalleri oluşturabilirler¹⁴¹.

2.2.3. Serbest radikal kaynakları:

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

Eksojen radikal kaynakları:

- İlaç oksidasyonları
- Radyasyon
- Güneş ışığı, UV-ışınları
- Sigara dumanı, egzoz gazları
- Kükürtdioksit
- Alışkanlık yapan maddeler

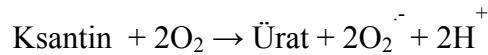
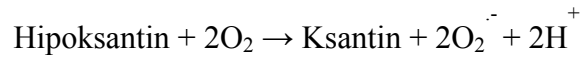
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksitler, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotikler.
- Stres: Stres katekolamin düzeyini artırır ve artan katekolaminlerin oksidasyonu ile serbest radikal oluşumu gözlenir^{139,140,163}.

Endojen radikal kaynakları:

Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Normal ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon reaksiyonları ile serbest radikalleri oluşturur^{180,181}.

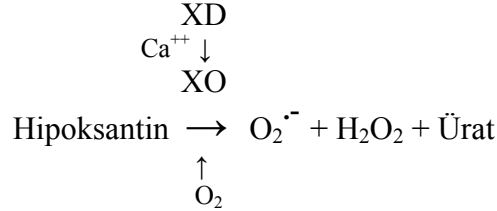
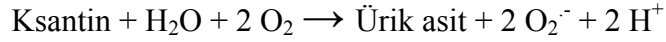
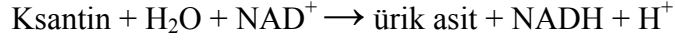
Enzimler ve proteinler: Birçok enzimin katalitik çevrimleri sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, serbest radikal oluşumuna neden olurlar^{151,163}.

Ksantin oksidaz normalde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürat'a oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir^{141,152,163}.



Hipoksantin- ksantin arasındaki bu tepkime sonucu oluşan süperoksitin yarattığı en büyük hasar vasküler sistemdedir. Fakat yapılan araştırmalar ksantin oksidaz enziminin barsak, akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda da hasara neden olduğu gözlenmiştir^{147,154}.

Normalde NAD bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal oluşumuna neden olmaz. Ancak ilk iskemi atağından sonra hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası oluşturma eğilimine girer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması proteazların miktarı artsa bile devam eder. Bu sırada hücre ksantin dehidrogenazın (XD) ksantin oksidaz (XO)'a dönüşümüne izin verir. Bu oluşan hücre içi olayların sonunda XD enzimi dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşür ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalinin üretimine neden olur. Oluşan süperoksit radikalleri hızlı bir şekilde hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit güçlü bir radikal olmasa da, Fe^{+2} varlığında fenton reaksiyonu oluşturarak güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur^{75,146,165}.



Aldehit oksidaz yapı itibarıyla ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğunu da aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler¹⁸².

Mitokondriyal elektron transferi: Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynaklarından biri elektron taşıma sisteminden (ETS) sızan elektronlardır. Mitokondriyal ETS'den elektron iki yerde sızmaktadır. Birincisi, nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat (NADH)-dehidrogenaz basamağında, ikincisi olarak da koenzim Q ya da ubikinon basamağında elektron sızması görülmektedir. ETS'nin son basamağında elektronların O_2 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi

oksijenin %97-99'unu harcayarak suya indirger. Ancak O_2 'nin %1-3'ü elektron transport zincirinden sızan elektronlarla bir araya gelerek süperoksit radikalinin üretimini arttırır. Böylece NAD^+ bağlı substratlar, süksinat, adenosin di fosfat (ADP) ve oksijen gibi endojen faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretimine etki eder^{75,41,145,163}.

Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri:

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

Peroksizomlar: Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu organeldeki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar O_2^- üretmeden, bol miktarda H_2O_2 üretimine sebep olurlar. Ancak katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir^{111,170}.

Plazma membranı: Plazma membranı serbest radikal üretimi için kritik bir yer oluşturmaktadır. Ekstraselüler olarak üretilen serbest radikaller diğer hücre komponentlerine ulaşmadan önce plazma membranını geçmesi gerekir. Bu geçiş sırasında membranda toksik reaksiyonların oluşmasına da neden olabilirler. Membranda yer alan fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler ve membran proteinleri serbest radikallerden çabuk etkilenirler. Lipid peroksidasyonu veya yapısal proteinlerin oksidasyonu sonucu membran permabilitesinde bozukluklar meydana gelmektedir

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

Serbest radikallerin nonfagositik hücre membranlarında NADPH-oksidad aracılığı ile üretiminin serbest radikal oluşumunun önemli bir kaynağı olarak görülmektedir^{136,163}.

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

Serbest radikal üretimini bazı toksik maddeler artırabilir. Bu maddeler dört gruba ayrılır^{150,170}.

1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.

2- Toksin bir serbest radikale metabolize olabilir. Örneğin toksik bir madde olan karbontetra klorür (CCl_4) karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil (CCl_3) serbest radikale dönüştürülür. Bu radikalın oksijenle reaksiyona girmesi neticesinde meydana gelen peroksil radikali güçlü lipid peroksidasyonu başlatıcıdır.

3- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun en basit örneği paraguattır.

4- Toksin antioksidant aktiviteyi düşürebilir. Örneğin parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından glutatyonla reaksiyona girerek ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

2.2.4. Serbest radikallerin etkileri:

Serbest radikaller etkilerini özellikle canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip olan DNA, yağlar, proteinler ve karbonhidratlara saldırarak gösterirler. Mitokondride oksijenli solunum sonucunda meydana gelen serbest radikallerin alveolar epitel tabakada ve DNA ya zarar vererek yapısal ve metabolik çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir ^{75,137,163,183}.

Membran lipidleri üzerine etkileri: Membranlar üzerindeki birçok bileşik ve molekülün serbest radikallerden etkilenmesine rağmen, radikallerin en belirgin etkileri yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatmaları olarak bilinir. LPO, polidoymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam eden bir çok biyolojik yapıda hasarlara neden olan reaksiyon sürecidir. LPO membranlarda oluşturduğu yıkıcı etkisi genellikle reaksiyon sırasında açığa çıkan $\cdot\text{OH}$ radikalinin membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür ^{75,163,184,185}.

Lipid peroksidasyonu başlatan ilk hareket membran ya da polidoymamış yağ asitlerinin içerdiği metilen grubundan ($-\text{CH}_2-$) bir hidrojen ($\text{H}^\cdot$) atomunun çıkartılması ile başlar. Böylece tek elektron içeren $\text{H}^\cdot$ 'nin uzaklaştırması sonucu karbon merkezli $-\text{CH}^\cdot-$ lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Bir dizi değişikliğe uğrayarak molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu

lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan $H^{\bullet}$ parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam ederek zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur^{75,139,163,172}.

Lipid hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir. Ayrıca lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizörlüğünde yıkılması sonucu çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. Bu sayede MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarlı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler^{150,164,186,187}. LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder¹⁷². LPO sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir¹⁸⁸. Bunlar kısaca:

- 1- Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan lipid hidroperoksitleri biomembranlar üzerinde yerleşmiş halde bulunan bazı enzimleri enzimleri inhibe eder.
- 2- Tiyo gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerindeki protein-lipid ilişkisini bozar

- 3- Membranın yapı taşlarından olan lipidlerin akışkanlığını bozar
- 4- Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli yapısal moleküllerde bozulmalara neden olurlar.

Proteinler üzerine etkileri: Proteinler, lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Proteinlerin radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin (PCO) ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinlerde parçalanma, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal fonksiyonlarında bozukluklar ve enzim aktivitelerinde aksaklıklar meydana gelir^{75,163,189}.

Proteinlerin çok farklı şekillerde modifikasyona uğramasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirteci yoktur. Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit miktarı, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifikdir. Bazı oksidatif protein modifikasyonları ise geniş çaplı özellik taşır ve çok sayıda amino asitte değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir. Spesifik modifikasyonlara tirozin'nin ditirozine dönüşümü, geniş çaplı modifikasyonlara ise arginin, lizin ve tirozin amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir^{190,191}.

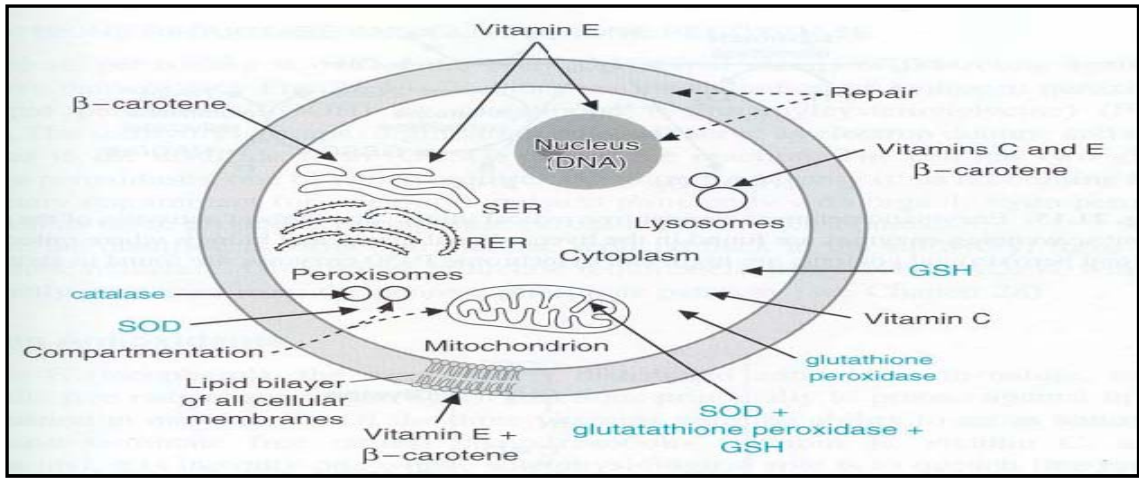
DNA üzerine etkileri: İyonize edici radyasyondan kaynaklanan hücre ölümünün başlıca nedeni olarak nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girmesi ve bu reaksiyon sonucunda DNA’da mutasyona ve hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan melanoaldehit (MDA)’in nadirde olsa DNA’da mutasyona sebep olduğu, beslenme ve yaşam şekli gibi faktörlerle bir araya gelerek kanser ve genetik bazı hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir^{192,193}.

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA’nın yakınında meydana gelirse mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer ve DNA hasarına neden olurlar. Hidroksil radikali singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer^{194,195}. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Reaktif oksijen türleri, DNA’nın oksidatif hasarı sonucu karsinogenesis ve çeşitli hastalıklara neden olabilir^{75,111,163,193,196,197}.

2.2.5. Antioksidan savunma sistemleri

Canlılar serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranının da etki gösteren birçok koruyucu mekanizmaya sahiptirler. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engelleyerek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. İşte canlı

organizmaların oluşturduğu bu sisteme antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar denilmektedir. Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmakla beraber serbest radikal oluşumunu engelleyen ve mevcut radikalleri etkisiz hale getirenler veya enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilir (Şekil3).



Şekil 3. Genel anlamda antioksidan sistem elemanlarını bir arada gösteren şema¹⁹⁸.

2.2.5.1. Endojen (Doğal) antioksidanlar:

a. Primer antioksidanlar (Enzimler):

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD'nin aktivitesi yaş artışıyla beraber artar. SOD yaklaşık olarak bütün canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu-ZnSOD, extraselular etki gösteren ECSOD ve mitokondri de bulunan tetramerik Mn ihtiva eden Mn-SOD izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'nin tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler¹⁹⁹⁻²⁰¹.



Süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bu enzim ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda insan eritrositlerinde de tesbit edilmiştir. Birçok deney sisteminde çalışılan bu enzimin ksantin-ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiği görülmüştür. Hemen hemen bütün canlılarda bulunan ve süperoksit gibi oldukça saldırgan bir radikalın etkisini ortadan kaldıran SOD'nin canlılarda önemli roller üstlendiği ve yaşamsal etkiye sahip olduğu düşünülmektedir^{75,111,163,202,203}.

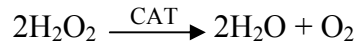
Cu-Zn SOD; ilk kez 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Cu-Zn SOD, hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32000 Dalton'dur. Birbirinin aynı olan iki alt ünitelerden meydana gelir. Her alt ünite bir Cu atomu ve bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetilenmiş terminal amino grubu bulunduğu tesbit edilmiştir^{180,202}.

Mn-SOD; prokaryotik hücreler molekül ağırlığı 40000 dalton olan, birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan enzimdir. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, ancak 80000 molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının pek çok ortak özelliği primer yapıları da birbirine çok benzerdir. Ancak aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur²⁰⁴.

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD (FeSOD) bulundurur²⁰⁵. Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte

incelenmesi gerektiği ve hatta iki enzimin bir kompleks haline getirilip fenton reaksiyonu sonucu oluşan radikallerin giderilmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir^{111,203,206}.

Katalaz (CAT): Katalaz, tüm canlı hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört tane alt grup içeren ve her bir alt grubu 60,000 dalton ağırlığında olan enzimdir. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizlemektir^{75,163,111,203,207,208}.

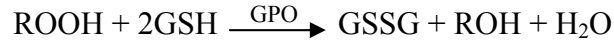
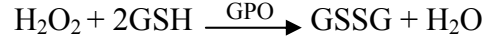


Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda lokalizedir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır^{170,209,210}.

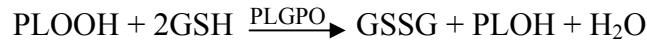
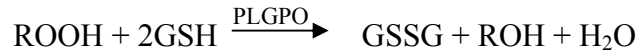
Glutasyon peroksidaz (GPO): Glutasyon peroksidaz enziminin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir^{75,111,163,211,212}.

Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. GPO, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında

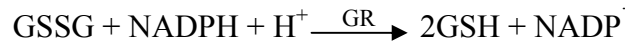
yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur^{213,214}. GPO, aşağıdaki reaksiyonları katalizler^{111,211,215}.



Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPO) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGPO membranın peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar^{216,217}.



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



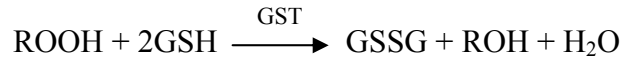
GPO'in, hücredeki dağılımı, GR'ye bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur²¹⁷.

Glutatyon s-transferaz (GST): “Selenyuma bağlı olmayan GPO” olarak adlandırılır. GST'ler, sistenin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere glutatyonu aktaran

proteinlerdir. *E. coli*'den insana kadar çok çeşitli türlerden GST saflaştırılabilirken ençok da sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır²¹⁸.

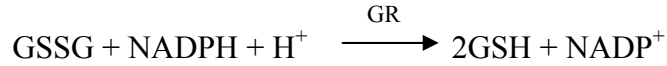
GST'ler başta araşidonik ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere LPO'lara karşı Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi koruyucu mekanizma oluştururlar²¹⁹.

GST'ler antioksidant aktivitelerine ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahip GST'lerin tüm canlı hücrelerde bulunması hayati önemlerinin bir göstergesidir. Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak, yabancı maddeleri glutatyonda ki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir ve daha ileri bir ürüne metabolize olabilirler. GSH'den glutamat ve glisin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür²¹⁹.



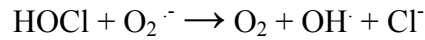
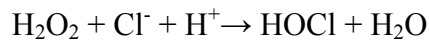
Glutasyon redüktaz (GR): Glutasyon redüktaz 50.000 daltonluk alt birimlere sahip bir dimerdir. Görevi yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirmektir. Bu indirgenme işlemi sırasında NADPH'dan gelen elektronlar okside glutasyonun disülfid bağına direkt olarak transfer edilemezler. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan fenil adenin difosfat (FAD)'a transfer edilirler. Daha sonraki alt birimlerdeki 2 sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyona aktarılmış olurlar. Her bir subunit 3 tane yapısal alan içerir, bunlar: FAD bağlayıcı olan, NADPH bağlayıcı olan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı ve

NADP⁺ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrojenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara benzerler. FAD ve NADP⁺'nin izoalloksozin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde geniş ölçüde aralarında bağlanırlar. Oksidize glutatyon için bağlayıcı alanın bir alt biriminin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği belirtmek gerekir²²⁰.



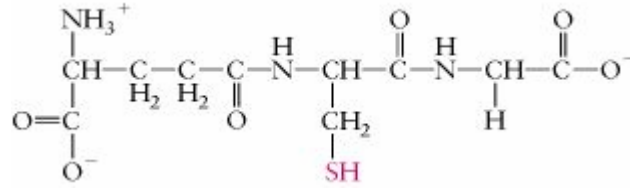
Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu ise, GR'nin GSSG'yi GSH'a çevrimi için gereken NADPH'ı sağlar²²¹.

Miyeloperoksidaz (MPO): Nötrofil granüllerde bol miktarda bulunan MPO enzimi H₂O₂'den hipoklorik asit (HOCl) oluşturmak üzere etki eder. Asidik pH oluşumuna bağlı olarak MPO aktivitesi artmakta ve membranı kolayca geçen H₂O₂ bakteriye toksik etki yapmakta ya da hidroksil (OH[•]) radikaline dönüşmektedir. Bu tepkimede HOCl yer almaktadır. H₂O₂ ile MPO Cl⁻ iyonlarını HOCl'ye dönüştürmektedir. Çok reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir^{11,221,222}.

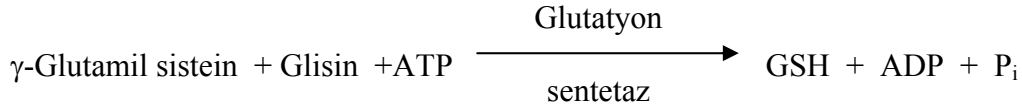
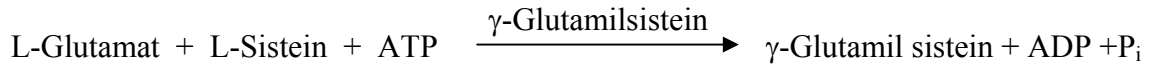


b. Sekonder antioksidanlar:

Glutatyon (GSH): GSH, birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir (Şekil 4). GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır²²³.



Şekil 4. Glutatyon'un molekül yapısı



GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutatyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPO enzimi katalizörlüğünde H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidant etki sergiler ve H_2O_2 'yi alyuvarlardan uzaklaştırır. H_2O_2 birikmesi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azaltabildiğinden bu tepkime çok önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ile süperoksit oluşurken diğer dokularda ise bu sitokrom P-450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşur^{111,221,223,224}.

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH'yi peptid bağından dolayı düşük enerjili bileşikler arasında kabul edebiliriz. GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfid-sülfidril değişimi

tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan hidrojen peroksidi uzaklaştıran enzim GPO'ye substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'a indirgenerek GSH miktarı düzenlenir^{222,225}. Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. Örneğin GPO ve CAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden askorbik asit, α - tokoferol ve β -karoten gibi diyetle alınan antioksidantlarla ilgilidir^{75,111,163,226}.

Birçok enzimin şayet sistein tiyol grubu (–SH) oksitlenecek olursa inaktive ya da inhibe olur. GSH, Gama-glutamilsisteinilglisin, duyarlı ve esansiyel –SH gruplarını içeren enzimlerin doğal aktivatörüdür. Glutasyon hücrede bir ko-enzimden ziyade var olan amino asit öncüllerinden kolayca sentezlenen doğal bir antioksidandır. Fenilalanin ve tirozinin oksidatif yıkımında görev alan maleilasetoasetat izomeras da dahil olmak üzere glutasyon çok az sayıda enzim için spesifik bir koenzimdir. Glutasyonun hücre içi değişimi kontrol edilerek birçok enzimin aktivitesi düzenlenebilir²²⁵.

Diğer sekonder antioksidanlar: Canlı vücudunda oldukça az miktarlarda bulunmasına rağmen vitaminlerin vücuttaki görevleri oldukça fazladır. Vitaminlerin bir bölümü, besinlerle aldığımız karbonhidrat, yağ ve proteinden enerji ve hücrelerin oluşması ile ilgili biyokimyasal olayların düzenlenmesine yardımcı olurlar. A, E ve C vitaminleri vücut hücrelerinin serbest radikallerin meydana getirebileceği hasarları önleyerek hücrelerin normal işlevlerini sürdürmeleri ve bazı zararlı maddelerin etkilerinin azaltılmasında (antioksidan etki) yardımcı olurlar. Antioksidanlar, hücremizi, serbest radikalleri nötrleştirerek korurlar. Bunlar uyum içerisinde çalışan bir takım gibi radikalik saldırılara karşı koyarlar. β -Karotenin, askorbik asitin ve tokoferolün

antioksidan etkileri yıllardan beri bilinmektedir. β -Karoten organizmada A vitamininin parsiyal oksijen öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidan olarak görev yapar. Bununla beraber, 15 torr'da 150 torr'dan daha iyi antioksidan olduğu, 760 torr'da ise prooksidan olarak davrandığı bildirilmiştir. Hücrelerin dışında β -Karoten nöbet tutarken; hücre duvarından, içeri girmek isteyen saldırganlara karşı savunmayı ise eser elementlerden selenyumun da yardımıyla E vitaminini üstlenmiştir^{163,227}.

Suda çözünen vitaminlerden birisi olan askorbik asit yapı itibariyle en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Yüksek yapılı hayvanların pek çoğu ve bitkiler kolayca askorbik asidi glukozdan sentezleyebilmektedirler. Hücre içerisindeki C vitamini serbest radikallere son darbeyi vurmakta ve bu şekilde radikallerin tesirleri ortadan kaldırılmaya çalışmaktadır. E vitamini yağda çözünen bir vitamin olup temel görevi lipitleri oksidatif hasardan korumaktır. İnce barsaklardan kolayca emilir ve vücudun tüm dokularına taşınarak hücre membranları etrafında depolanır. Böylece hücre membranında koruyucu bir tabaka oluşturmuş olur^{75,163,228-230}.

2.2.5.2. Ekzojen antioksidanlar:

1. Ksantin oksidaz inhibitörleri: Tungsten, allopürinol, oksipürnol, folik asit ve pterin aldehit
2. Soya fasulyesi inhibitörleri: Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.
3. NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar, cetiedil ve difenilin iyodonyum

4. Recombinant süperoksit dismutaz
5. Troloks-c: E vitamini analogu
6. Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler: Glutasyon peroksidaz aktivitesini artırır. Bunlar; Ebselen ve asetil sisteindir.
7. Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol ve albümin
8. Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferroksamin ve seruloplazmin
9. Nötrofil adezyon inhibitörleri
10. Sitokinler:
 - Tümör Nekroz Faktör (TNF)
 - Interlökin 1
11. Barbitüratlar
12. Demir şelatörleri²³¹.

2.2.5.3. Gıda antioksidanları:

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Etoksiguin
- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
- Propilgalat
- Sodyum benzoat
- Fe-süperoksit dismutaz^{163,231}.

2.2.6. Antioksidan etki tipleri:

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler^{75,111,163,222,227,231}.

1. Toplayıcı etki (scavenging etki): Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya reaktif olamayan yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.
2. Bastırıcı etki (quencher etki): Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen atarak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkiye bastırıcı etki denir.
3. Onarıcı etki (repair etki): Genellikle DNA'daki hasarların tamir edilmesinde bu etki sürekli geçerlidir.
4. Zincir kırıcı etki (chain breaking etki): Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir.

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

2.3. Likenler

Likenlerle ilgili ilk bilgilere mitolojide rastlıyoruz: Bugün *Bryoria fremontii* olarak bildiğimiz liken türü Coyota destanıyla karşımıza çıkıyor: Efsaneye göre Coyota (başka bir versiyonda Mourning Dove), oğluyla ormanda yürürken ölü taklidi yapan kumrulara rastlar. Oğlunu bu kumrulara bağlayıp yüksek bir çam ağacına çıkarır. Ancak, o ağacın üstündeyken kumrular uçmaya başlar ve oğlunu da götürürler. Coyota ağaçtan atlamak ister ama uzun saçları ağacın dallarına dolandığı için kıpırdıyamaz.

Bunun üzerine bir süre boşlukta sallanır sonra bıçağıyla saçlarını keser. Yere indikten sonra ağaçtaki saçlarına bakıp “Benim değerli saçlarım, ziyan olmayacaksınız; bundan sonra insanlar tarafından toplanacaksınız ve yaşlı kadınlar sizlerden yiyecek yapacaklar...” der²³².

Yaklaşık 400 milyon yıl öncesinden beri var olduğu bilinen likenler, halen yaşayan en yaşlı ve en uzun ömürlü canlılar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. *Hypogymnia physodes* gibi bazı özel türlerin en az 25 milyon yıldır bulunduğu düşünülmekte hatta bu rakamın 70 milyon yıl olabileceğine inanılmaktadır²³³⁻²³⁹. Likenlerin Avrupa ülkelerinde de 16. yüzyıldan itibaren çeşitli hastalıkların tedavisinde dekoksiyon (demleme) veya infüzyon şeklinde kullanıldığına dair birçok kanıt bulunmakta olup hatta yaşlanmanın önlenmesinde likenlerin kullanılabileceği düşünülmüştür²⁴⁰. Bilindiği gibi Lokman hekimin ölümüne çare bulduğu rivayet edilmektedir. Bundan yola çıkarak likenler konusunda çalışmalar yapan bazı Türk likenologları; rivayet edilen bu bitkilerin likenler olduğuna inanmaktadırlar. Liken kelimesi ilk defa M.Ö. IV yüzyılda Yunanlı bilim adamı Theophrastus tarafından kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda liken olarak adlandırılan bitkilerin gerçekte liken olmayıp bu terimin “ciğer otları” için kullanıldığı anlaşılmıştır. Likenler önceleri bir tek bitki olarak biliniyordu. Schwender ve Trebox’un yaptığı çalışmalar sonucu likenlerin mantarlar ile alglerin birleşerek morfolojik ve fizyolojik bir bütün halinde meydana getirdikleri ortak yaşamlı (simbiyotik) canlılar (Likenler bitki değildir) oldukları açıklanmıştır¹²¹.

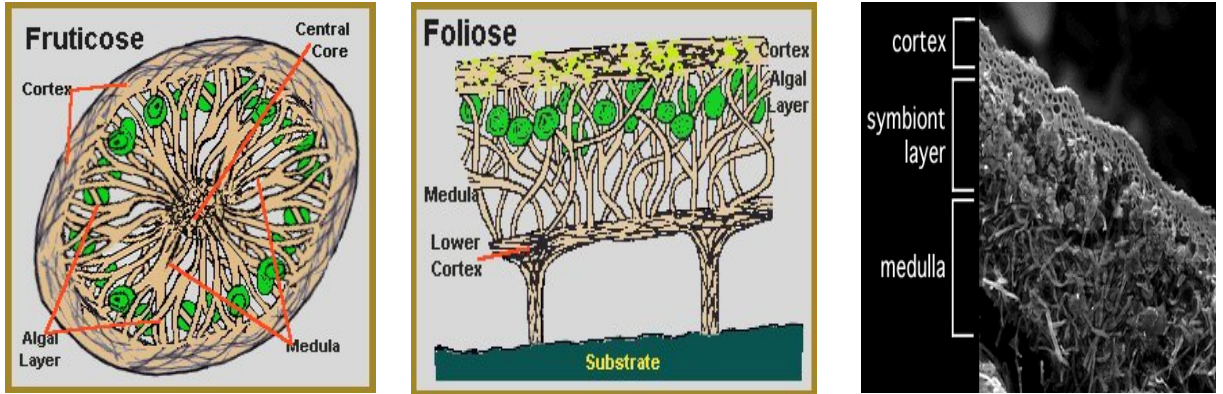
Likenler (Lichenes), mikobiyont (fungal partner) ve fotobiyont (fotosentetik partner) olarak tanımlanan mantar ve fotosentetik yeşil alglerin (bazen siyanobakterlerin) simbiyotik birlikteliği ile oluşan kompleks canlılardır²⁴¹. Şekil ve

yaşayış bakımından kendilerini oluşturan alg ve mantarlardan tamamen ayrı bir yapı gösterirler. Renksiz bir mantar hifinden oluşan tallusun yapısına katılan fotosentetik canlı (fotobiyont), genellikle yeşil alg ya da bir cyanobakteridir; fakat bazı sarı-yeşil alglerden ve kahverengi alglerden de oluştukları bilinir. En çok Cyanophyta ve Chlorophyta'ya ait cinsler ve Xanthophyta ve Phaeophyta'dan bazı alg türleri görülür. Mantarlarda ise genellikle Ascomycetes ve az olarak Basidiomycetes'e ait cinsler görülür^{242,243}.

Günümüzde likenlerin ikili yapısı büyük ölçüde biliniyor olmasının yanı sıra, bazı likenlerin üç ya da daha fazla ortak içeren simbiyotik canlılar olduğu da bilinmektedir²³⁶. Alg ve mantarın birbirleri ile birleşmeleri farklı şekillerde olabilir. Eğer alg ve mantar dağılımı homojen şekildeyse bu likenler; "Homeomerik liken", heterojen bir dağılım varsa "Heteromerik liken" olarak isimlendirilirler²⁴⁴.

Önceleri mantarın klorofil içermemesi nedeniyle bir parazit gibi alglerden yararlandığı düşünülmesine karşın daha sonraları bu açıklama önemini yitirmiştir. Mantar ortak yaşam içinde alg'ın fotosentez yapabilmesi için ortamdan su ve suda erimiş mineral maddeleri, hifleri yardımı ile tespit etmektedir¹²¹. Likenleri oluşturan alg ve mantarlar (funguslar) arasında bazı fizyolojik iş bölümleri vardır. Funguslar, kendi karbohidratını üretemez, alg ve cyanobakterilerden hazır olarak alırlar. Bunlar da ekosistem için çalışır ve fungus için glukoz üretirler. Simbiyotik organizmalardan alg, klorofil taşıdığından fotosentez yapar ve birliğin karbohidrat gereksinimini karşılar. Mantar ise su ve madensel maddelerin alınmasında görev alır. Likenlerde metabolik aktivite su, ısı ve ışıkla değişkenlik gösterir. Su içeriği %65–90 arasında olduğunda fotosentez oranı artar, 15–20°C fotosentez için en uygun sıcaklıktır. Depo maddesi olarak nişasta bulunur^{242,244}. İki organizma da tek başlarına yaşayamayacakları yerlerde

beraber kolonize olup yaşayabilirler (Şekil 5) ²³⁶. Tallus alg hücrelerinin mantar hifleri arasına homojen ya da tabaka halinde yerleşimi ile meydana gelmektedir. Bu simbiyoz yaşam örneğinde üreme daha çok tallustan oluşan vejetatif üreme birimleri ile olmakta, eşeyli üreme sadece mantar üyelerinde görülmektedir ¹²¹.



Şekil 5. Likenlerin simbiyont yapıları

Temiz hava olmak şartıyla, likenler içerisinde kısa ömürlü olan türler genellikle nadir bulunmaktadır. Günümüzde çevre kirliliği, küresel ısınma, ozon tabakasının delinmesi vb. çevre sorunları dikkate alındığında likenlerin yaşam ömrü azalmış olsa da, likenler uygun şartlar altında (temiz hava, yeterli nem ve ışık vb.) yine de 1000 yıldan fazla hayatta kalabilirler. Mezar taşları ve bazı tarihi eser anıtların yaşları ile heyelan ve depremlerin meydana geliş tarihleri likenler incelenerek belirlenebilir ²⁴⁵. Likenlerde yıllık büyüme bir veya birkaç milimetreden bir kaç santimetreye kadar değişir. Daha hızlı büyüyen türler biyokütlelerini yılda %20–40 artırabilirler ve özellikle siyanolikenler baskınsa, bulundukları ekosistemin mineral döngüsünde önemli bir rol oynayabilirler ^{233,234,236-238}. Likenler, Dünyanın hemen her yerinde yayılış gösterirler. 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^{126,236}. Dünya üzerindeki toprak ototrofları içerisinde likenler minyatür olarak ilginç varyasyonlar gösterirler. Renk olarak fantastik bir turuncu, sarı, kırmızı, yeşil, gri, kahverengi ve siyah, ihtişamlarını sergilemektedir. Ebat olarak 1mm²'den, ağaç dallarında 2 m'ye kadar sarkan, uzun, asılı formlar olmak üzere değişik boyutlarda bulunabilirler. Ağaçlar ve diğer bitkiler üzerinde epifit (yalnız konum ve destek sağlamak için başka bitki üzerinde gelişen bitki) olmalarının yanı sıra, çıplak toprak ve kaya yüzeylerinde de sıkça kolonize olurlar. Kayalar üzerinde en açık likenler yüzeyde epilitik (topluluklar hâlinde taş ya da kayalar üzerinde yaşayan algler) olarak ortaya çıkarlar ancak diğerleri kaya yüzeyine gömülü yani endolitik (asit salgılayarak bulunduğu ortamı parçalayan)'tır^{236,246}.

Likenlerin sekonder ürünleri olan liken asitleri likenlere doğadaki karasal süksesyonda öncül canlı olma özelliği kazandırmıştır¹²¹. Kumul, kayalık, killi, bataklık ve çakıllı olan ortamlar öncelikle likenler tarafından işgal edilir. Bunlara öncü popülasyonlar denir. Likenler ortamın toprak kalitesini yükseltir. Tutundukları kayaları salgıladıkları maddelerle yavaş yavaş parçalayarak kaya üzerinde ince bir toprak tabakası oluştururlar. Daha sonra liken parçaları ve orada gelişen karayosunlarının da katılmasıyla organik maddenin sürekli artması sonucu daha yüksek bitkilerin gelişmesine olanak sağlarlar^{78,236,244,247}.

Likenler doğal abiyotik şartlara (canlılardan kaynaklanmayan ortam şartlarına) çok dayanıklıdır. Ancak diğer bitkiler ile rekabete dayanamazlar²³⁶. Günümüzde 17000'den fazla türe sahip olduğu bilinen likenlerin, ülkemizdeki araştırmaları henüz tamamlanmamış olup bölgemiz ile ilgili yapılan çalışmalar ise şimdilik sınırlı olmasına karşın gün be gün artmaktadır²⁴⁸⁻²⁵⁰. Diğer yandan Ülkemizde 9000'e yakın bitki

türünün doğal olarak yetiştiği ve bunların kimyasal içerikleri hakkındaki çalışmaların yeterli olmadığı da vurgulanmaktadır²⁵¹. Bitkisel organizmalar içerisinde incelenen likenler de antik çağlardan beri morfolojik özelliklerine dayanılarak (örneğin: akciğere benzeyen *Lobaria pulmonaria*) o organdaki hastalıkların tedavisinde yararlanılmaya çalışılmış ve tıbbi özellikleri itibarıyla değerlendirilmişlerdir^{232,246}.

Fungus (mycobiont) ve alg (phycobiont) partnerlerinin oluşturduğu simbiyotik bitkiler olan likenler, yavaş üremelerinden kaynaklanan rekabette zayıf kalma dezavantajlarını, ürettikleri özel maddeler sayesinde telafi ederler. Özellikle aromatik yapılı sekonder metabolitler, onların en güçlü antagonistik maddelerini oluşturmaktadır. 100'e yakın liken türünün farklı renklerde organik tekstil boyalarının imalinde kullanıldığı bildirilmiştir²⁵², diğer yandan likenlerin hem kozmetik sanayisinde ham madde olarak hemde hava kirliliğini belirlemek amacıyla kullanıldıkları da kaydedilmiştir^{104,232,242}.

Her ne kadar likenlerin global krizlerde besin kaynağı olarak kullanılabileceği teklif edilmişse de, doğal yolla üremeleri çok yavaş olduğundan, bu tür bir değerlendirmenin ekonomik olmadığı ifade edilmiştir²⁵³. Likenler, insanoğluna hava kirliliği ile doğaya verilen zararın seyri hakkında ipuçları verebilmektedir. Su ve mineral maddeleri alabilecekleri kök benzeri yapılara sahip olmadıkları için bu ihtiyaçlarını tallus yüzeyleri ile karşılamak zorundadırlar. Bu nedenle atmosferde bulunan kükürt, azot ve florlu kirleticiler yanında ağır metaller ve radyasyon liken bünyesinde birikip, likenin gelişimini olumsuz etkilemektedir. Hava kirliliğine karşı verdikleri bu tepkilere dayanarak belli liken türlerine; kirleticilere duyarlı, kirleticilere dayanıklı ve kirlilik likenleri gibi isimler verilmiş ve yayılış durumlarına göre inceleme alanları kirlilik zonlarına ayrılmıştır^{127,254,255}.

Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri çok özel moleküllerden ileri gelmekte ve yapılan biyolojik aktivite ölçümlerinde liken metabolitlerinin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmekte ve ilaç özelliklerinin araştırılmasında önemli yer tutmaktadır⁷⁷. Likenlerin insanlardaki toksisitesiyle ilgili çok az sayıda veri bulunmakla birlikte, kaydedilmiş yan etkiler lokal tahrişler ve bazen konjunktivit (genel anlamda gözü koruyan zarın iltihaplanması) ile beraber meydana gelen alerjik deri iltihabı ile sınırlıdır. Likenlerin sebep olduğu alerjik kontakt dermatitis çok uzun zamandan beri bilinmekte ve bunun yaygın olmamakla birlikte liken bileşenlerine karşı duyarlılık potansiyelleriyle ilgili olduğu düşünülmektedir²⁵⁶.

Likenler, dünyada ve ülkemizde çok eski zamanlardan beri halk hekimliğinde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) birçok ülkedeki yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre, dünyada tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam tür sayısı 20.000 civarındadır²⁴⁸⁻²⁵⁰. Son yıllardaki araştırmalar, liken metabolitleri ve onların antimikrobiyal etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırmalar sonucunda 800'ün üzerinde liken metabolitinin yapısı aydınlatılmıştır^{77,246,256}. 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 saptanmıştır. Bunlardan özellikle protolikesterinik asit, pulvinik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asitin en yüksek antimikrobiyal etki gösteren liken maddeleri olduğu saptanmıştır^{246,256-258}. Öte

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

Likenlerde bulunan maddelerin çoğu asit özelliği gösterdiği için bunlara karakteristik olarak “liken asitleri” denilmektedir. Likenlerin kayaları parçalama özelliğini sentezledikleri bu asitler vasıtası ile gerçekleştirdiklerine inanılmaktadır. Likenlerin bu asidik maddeleri %1–5 oranında, liken ekstrelerinin ise çoğu zaman %25'lere varan oranlarda içermeleri bu maddelerin izolasyonunu kolaylaştırmakta, dolayısıyla da likenlerin bu yönüyle tohumlu bitkilerden daha fazla önem kazanmasına neden olmaktadır²⁴⁸. *Cladonia*, *Evernia*, *Cetraria*, *Usnea*, *Alectoria*, *Ramalina* cinsleri antibiyotik özelliğe sahip asitler yönünden önemlidir. Bu maddeler gram pozitif koklara, verem basiline ve difteri etkenine karşı etkilidir¹⁹⁶. Likenlerin primer metabolitleri yalnız algler tarafından fotosentezle sentezlenmektedir. Likenlere özgü çeşitli polisakkaritlerin yanı sıra çeşitli aminoasit, amin ve proteinler de likenlerden izole edilmiş primer metabolitlerdir^{246,259}. Likenler tarafından sentezlenen alifatik ve aromatik bileşikler ise sekonder metabolitler olup günümüze kadar 300'den fazla sekonder metabolitin saflaştırılmış ve yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak karakterize edilmiştir^{77,129,246}.

2.3.1. *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.

Sinonimleri: *Sticta pulmonacea* Ach.

Tallus kuru iken kahverengi, nemli halde parlak yeşil renkte, yapraksı yapıdadır (Şekil 6). Loplar (kenardaki çıkıntılar) derin oyuklu ve dalgalı retikulat (ağsı bir yapı) çukurlu, damarlı, bu damarların üzeri veya lop kenarları sored veya izidler ile kaplıdır. Alt yüzey gri ya da kahverengi, çoğunlukla tomentoz (keçemsi) yapı gösterir.

Apotesyuma ender rastlanır. Geniş yapraklı ağaç kabukları, silikat taşlar, karayosunları üzerinde, nemli yerler, özellikle fazla tahrip edilmemiş ormanlar ve hava kirliliğinin bulunmadığı yerlerde yaygındır. Borealden Akdeniz havzasının güneyine kadar yayılış gösterir. Ülkemizde genel olarak Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır¹²¹. *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya'nın dağlık kesimlerinde özellikle ağaçlarda yayılış göstermektedir.



Şekil 6. *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm'nın doğal ortamında çekilmiş resimleri.

Lobaria pulmonaria herhangi bir işleme gerek duyulmaksızın yenebilen likenlerin başında gelir. Önceleri Avrupada acı bira yapımında kullanılan *Lobaria pulmonaria*'dan²³² Fransa'da orman çayı adı verilen bir tür aromatik içki yapılmaktadır.

Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm'dan hazırlanan çay laksatif (barsak gevşetici) olarak da kullanılmıştır¹²⁶. *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm biranın mayalanmasında şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) yerine de kullanılmıştır. Bu liken ile yapılan biranın şerbetçi otu ile yapılan birayla tamamen aynı olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber bu biranın organizmayı daha çok uyuşturucu özelliğe sahip olduğu vurgulanmıştır¹²⁰. *Lobaria* Alaska'daki dağ keçileri tarafından, *Cetraria* ve *Cladonia* türleri ise pek çok aç hayvan tarafından tüketilir²³².

Veteriner homeopatisinde (benzeri benzerle tedavi), *Lobaria pulmonaria* gibi gıda ürünü olarak kullanılabilen türlerde ana tentür, oral veya parenteral kullanım için olmaktadır. Bu tentürün düşük konsantrasyonları insan homeopatisinde de kullanılır^{120,246}. Diğer yandan bazı ülkelerde yiyecek olarak kullanımının yanı sıra kozmetik sanayinde de kullanılmaktadır. Parfüm sanayinde koku verici olarak kullanılır¹²⁰. Kozmetik sanayiinde başta şampuan ve parfüm yapımında olmak üzere çeşitli kremlerin, makyaj malzemelerinin, pudraların ve hatta perukların yapımında da likenlerden yararlanılmaktadır. Örnek olarak, *Lobaria pulmonaria*, *Parmelia kamtschadalis*, *Parmotrema chinense*, *Parmotrema perforatum*, *Rocella fuciformis* türleri şampuan yapımında kullanılır²³². Parfümeride ve kozmetik preparatların hazırlanmasında likenlerden elde edilen ekstreler fiksator (sabitleyici) olarak kullanıldığından önemli maddeleri oluştururlar. En iyi fiksator *Evernia prunastri*'den elde edilir. Ayrıca *Lobaria pulmonaria* da bazı parfümlerin bileşimine girmekte, onlara hoş bir koku vermektedir²⁴⁸. Eskiden Kızılderililer hayvanların beyinlerini *Usneaavernosa* gibi likenlere sararak çubuk haline getirirler sonra da bunları hayvanların derilerinin tabaklanmasında kullanırlardı. Günümüzde de *Cetraria islandica*, *Lobaria*

pulmonaria gibi liken türleri de deri tabaklamada kullanılmaktadır. *L. pulmonaria* kahverengi ve mor renkli boya üretiminde ham madde olarak da kullanılmıştır²³².

Hava kirliliği için önemli biyolojik göstergeler olan likenler, havadaki kükürtdioksit ve diğer zehirli kimyasallara karşı çok duyarlı olduklarından dış görünüşlerinden havadaki kükürtdioksit derişimi belirlenebilir. Dolayısıyla herhangi bir bölgedeki kirlilik oranının belirlenmesinde *Lobaria pulmonaria*, *Chenotheca furfuracea*, *Usnea* türleri gibi likenler oldukça önemlidir²³².

L. pulmonaria liken türü halk tıbbında egzama, solunum sistemi ile ilgili hastalıklar ve artrit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tür Ortaçağda Avrupalılar tarafından akciğer dokusunun tedavisinde kullanılırdı. Günümüzde de akciğer hastalıklarının tedavisinde yararlanılmaktadır. Eskiden Kolombiya'da yaşayan Hesquiat halkı tarafından verem hastalığının tedavisinde kullanılmıştır²³². Bu türün ayrıca laksatif bir kremi de hazırlanmıştır¹²⁷. *Lobaria pulmonaria* egzama tedavisinin yanı sıra tüy dökücü olarak kullanılır. Ayrıca çocuklarda yüz soyulmalarında, yüzdeki açık renk lekelerin tedavisinde ve kaynatılmış hali de göz banyosunda kullanılır²³². *Lobaria pulmonaria* Tüberküloz tedavisinde, saçları güçlendirmek için, astım gibi akciğer hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Mide ağrılarına iyi geldiği de rapor edilmiştir. Ayrıca bu likenden elde edilen tonik, kan ve dolaşım sistemi için de tavsiye edilmektedir²³².

Bu likenin başlıca komponentleri giroforik asit, stiktik asit, norstiktik asit, konstiktik asit, theleforik asit, isidioforin, rizonaldehit ve atranorindir^{76,114,129}. Bunlardan giroforik asit anti-proliferatif etki göstermektedir¹³⁰. Bu likenden elde edilen bir polisakkaritin kemik iliği hücrelerini radyasyona karşı koruduğu ve hematopoetik kök hücrelerini desteklediği de belirlenmiştir¹³¹.

Diğer yandan araştırma grubumuz bu liken üzerinde yoğun bir şekilde çalışmaktadır. Ekip çalışmalarımızın ilkinde mevcut liken türünden değişik solvanlarla elde edilen farklı ekstrelerin antioksidan potansiyele sahip olduğu belirlenmiş¹¹⁵. Diğer bir çalışmamızda ise bu likenden elde edilen metanol ve aseton ekstrelerinin önemli antiülserojenik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir^{114,120}. Bu çalışmaları takiben aseton ekstresi üzerinde kromatografik yöntemlerle yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda saflaştırılan stiktik asit ve isidioforin isimli moleküllerin antiülserojenik ve antioksidan özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir¹¹⁴.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

İzolasyon, saflaştırma, karakterizasyon ve biyokimyasal ölçümlerde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company (Germany)'den, ülser deneylerinde kullanılan ilaçlar ise aşağıda listelendiği gibi farklı firmalardan temin edilmiştir;

İndometazin	: (Endol kapsül, 25 mg) Deva İlaç
Famotidin	: (Neotab tablet, 40 mg) Deva İlaç
Omeprazol	: (Demeprazol kapsül, 20 mg) Deva İlaç
Ranitidin	: (Ranitine tablet, 150 mg) Biofarma İlaç
Lansoprazol	: (Lansor kapsül, 30 mg) Sanovel İlaç
Sodyum pentotal	: (Pentothal sodium flakon, 500 mg) Abbot Lab.

3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

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

3.3. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar:

Kromatografik metodlarla yapılan fraksiyonlama, izolasyon ve saflaştırma çalışmalarında kullandığımız adsorbanlar aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Yöntem	Adsorban
Kolon Kromatografisi (KK)	Silikajel (Kieselgel 60. 70–230 mesh, Merck ve Fluka) Silikajel (Kieselgel 60. 200–40 mesh, Sigma-Aldrich) Sefadeks (Sephadex LH–20, Fluka)
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	Silikajel (Hazır plaka, Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 0,2 mm, Merck)

İTK da ayrılmış olan maddelere ait olan lekeler UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm de belirlendi. UV ışığında absorbans vermeyen maddeler ise vanilin-H₂SO₄ (%1) reaktifi püskürtülüp, 105 °C da birkaç dakika bekletilerek belirlendi.

3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları:

1. LPO Homojenat Tamponu (% 10 KCl):

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

2. LPO Ölçüm karışımı:

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

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

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

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

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

4. GSH Ölçüm Tamponu (200 mM pH 8.2, 0.2 mM EDTA içeren Tris-HCl Tamponu):
6.05 g Tris-HCl ve 0.0146 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 8.2'ye ayarlandı ve sonra hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlandı.

5. GSH miktarını ölçmek için gereken çözelti (10 mM DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid))):

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

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

7. SOD Ölçüm Karışımı:

A - 0.3 mM ksantin: 0.0018 g ksantin alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 40 ml'ye tamamlandı.

B - 0.6 mM EDTA: 0.0035 g EDTA alındı, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlandı (2 damla 5 M NaOH ile çözünür).

C - 150 μM NBT (Nitro blue tetrazolium) : 0.0024 g NBT alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.

D - 0.4 M Na_2CO_3 : 0.5088 g alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 12 ml'ye tamamlandı.

E -1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartıldı, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 6 ml'ye tamamlandı.

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

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

10. SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.8 mM CuCl_2): 0.0108 g CuCl_2 alındı, bir miktar saf suda çözöldü ve hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
11. CAT Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, %1 Triton X-100 içeren Fosfat Tamponu): 1.7 g KH_2PO_4 ve 2.5 ml Triton X-100 alınarak 200 ml saf suda çözöldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve sonra hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.
12. CAT Ölçüm Karışımı (40 mM, pH 7'de H_2O_2 içeren 50 mM Fosfat Tamponu): 1020 μl H_2O_2 ve 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözöldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.0'ye ayarlandı ve sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı.
13. GPO Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, 30 mM KCl içeren Fosfat Tamponu): 0.6804 g KH_2PO_4 ve 0.2236 g KCl alınarak 1-2 damla 5 M NaOH ile 90 ml saf suda çözöldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
14. GPO Ölçüm Karışımı:
 - A - 50 mM Fosfat tamponu: 0.6804 g KH_2PO_4 alınarak bir miktar saf suda çözöldü ve sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
 - B - 1 mM EDTA: 0.0029 g EDTA alınarak bir miktar saf suda çözöldü ve sonra hacmi 10 ml'ye tamamlandı (1 damla 5 M NaOH ile çözünür).
 - C - 1 mM GSH: 0.0031 g GSH alındı, bir miktar saf suda çözöldü ve sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
 - D - 0.2 mM β -NADPH: 0.0016 g alındı, bir miktar saf suda çözöldü ve sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
 - E - 1 mM NaN_3 : 0.0065 g tartıldı, bir miktar saf suda çözöldü ve sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
 - F - 1 EU/ml Glutasyon Redüktaz: 5.2 μl GR alındı, bir miktar saf suda çözöldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
15. GPO enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.25 mM H_2O_2): 25.53 μl H_2O_2 alındı, bir miktar saf suda çözöldü ve hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
16. GST Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu):

1.7 g KH_2PO_4 ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

17. GST Ölçüm karışımı (0,11 M Fosfat Tamponu):

3.02 g KH_2PO_4 alınarak 75 ml saf suda çözüldü, pH'ı pH metre kullanılarak 6.5'e ayarlandı ve son hacim 200 ml olacak şekilde saf su ile seyreltilti.

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

B - 30 mM CDNB: 0.03 CDNB(1-chloro-2,4-dinitro-benzene) tartıldıktan sonra az bir miktar %99.9 saflıktaki etil alkolde çözüldü ve hacmi aynı etil alkol ile 5 ml'ye tamamlandı.

18. GR Homojenat Tamponu (50 mM K-Fosfat Tamponu, pH 7.8):

1.7 g KH_2PO_4 alınarak 200 ml saf suda çözüldü, pH'ı pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

19. GR ölçüm karışımı: sırayla 3 ml'de

A - 0,2 M Fosfat Tamponu (pH 7, 2 mM EDTA içeren): 0.02922 g EDTA ve 1.3609 KH_2PO_4 45 ml saf suda çözüldü, pH'ı pH metre kullanılarak 7,0'ye ayarlandı ve hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

B - 2 mM NADPH (MA, 833.4), 10mM Tris-HCl pH 7,0 içinde): 0.06057 g Tris alınarak 45 ml saf suda çözüldü, pH'ı pH metre yardımıyla HCl çözeltisi ilave edilerek 7,0'ye ayarlandı ve hacmi saf su ile 50 ml ye tamamlandı. 2 mM NADPH çözeltisini hazırlamak için 0.0083g β -NADPH alındı ve hacmi yukarıda hazırlanan Tris-HCl çözeltisi ile 5 ml'ye tamamlandı.

C- 20 mM GSSG (MA, 612,6) : 0.06126 g alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 5 ml'ye tamamlandı.

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

1.02 g KH_2PO_4 ve 0.75 g HTAB alınarak 125 ml saf suda çözüldü, pH'ı pH metre ile 6.0'a ayarlandı ve hacmi saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.

21. MPO Ölçüm karışımı 50 mM KH_2PO_4 pH 6'sı (MA, 136.09) olan 0.167 mg/ml o-dianizidin-HCl ve % 0.0005 H_2O_2 içeren 45 ml ölçüm karışımı):

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

B - % 0.0005 H₂O₂ (%30'luk tan) 45 ml için: 83.3 µl % 30'luk H₂O₂'den alınarak 500 ml ye tamamlanmış çözeltiden 4,5 ml alındı.

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

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

3.5. Liken Örneği

Bu araştırmada çalışma materyali olarak bölgemizde yeterli düzeyde elde edebileceğimiz bir liken türü olan *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm tercih edildi. Liken örnekleri, Giresun çevresinden 2007 yılının haziran-eylül aylarında muhtelif zaman aralıklarıyla, Dr. Ali Aslan tarafından toplandıktan sonra uluslar arası teşhis yöntemleri kullanılarak tür teşhisi yapıldı^{249,260}. Türün herbaryum örneği Atatürk Üniversitesi-Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Herbaryumu'nda depolanmıştır.

3.6. Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu ve “Rizonil Alkol” ün İzolasyonu

Araştırma ekibimizin daha önceden yaptığı araştırmalardan birinde indometazinle uyarılan ülser modelinde *L. pulmonaria*'nın aseton ekstresinin %75,3 antiülser etki gösterdiği belirlenmiştir¹¹⁴. *L. pulmonaria* türü üzerine yapılan literatür taramaları sonucunda ise bu türün başlıca atranorin, salazininik asit, stiktik asit, norstiktik asit, konstiktik asit, giroforik asit ve teleforik asit bileşiklerini ihtiva ettiği tespit edildi¹²⁹. Bu düşünceden yola çıkılarak aktiviteden sorumlu madde ve maddeleri izole etmek üzere kromatografik çalışmalara başlandı.

Liken örnekleri toplandıktan sonra yabancı maddelerden temizlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuru örnekler bir havanda sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. 1000 g öğütülmüş liken örneği aseton (5 x 3 lt) ile geri soğutucu altında 50°C de ekstrakte edildi. Ekstre süzülde ve aseton damıtılarak ayrıldı. Damıtma işlemi sonrası

koyu kahve renkli 95 g ekstre elde edildi. Yoğunlaştırılmış olan ekstre, polaritesi çok düşük maddeleri ve klorofilleri uzaklaştırmak üzere kloroform ile yeniden ekstrakte edildi. Bu işlem sonrasında geriye kalan 55 g ekstre üzerinde kromatografi çalışmaları başlatıldı.

Kolon kromatografisi çalışmalarına başlamadan önce bitkinin ham aseton ekstresinin içerdiği maddeler hakkında bilgi sahibi olmak için ekstre etil asetat-metanol (90:10) çözücü sisteminde yürütüldü. Ekstrenin UV_{254} , $UV_{366\text{ nm}}$ ve H_2SO_4 - vanilin reaktifi ile 3 veya 4 adet majör fenolik madde içerdiği belirlendi. Antiülser aktivitenin bu maddelerden ileri geldiği düşünülerek fraksiyonlama ve izolasyon çalışmalarına başlandı.

Ham aseton ekstresini fraksiyonlamak üzere 400 g silikajel (200–400 mesh) $CHCl_3$:metanol (90:10) ile süspanse edilip 100 cm x 4,5 cm ebatlarındaki kolona yüklendi. Daha sonra 30 g ekstre 20 g silikajele emdirilerek kolona tatbik edildi. Fraksiyonlama işlemi $CHCl_3$:metanol (90:10 ve 80:20) elüent sistemi ile yapıldı ve toplanan fraksiyonlar İTK ile aynı çözücü sistemlerinde kontrol edilerek aynı maddeleri içeren fraksiyonlar birleştirildi ve 1–10. fraksiyonlar sadece klorofil içermeleri nedeniyle atıldı. Birleştirme işlemleri sonunda ham ekstre 5 ana fraksiyona ayrıldı. Bu fraksiyonlar aşağıda gösterildiği üzere kodlandı.

LPA	:	11-17. fraksiyonlar	:	1,50	g
LPB	:	18-32. fraksiyonlar	:	3,36	g
LPC	:	33-48. fraksiyonlar	:	4,26	g
LPD	:	49-54. fraksiyonlar	:	4,92	g
LPE	:	55-93. fraksiyonlar	:	4,02	g

LPC ve LPD fraksiyonlarının İTK ile değişik çözücü sistemlerinde yapılan kontroller sonucunda bu fraksiyonların başlıca daha önce Halıcı tarafından izole edilen isidioforin (LP-I), stiktik asit (LP-II) ve rizonaldehit (LP-III) içerdiği tespit edildi¹¹⁴. Saf isidioforin, stiktik asit ve rizonaldehit, LPC ve LPD fraksiyonları ile beraber İTK da yürütüldü ve LPC ve LPD fraksiyonlarının bu maddeleri içerdiği doğrulandı. Bu fraksiyonların içerdiği maddelerden isidioforin ve stiktik asitin anti-ülser etkileri halıcı tarafından kaydedilmiştir¹¹⁴. Diğer taraftan LPD fraksiyonunun İTK ile CHCl₃:CH₃OH (95:5 ve 90:10) çözücü sisteminde yapılan kontrolünde rizonaldehitin (LP-III) yanı sıra farklı bir fenolik madde daha içerdiği gözlemlendi. LPE fraksiyonunun ise LPD fraksiyonundaki bilinmeyen fenolik maddenin yanı sıra farklı bir madde daha içerdiği yapılan İTK kontrolü sonucunda anlaşıldı. LPD fraksiyonundaki bu maddeyi saflaştırmak üzere yeniden kromatografik çalışmalar başlatıldı.

İTK ile yapılan kontrollerde LPD fraksiyonunun *rizonaldehit* (LP III) maddesinin yanı sıra majör bir madde daha içerdiğinin belirlenmesi üzerine bu maddeyi izole etmek üzere 4,92 g LPD fraksiyonu 250 g silikajel (200–400 mesh) üzerinden KK ile CHCl₃:CH₃OH (95:5, 90:10) sisteminde elüe edildi. Toplam 103 fraksiyon alındı ve toplanan fraksiyonların İTK ile yapılan kontrolünde 54–74. fraksiyonların saf ve LP-III maddesi olduğu tespit edildi (1,68 g). Diğer fraksiyonların (76–95. fraksiyonlar) ise saf bir madde içerdiği (925 mg) tespit edildi. Bu fraksiyonlar birleştirildi, çözücüsü uçuruldu ve saflaştırılan yeni madde LP-IV (925 mg) olarak kodlandı.

LPE fraksiyonu (4.02 g) kolon kromatografisi ile alındıktan sonra bekleme esnasında beherin dibinde bir maddenin çöktüğü gözlemlendi. Bu çöken kısım sıvı kısmından dikkatli bir şekilde bir damlalık vasıtasıyla ayrıldı ve birkaç kez CHCl₃:CH₃OH (95:5) üzerinden hızlı bir şekilde yıkandı. Çöken kısım ve sıvı kısım

İTK ile $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10) ve kloroform:metanol:etil asetat (90:5:5) çözücü sistemlerinde yürütüldü ve çöken maddenin saf LP-IV (425 mg) olduğu gözlemlendi. Tüm izolasyon çalışmalarının sonucunda 1,35 g LP-IV saflaştırıldı. Daha sonra LP-IV'ün molekül yapısı UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT-NMR, HETCOR ve HMBC gibi iki boyutlu (2D-NMR) NMR spektroskopik yöntemleri ile aydınlatılarak '**rizonil alkol**' olarak isimlendirildi.

Ayrıca, bu çalışmamızdan bağımsız olarak araştırma grubumuz tarafından LPA ve LPB fraksiyonlarından liken metabolitlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi çalışmaları devam etmektedir.

3.7. Deney Hayvanları

Tez çalışmalarında 180–200 g ağırlıkta 60 adet erkek Wistar ratlar (Şekil 7) kullanılmıştır. Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarından temin edildi ve deneyler Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Hayvanlar deneye alınmadan önce gruplara ayrıldı ve standart şartlar altında muhafaza edildi ve beslendi²⁶¹.



Şekil 7. Araştırmada kullanılan Wistar ratları gösteren fotoğraflar.

3.8. İndometazin ile Ratlarda Ülserinin Oluşturulması ve Rizonil Alkol, Famotidin, Ranitidin, Omeprazol ve Lansoprazol'ün Uygulanması:

İndometazin ile uyarılan gastrik hasarlı doku üzerine deney bitkisinden elde edilen saf liken metabolitinin antiülser etkisini araştırmak üzere yapılan bu çalışma, Guidobono ve arkadaşlarının yöntemi temel alınarak bazı değişiklikler yapılmak suretiyle gerçekleştirildi^{116,262}.

Deney prosedürü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

1. Her bir grupta 6 adet rat kullanılarak deney grupları oluşturuldu ve bir gün boyunca aç bırakıldı. Bu gruplar;
 - a) İndometazin (IND) grubu: Ülser gelişimini kontrol etmek amacıyla sadece indometazinin verildiği grup (negatif kontrol),
 - b) Referans grupları: Ülser tedavisinde yaygın olarak kullanılan famotidin, ranitidin, omeprazol ve lansoprazol gibi ticari referans ilaçların verildiği gruplar,
 - c) Sağlıklı grup (kontrol): İndometazinin ülser yapıcı etkisini ve enzim aktivitesindeki değişiklikleri sağlıklı dokularla mukayese edebilmek için hiçbir maddenin verilmediği grup,
 - d) Uygulama grupları: Antiülser etkisini incelemek üzere rizonil alkolün dört farklı dozunun verildiği gruplardır.
2. Hayvanlar aç bırakıldıktan bir gün sonra, her bir uygulama grubunda bulunan ratlara; rizonil alkol farklı dozlarda (50, 100, 200 ve 400 mg/kg) olmak üzere desitle suda süspansiyon haline getirilerek oral yoldan steril metal bir sonda ile verildi. Referans gruplarına ise famotidin (20 mg/kg), ranitidin (25 mg/kg), omeprazol (30 mg/kg), ve lansoprazol (30 mg/kg) ayrı ayrı saf suda preparatları hazırlanarak oral yoldan steril metal bir sonda ile verildi. Sağlıklı gruba ise hiçbir muamele

yapılmadan, diğer hayvanlar ile aynı şartlar altında (oda, sıcaklık, nem, güneş ışığı, karanlık vb.) muhafaza edildi.

3. Yukarıda belirtilen tüm maddeler belirtilen doz ve miktarlarda oral olarak verildikten 5 dakika sonra tüm sıçanlara aynı şekilde oral yolla indometazin (25 mg/kg dozda) verildi.
4. İndometazinin verilmesinden 6 saat sonra yüksek dozda anestezi madde (thiopental sodium 50 mg/kg) kullanılarak tüm gruplardaki hayvanlar sakrifiye edildi ve mideleri çıkarıldı.
5. Mideler büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandı ve makroskopik olarak incelendikten sonra tüm sıçan gruplarına ait mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C’de saklandı.
6. Rizonil alkolün antiülser ve antioksidant etkileri, makroskopik ve biyokimyasal analizlere dayandırılmak suretiyle belirlendi. Rizonil alkolün verildiği gruplardan elde edilen sonuçlar, indometazin ve referans ilaçlarının verildiği gruplardan elde edilen sonuçlar ile mukayese edildi.

3.9. Mide Dokusunun Makroskopik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi

3.9.1. Mide Dokusunun Makroskopik İncelenmesi:

Gastrik lezyonların belirlenmesi için rat mideleri makroskopik değerlendirmeye alındı ve rat mideleri, büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra ülser sayısı ve alanları tespit edildi. Ülser alan genişlikleri milimetrik kâğıt kullanılarak bir büyüteç yardımıyla ölçüldü. Rizonil alkol, famotidin, ranitidin, omeprazol ve lansoprazol’ün antiülser etkileri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

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

3.9.2. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi

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

3.9.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

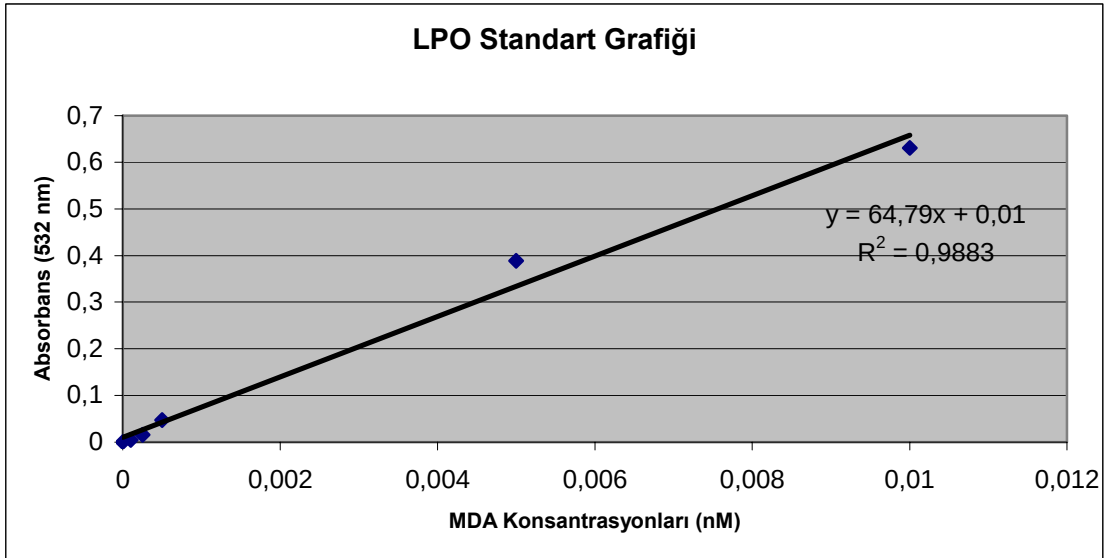
Mide dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. Her bir rat grubu dokularından 0,5 g tartıldı, üzerlerine 4,5 ml uygun tampon çözeltilerden (her parametre için farklı bir tampon sistemi kullanılarak) ilave edilerek 1/10 oranında seyreltildi. Bu homojenatlar sonra homojenizatörde 10 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar bir süzgeç kağıdından süzildükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4°C'de santrifüj edildi ve hazırlanan bu süpernatantlarda biyokimyasal araştırmalar yapıldı^{111,263-265}.

3.9.2.2. Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü:

Ölçüm prensibi: Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu LPO'nun son ürünlerinden olan MDA düzeyini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyonu temel alır. Bir molekül MDA iki molekül TBA ile stabil kırmızı renk oluşturmak üzere reaksiyona girer. LPO ölçümü, Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre MDA'nın asidik ortamda TBA ile oluşturduğu rengin 532 nm'de ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı²⁶⁶.

LPO ölçümü: 0,5 g doku üzerine 4,5 ml %10 KCl ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 5000 g 4°C'ta 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl %8 sodium lauril sulfat (SLS), 750 µl %20 asetik asit, 750 µl %0,08 TBA ve 150 µl distile su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100°C'ta 60 dakika inkubasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml n-bütanol ilave edildi ve ölçüm alındı.

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



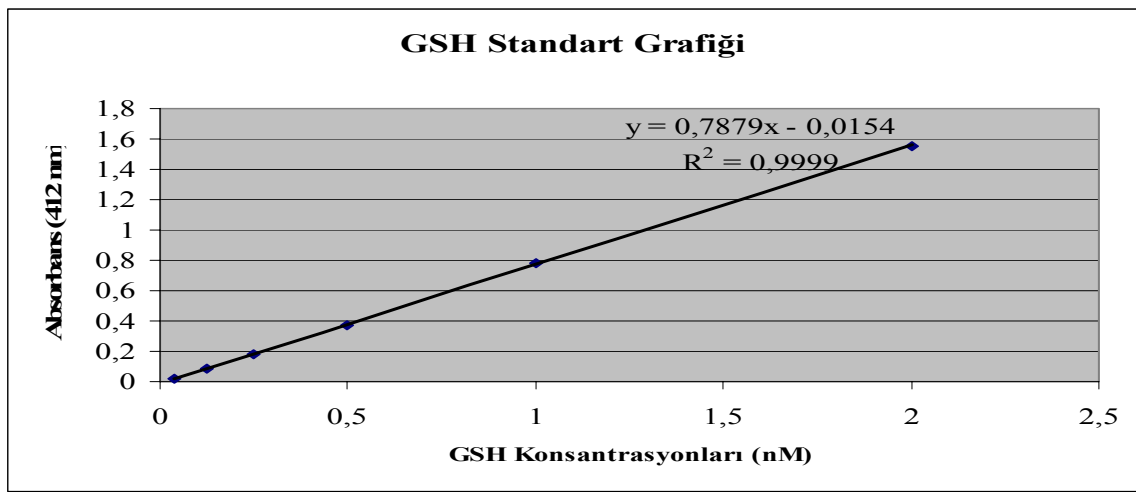
Şekil 8. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

3.9.2.3. Total glutasyon (GSH) miktarı ölçümü:

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

GSH miktarının ölçülmesi: Sedlak ve Lindsay’in geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi²⁶⁷. 0,5 g doku üzerine 4,5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 12.000 g 4°C’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 1500 µl ölçüm tamponu (0,2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH = 8,2), 500 µl süpernatant, 100 µl DTNB ve 7900 µl metanol pipetlenerek vortekslendi. Karışım 37°C’ta 30 dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra ölçümleri alındı.

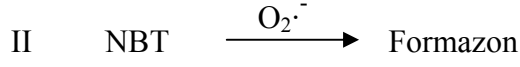
GSH miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 412 nm’de 3 ml’lik kuvartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten (Şekil 9) yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg doku olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak belirlendi.



Şekil 9. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

3.9.2.4. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri, şayet ortamda NBT (nitrobluetetrazolium) mevcutsa, NBT ile reaksiyona girerek formazon boyası oluştururlar. Bu bileşik 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Şayet ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H_2O_2 'ye dönüştürüldüğü için formazon oluşumu azalacak buna bağlı olarak da 560 nm’de ölçülen absorbans azalacaktır. Absorbanstaki azalmanın miktarı bize SOD aktivitesini verecektir. Özetle; SOD aktivitesi aşağıda verilen II nolu reaksiyonun inhibe edilme derecesiyle ölçülebilmektedir.



SOD ölçümü: SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları (1988) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü²⁶⁸. Mide dokuları homojenize edildikten sonra 18.000 g'de 1 saat santrifüj edildi. Cam bir spektrofotometre küvetine 2450 µl ölçüm karışımı (0,3 mM ksantin, 0,6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0,4 M Na₂CO₃, 1,2 g/L BSA), 500 µl supernatant, 50 µl ksantin oksidaz eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkubasyon bırakıldı ve 100 µl 0,8 mM CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

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

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

3.9.2.5. Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü:

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

CAT ölçümü: CAT'ın aktivitesi Aebi'nin belirttiği kurallar uygulanarak ölçüldü²⁶⁹. 0,5 g doku alınarak üzerine 4,5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,8) ilave edilerek homojenize edildi. Oluşan homojenat 18.000 g'de 4°C'ta 60 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar katalaz aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H_2O_2 çözeltisinden 1,5 ml konularak numune çözeltisinden 1,5 ml ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet alt üst etme sonrası spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 15 saniye aralıkla 3 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedildi.

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

3.9.2.6. Glutasyon peroksidaz (GPO) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: Aktivite ölçümü GPO ve GR arasındaki dönüşümlü tepkimelere dayandırılmıştır. GPO ortamdaki GSH ve H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürerek GSSG sentezler. GR ise oluşan GSSG'yi pentoz fosfat yolundan gelen NADPH'ı kullanarak tekrar GSH'ye dönüştürür. Bu esnada harcanan NADPH miktarı 340 nm'de belirlenebilir. Absorbans azalması ile GPO aktivitesi arasında doğrudan bağlantı kurulması esasına dayanarak ölçüm yapıldı.

GPO ölçümü: GPO aktivitesi, Lawrence ve Burk'un belirttiği metot kullanılarak ölçüldü²⁷⁰. 0,5 g doku üzerine 4,5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (30 mM KCl içerir ve pH 7,8) ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 18.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar GPO aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2400 µl ölçüm karışımı (son konsantrasyonlar 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 0,2 mM β -NADPH, 1 mM NaN_3 ve 1 EU/ml GR olacak şekilde) ve 300 µl supernatant konularak birkaç dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra 300 µl 0,25 mM H_2O_2 konulur konulmaz kronometre çalıştırıldı. Alt üst etme sonrası spektrofotometre de 340 nm dalga boyundaki absorbans azalması, 15 saniye aralıkla 5 dakika süreyle, köre karşı kaydedildi.

GPO aktivitesi'nin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı (ϵ_{NADPH}), 6,22 ($mmol^{-1} \times mm^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 340 nm'de, dakikada 1 µmol NADPH'ın harcanmasını sağlayan enzim miktarı (EÜ) hesaplandı. GPO aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak µmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi. Deneyler 3 tekrar yapılarak verildi.

3.9.2.7. Glutasyon s-transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: 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 tarafından belirtilen prosedür doğrultusunda belirlendi²⁷¹. Son konsantrasyonları: 0,1 M KH₂PO₄ tamponu (pH 6,5), 1 mM CDNB ve 1 mM glutasyon olacak şekilde reaktifler 3 ml’lik kuvartz küvete pipetlendi. GSH katılır katılmaz küvet altüst edilerek absorbanslar 3 dakika boyunca ve 15 saniyede bir kaydedildi. 3 dakikalık zaman aralığındaki absorbans değişiminin lineer olduğu kısımdan dakika başına absorbans değişimi tesbit edildi.

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

3.9.2.8. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: Yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG) aktivite ölçüm ortamındaki NADPH vasıtasıyla glutatyona (GSH) indirgenmesi sağlanırken, NADPH'dan gelen absorbands azalmasının 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Harcanan NADPH miktarından GR aktivitesi aşağıda bahsedilen yöntemle göre hesaplanmıştır.

GR ölçümü: GR aktivitesi Carlberg'in yönteminde tarif edildiği şekilde ölçüldü²⁷². 0,5 g doku alınarak üzerine 5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,8) ilave edilerek homojenize edildi. Oluşan homojenat 20.000 g'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Çökelek uzaklaştırıldı ve süpernatantlar GR aktivitesi ölçümünde kullanıldı. 1,5 ml ölçüm tamponu, 1,2 ml homojenat, 0,15 ml NADPH ve son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde GSSG çözeltisinden 0,15 ml ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet alt üst etme sonrası spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla 5 dakika süreyle ölçülerek absorbands azalması köre karşı kaydedildi.

GR Aktivitesinin Hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbands azalması olan aralıktan dakika başına absorbands azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{\text{NADPH}_2}$), 0,00622 ($\mu\text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 340 nm'de, dakika başına NADPH harcanmasından enzim miktarı (EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak $\text{mmol/min} = A/6,22 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbands değerlerinden hesaplandı. GR aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol/dakika/mg}$ doku olarak tarif edildi. Deneyler 3 tekrar yapılarak verildi.

3.9.2.9. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü:

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

MPO ölçümü: MPO aktivitesi Bradley'in belirttiği yöntem esas alınarak ölçüldü²⁷³. 0,1 g doku alınarak üzerine 10 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ilave edilerek homojenize edildi. Oluşan homojenat 3500 g 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar MPO aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2,8 ml ölçüm tamponu, 0,12 ml homojenat tamponu ve 0,12 ml numune çözeltisinden ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet spektrofotometrede 460 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla ve 5 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedildi.

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

3.9.3. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri one-way variance analyzes (ANOVA) testi ile belirlendi ve $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı.

4. BULGULAR

Yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz veriler, bu bölümde tablo ve şekiller ile gösterilmiştir. Bulgularımızı sunuş şeklimiz öncelikle ince tabaka kromatografisi ve spektral bulguların daha sonrada ülser deneylerine ait bulguların ve son olarakta biyokimyasal bulguların değerlendirilmesi şeklinde olacaktır. Farklı spektroskopik yöntemler kullanılarak elde edilen bulgular şekil olarak verilip yorumlandıktan sonra ülser deneylerinden elde edilen bulgular tablo ve şekillerle izah edilmeye çalışılacaktır. Bu sunumları biyokimyasal bulguların değerlendirilmesi izleyecektir. Her deneye ait veriler tablo halinde ve değişik muamele grupları arasındaki farkın daha iyi görülmesi amacıyla da tablonun hemen altında diyagramlar halinde sunulmuştur. Bulgular kısmında tablo halinde sunulan veriler, 3 tekerrür olarak yapılan deney sonuçlarının ortalaması $\pm$ standart hata (SE) olarak sunulmuştur. Bütün verilere SPSS 13.0 software kullanılarak *one-way variance analyzes (ANOVA)* testi uygulanmış ve $p<0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulanmıştır.

4.1. İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları

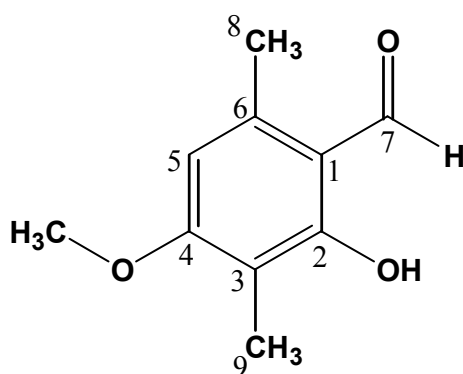
Bu çalışmada *L. pulmonaria*'nın aseton ekstresinden izole edilen 2 adet sekonder metabolitin ince tabaka kromatografisi ile değişik çözücü sistemlerinde belirlenen Rf değerleri Tablo 1 de sunulmuştur.

Tablo 1. Liken türlerinden izole edilen bileşiklerin farklı çözücü sistemlerindeki Rf değerleri

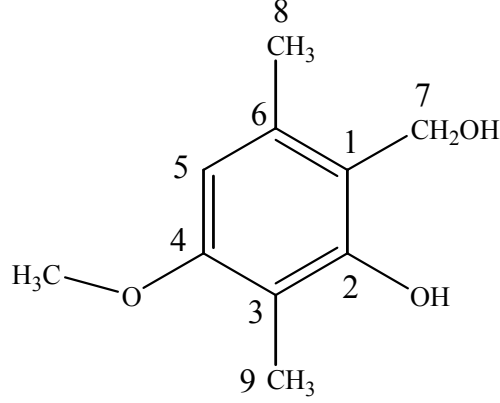
Bileşik	Çözücü Sistemi	Rf	Adsorban
LP-III	CHCl ₃ —Metil alkol (95:5)	0,35	Silika jel
	CHCl ₃ —Metil alkol (90:10)	0.65	Silika jel
	Aseton	0,24	Silika jel
LP-IV	CHCl ₃ —Metil alkol (90:10)	0.56	Silika jel
	CHCl ₃ —Metil alkol—Etil asetat (90:5:5)	0,60	Silika jel

4.2. Rizonil Alkolün Spektrel Verilerle Yapısının Aydınlatılması:

Bu bölümde *L. pulmonaria* liken türünün aseton ekstresinden 2 farklı madde izole edildi ve LP-III ve LP-IV olarak kodlandı. Bu maddelerden LP-III' ün kimyasal yapısı Halıcı tarafından IR, UV-VIS, MS ve NMR spektroskopik yöntemlerine dayanılarak kimyasal yapısı aydınlatıldı (Şekil 10) ve 'rizonaldehit' olarak adlandırıldı¹¹⁴. Rizonaldehite ait bilgiler Halıcı tarafından rapor edildiğinden bu bölümde sadece LP-IV ün molekül yapısını aydınlatmak üzere IR, UV-VIS ve NMR spektroskopik yöntemleriyle elde edilen spektral bulgular değerlendirildi.

**Şekil 10.** Rizonaldehit (LP-III)'in kimyasal yapısı.

Materyal ve Metod bölümünde (2.6.) daha anlatıldığı üzere izolasyon çalışmalarının sonucunda 1,35 g LP-IV saflaştırıldı. Daha sonra LP-IV'ün molekül yapısı UV, IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT-NMR, HETCOR ve HMBC spektroskopik yöntemleri ile aydınlatıldı (Şekil 11).

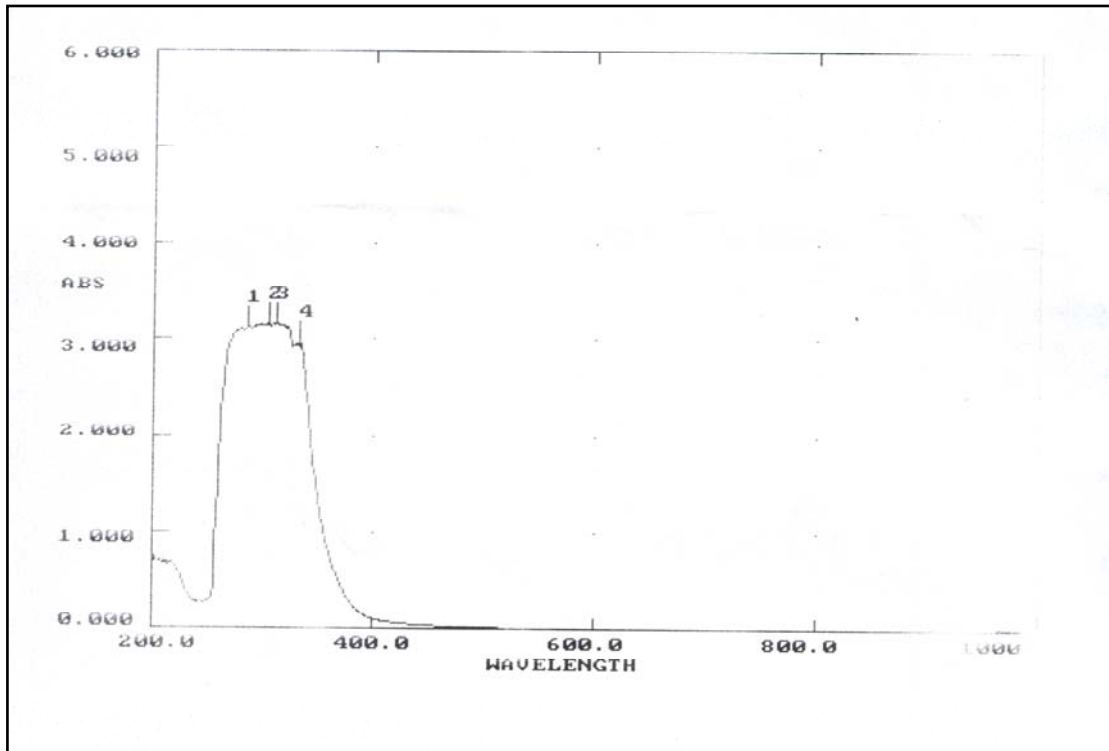


Şekil 11. Rizonil alkol (LP-IV)'ün molekül yapısı.

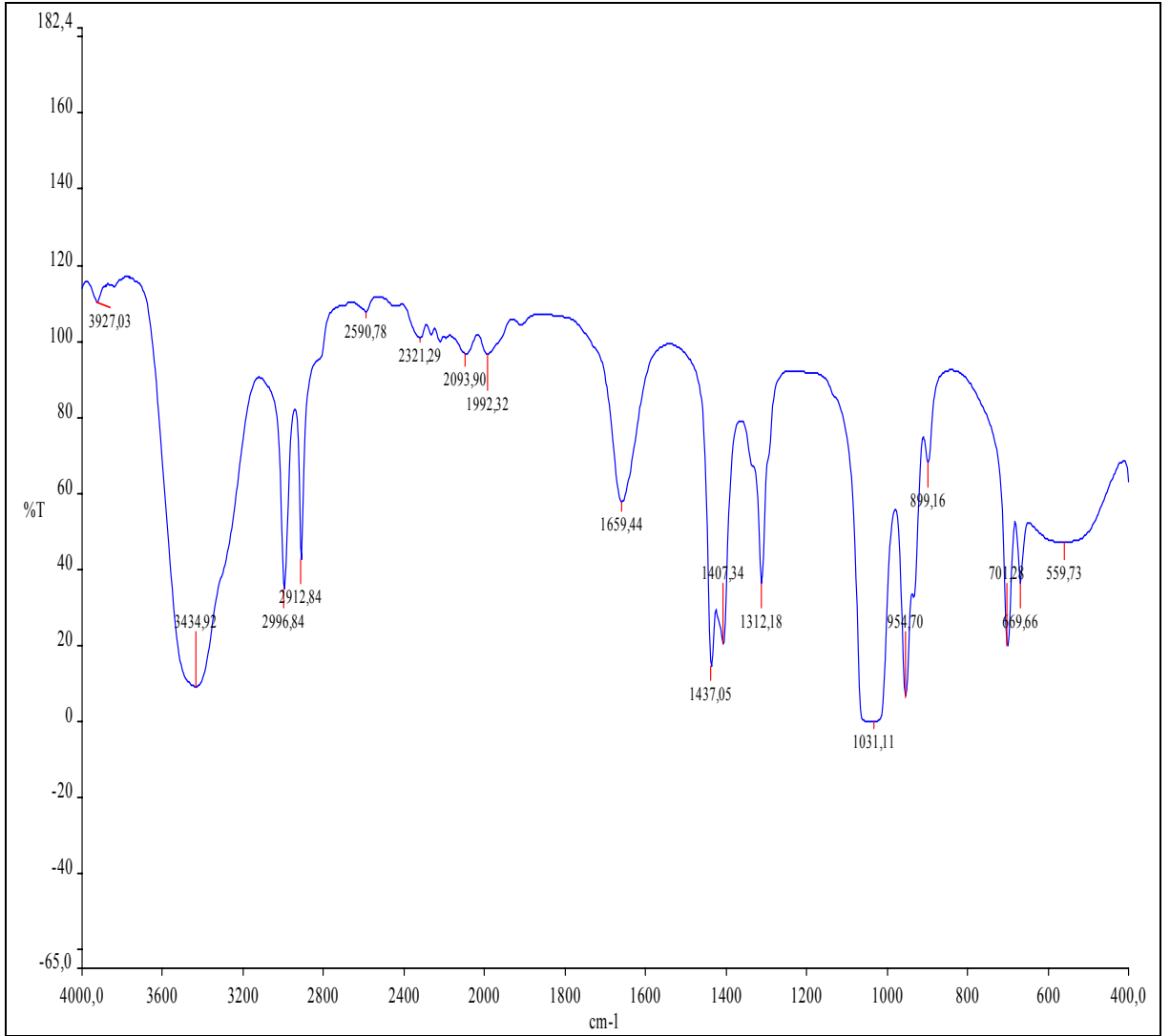
Rizonil alkol (LP-IV)

Kimyasal adı	: 2-Hidroksi-4-metoksi-3,6-dimetilbenzilalkol	
Molekül formülü	: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$	
Molekül ağırlığı	: 182	
Görünür ışıktaki	: Beyaz renkli	
UV ₂₅₄ nm	: Mor	
UV ₃₆₅ nm	: Kahve renkli	
Vanilin- H_2SO_4 reaktifi-105 ^0C	: Turuncu	
UV λ_{max} (Dimetil sülfoksit)	: Spektrum 1 (285 ve 304nm)	
IR (CHCl_3) spektrumu	: Spektrum 2	
^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu	: Spektrum 3	
^{13}C -NMR spektrumu	: Spektrum 4	
DEPT ^{13}C -NMR Spektrumu	: Spektrum 5	
2D- ^1H - ^{13}C -Heteronükleer COSY (HETCOR) spektrumu	: Spektrum 6	
HMBC spektrumu	: Spektrum 7	

LP-IV amorf beyazımsı bir madde olarak izole edildi. LP-IV İTK’da görünür ışıktaki renksiz, UV₂₅₄ nm’de mor renkli, vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile de turuncu bir renk vermektedir. Bileşik UV-VIS spektroskopisinde ise 285 ve 304 nm’ de maksimum absorban vermiştir (Şekil 12). Bu veriler, LP-IV’ ün düşük dalga boyunda absorban veren değişik fonksiyonel gruplara sahip aromatik yapılı bir bileşik (düşük dalga boyunda $n-\pi^*$ ve $\pi-\pi^*$ elektronik geçişlerinin fazla olduğu) olduğunu göstermektedir (Şekil 13)^{274,275}.



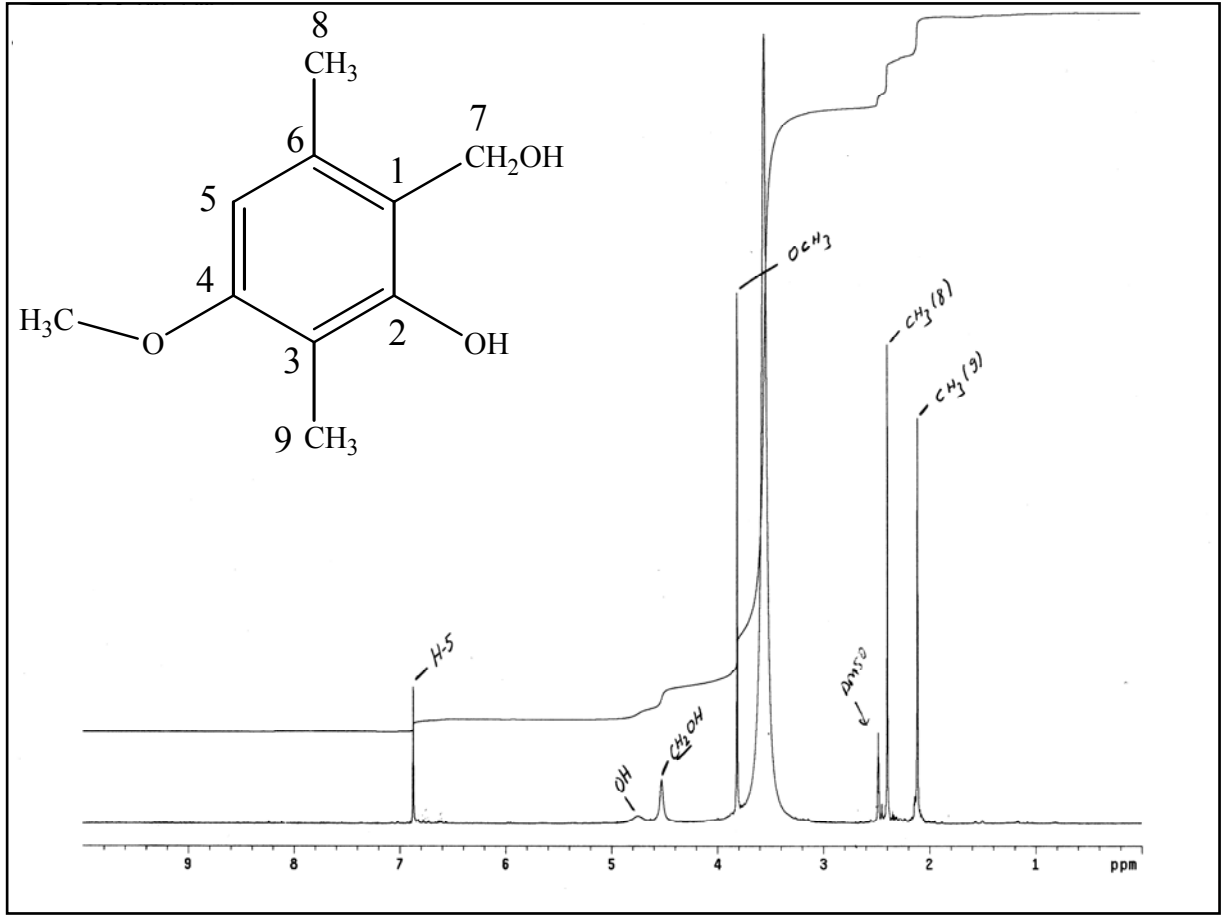
Şekil 12. Rizonil alkol (LP-IV)’ün UV spektrumu (Spektrum 1).



Şekil 13. Rizonil alkol (LP-IV)'ün IR (CHCl₃) spektrumu (Spektrum 2).

IR : $\nu_{\max}$: 3435 cm⁻¹ (-OH titreşim bandı), 2997 ve 2913 cm⁻¹ (alifatik C-H titreşim bantları), 1500-1200 cm⁻¹ (aromatik C=C titreşim bantları), 1031 cm⁻¹ (C-O gerilme bandı).

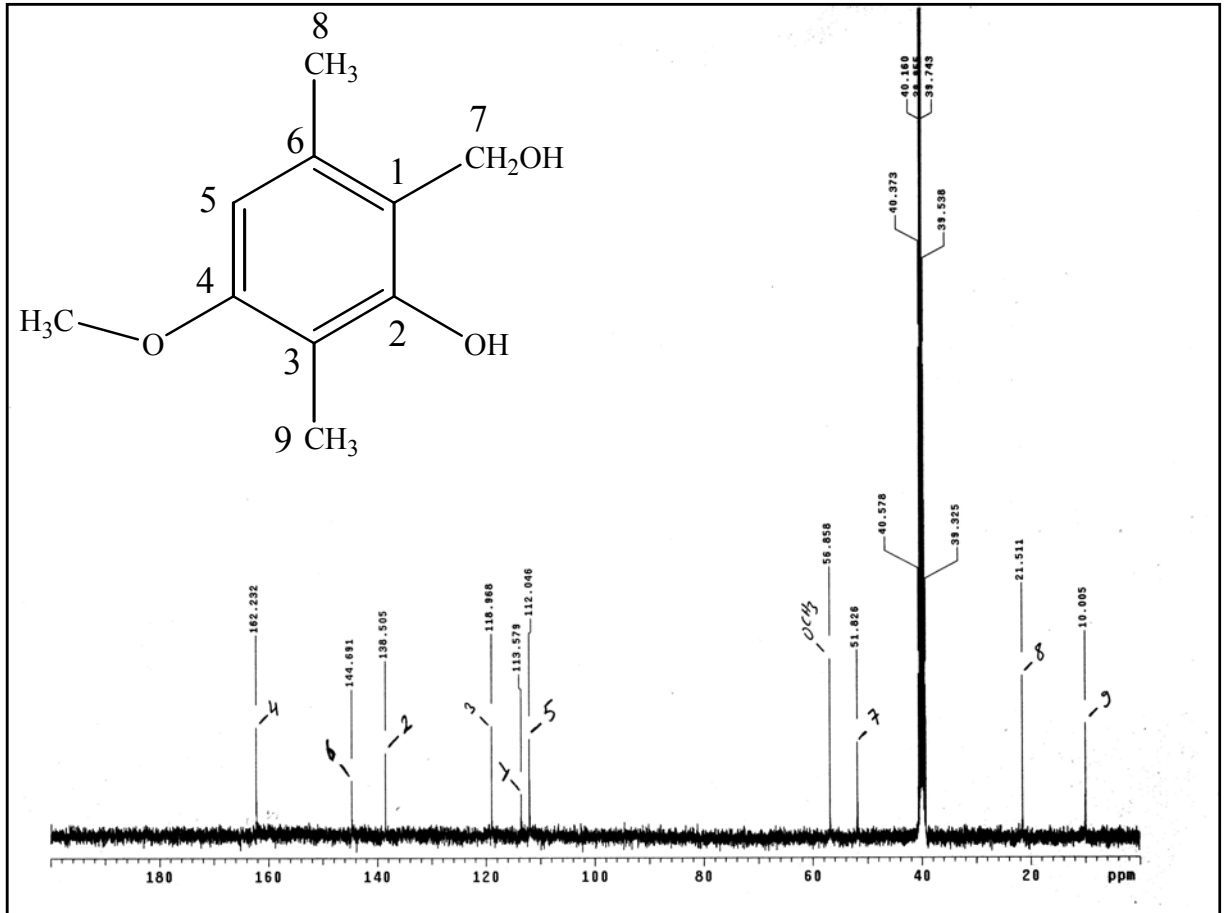
IR spektrumundaki 3435 cm⁻¹ de gözlenen kuvvetli absorban bandı –OH titreşiminden kaynaklanmata olup molekülde bir veya daha fazla –OH grubunun olduğunu göstermektedir. 1200-1500 cm⁻¹ dalga boyları aralığındaki çok sayıdaki absorban bantları ise aromatik halkadaki C=C bağlarının titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu bilgiler bileşiğin aromatik yapılu olduğuna işaret etmektedir^{274,275}.



Şekil 14. Rizonil alkol (LP-IV)'ün ¹H-NMR spektrumu (Spektrum 3).

LP-IV bileşiğinin ¹H-NMR spektrumundan (Şekil 14) görüleceği üzere alifatik bölgede integrasyondan 3 hidrojene ait olduğu gözlenen iki adet kuvvetli singlet ($\delta=2.12$ ve $\delta=2.41$ ppm) aromatik halkaya bağlı iki metil grubunu göstermektedir²⁷⁴⁻²⁷⁶. $\delta=3.83$ ppm de ki singlet sinyal ise benzen halkasına bağlı bir adet -OCH₃ grubuna ait olup benzen halkasına bir metoksi grubunun bağlı olduğuna işaret etmektedir. İntegrasyon ile 2 hidrojene ait olduğu belirlenen ve $\delta=4.55$ ppm de gözlenen singlet sinyal ise benzen halkasına bağlı CH₂OH hidrojenlerine aittir. Bu sinyalin $\delta=4.55$ ppm gibi aşağı alana kayması hem oksijenin indüktif etkisi hem de benzen halkasındaki diamanyetik halka akımı ile açıklanabilir²⁷⁴⁻²⁷⁶. $\delta=6.90$ ppm deki singlet ise benzen

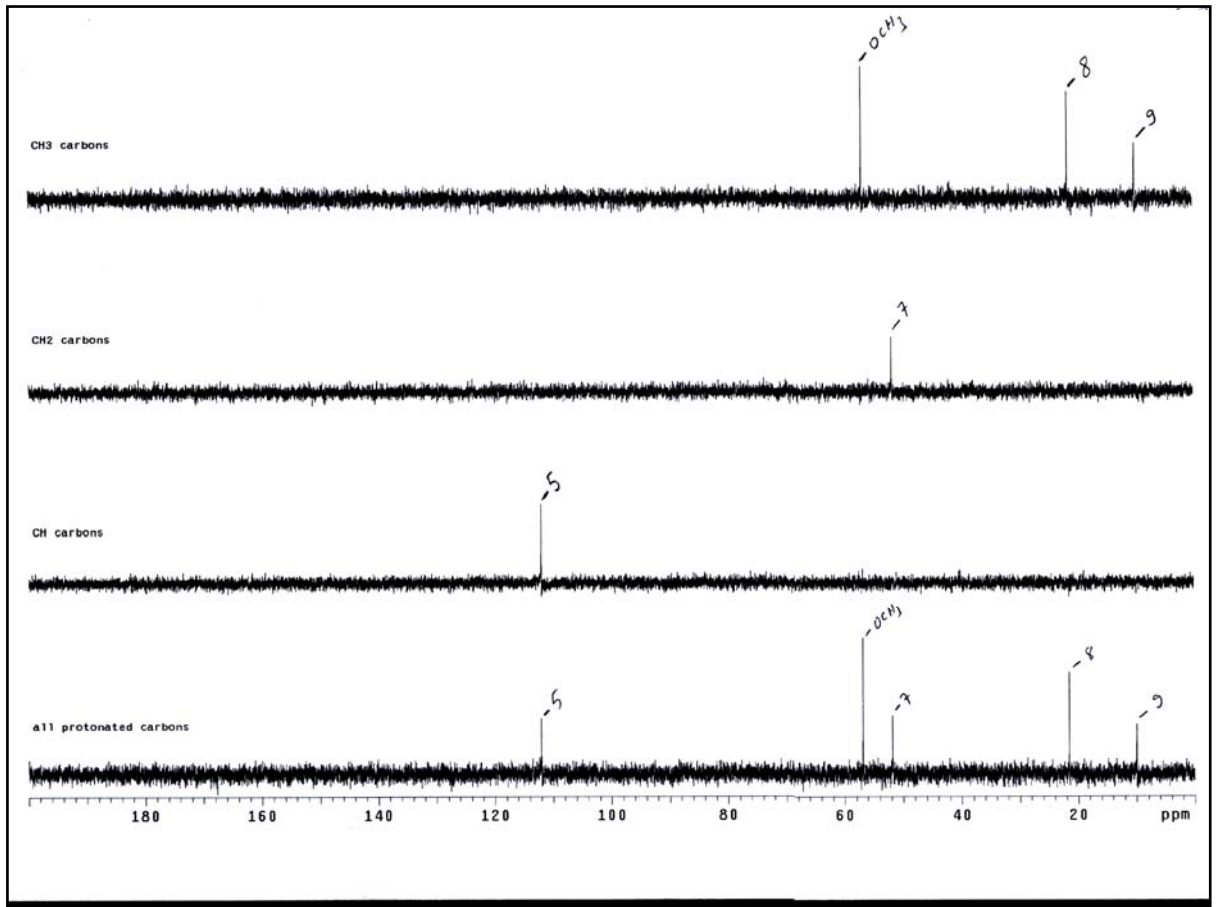
halkasındaki bir adet hidrojene ait olup, benzen halkasındaki biri hariç tüm karbon atomlarının fonksiyonel grup taşıdığına işaret etmektedir. Hidrojen NMR verileri bize aromatik halkaya bağlı iki adet $-CH_3$, bir adet $-OCH_3$ ve bir adet ise $-CH_2OH$ grubunun olduğunu işaret etmektedir.



Şekil 15. Rizonil alkol (LP-IV)'ün ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) spektrumu (Spektrum 4).

LP-IV bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 15) toplam 10 adet karbon sinyali gözlenmiş olup olefinik bölgede gözlenen ($\delta=110$ -165 ppm) 6 adet karbon sinyali benzendeki karbonlara aittir. Olefinik bölgede gözlenen bu 6 adet karbon sinyali bileşiğin yapısında sadece bir adet benzen halkasının olduğuna da bir delildir²⁷⁴⁻²⁷⁶. Alifatik bölgede gözlenen 4 adet sinyal ise benzen halkasına bağlı fonksiyonel grup

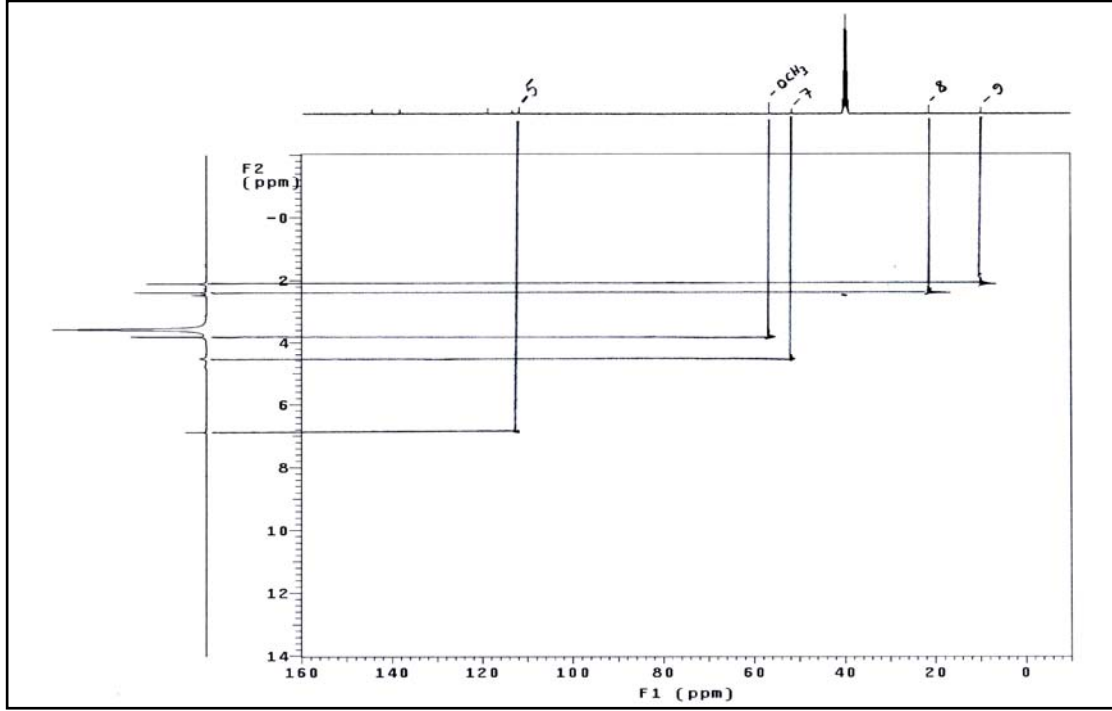
karbonlarına işaret etmekte olup bu sinyaller iki adet CH_3 karbonuna ($\delta=10.01$ ppm ve $\delta=21.51$ ppm), bir adet OCH_3 karbonuna ($\delta=56.86$ ppm) ve bir adet $-\text{CH}_2\text{OH}$ karbonuna ($\delta=51.83$ ppm) aittir.



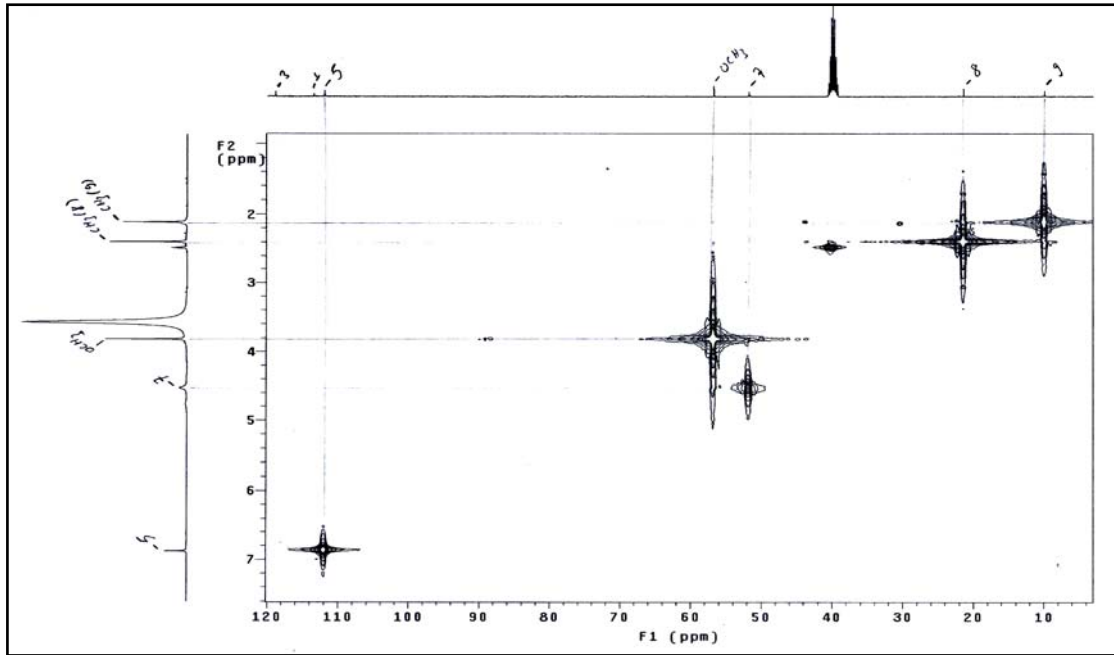
Şekil 16. Rizonil alkol (LP-IV)'ün DEPT ^{13}C -NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz) spektrumu (Spektrum 5).

LP-IV bileşiğinin DEPT ^{13}C -NMR spektrumu da yapı hakkında detaylı bilgi edinmemizi sağlamıştır. LP-IV ün DEPT ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 16) 5 adet hidrojen bağlı karbon sinyali gözlenmiş olup bu sinyallerin biri $-\text{CH}$, birisi $-\text{CH}_2$ ve üç tanesi ise $-\text{CH}_3$ karbonlarına aittir. Bileşiğin DEPT ^{13}C -NMR spektrumunda benzen karbonlarından sadece birisinin sinyalinin gözlenmesi benzen karbonlarından sadece birisinin hidrojen atomu taşıdığını, diğer karbonların ise kuarterner olduğunu göstermektedir.

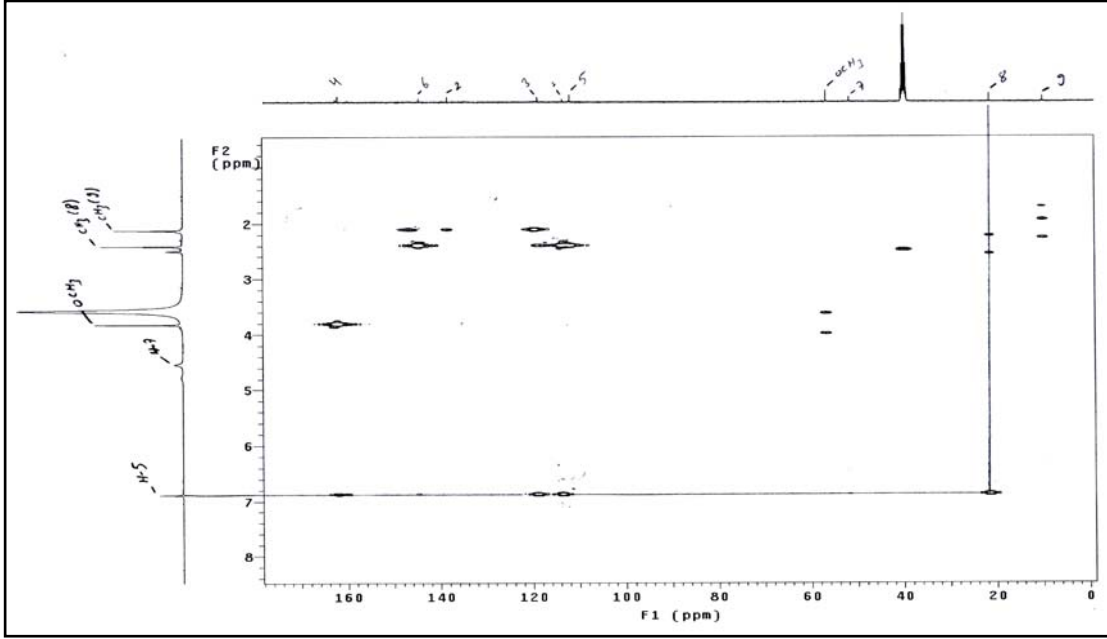
LP-IV bileşiğinin ^1H -, ^{13}C - ve DEPT ^{13}C -NMR spektrum verileri yorumlanarak bileşiğin benzen halkasına bağlı iki adet $-\text{CH}_3$, bir adet CH_2OH , bir adet $-\text{OCH}_3$ ve bir adet de $-\text{OH}$ grubu taşıdığı açıkça görülmektedir. Bu spektroskopik verilere dayanarak LP-IV bileşiğinin kimyasal yapısı 2-hidroksi-3,6-dimetil-4-metoksi benzil alkol olarak karakterize edildi. Literatürde 7 numaralı karbonun yükseltgenmiş türevlerinden karboksilli asit taşıyan türevi Rizonik asit, aldehit grubu taşıyan türevi ise Rizonaldehit olarak isimlendirilmiştir^{76,114}. Bu verilerden yola çıkılarak LP-IV bileşiği ayrıca ‘rizonil alkol’ olarak tarafımızdan isimlendirilmiştir.



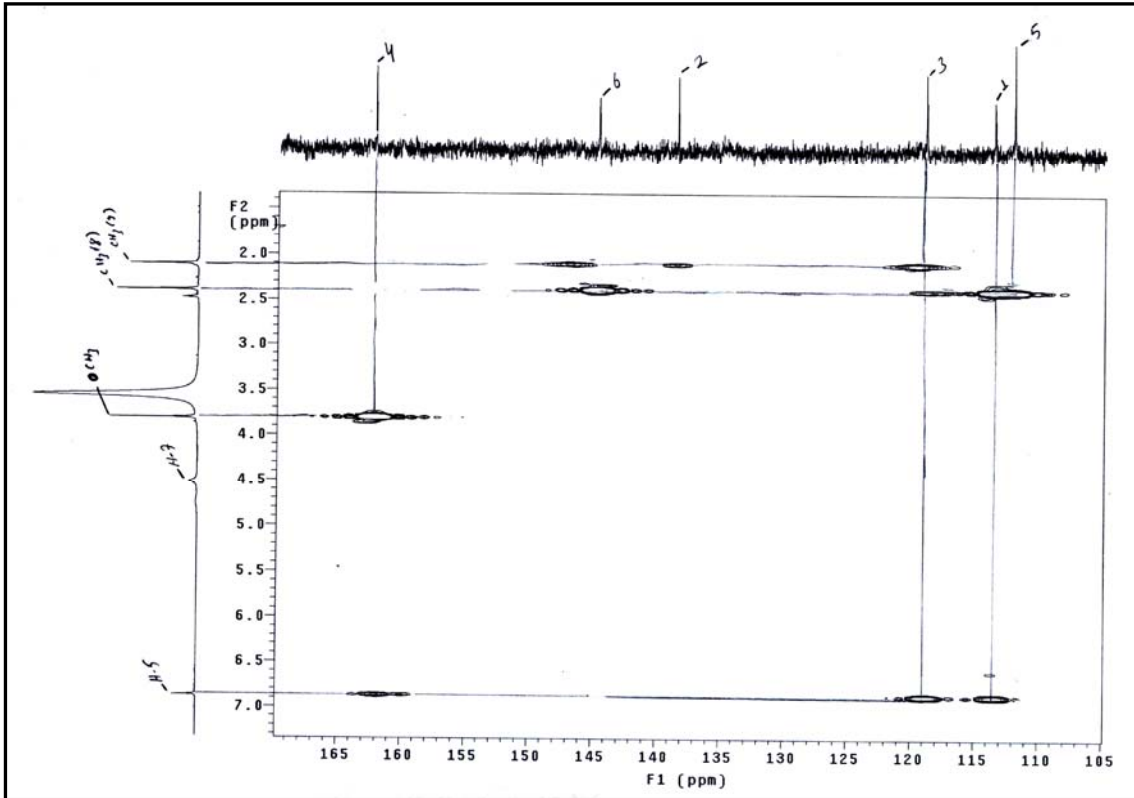
Şekil 17. Rizonil alkol (LP-IV)'ün 2D- ^1H - ^{13}C -Heteronükleer COSY (HETCOR) (DMSO-d_6) spektrumu (Spektrum 6a).



Şekil 18. Rizonil alkol (LP-IV)'ün 2D- ^1H - ^{13}C -Heteronükleer COSY (HETCOR) (DMSO-d_6) spektrumu (Spektrum 6b).

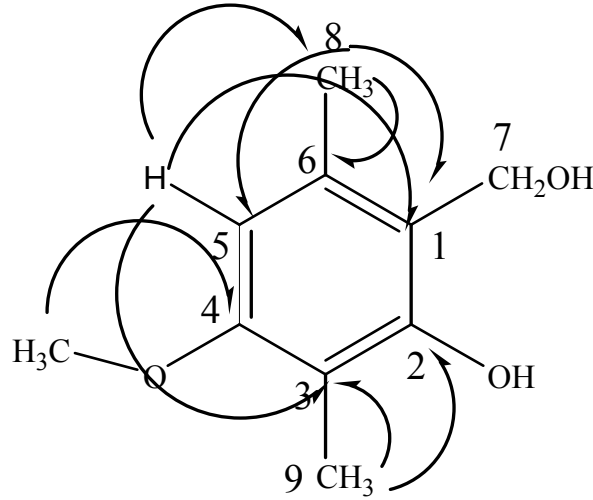


Şekil 19. Rizonil alkol (LP-IV)'ün HMBC (DMSO- d_6) spektrumu (Spektrum 7a).



Şekil 20. Rizonil alkol (LP-IV)'ün HMBC (DMSO- d_6) spektrumu (Spektrum 7b).

Bileşiğin kimyasal yapısı ayrıca 2D-NMR spektroskopisi yöntemleri (2D- ^1H - ^{13}C -HETCOR ve HMBC spektrumları; sırası ile Şekil 17 ve 18 ile Şekil 19 ve 20) ile de doğrulanmıştır. Bileşiğin HETCOR spektrumundan görüleceği üzere yapı ile uyumlu olarak $\delta=6.87$ ppm deki aromatik hidrojen sinyali $\delta=112.05$ ppm deki karbon sinyali ile; metoksi hidrojenlerine ait $\delta=3.82$ ppm deki sinyal $\delta=56.86$ ppm deki karbon sinyali ile; $\delta=4.53$ ppm deki singlet hidrojen (2H, H-7) sinyali $\delta=51.83$ ppm deki karbon sinyali ile; $\delta=2.40$ ve $\delta=2.11$ ppm deki metil hidrojenlerine ait singlet sinyaller ise sırasıyla, $\delta=21.51$ ve $\delta=10.01$ ppm deki karbon sinyalleri ile korale olmuştur. Rizonil alkolün (LP-IV) iki ve üç bağ üzerinden ^1H - ^{13}C korelasyonları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 21). Ancak, bu spektrumda 7 numaralı karbona bağlı hidrojenlerin üç bağ üzerinden korelasyonları gözlenememiştir.



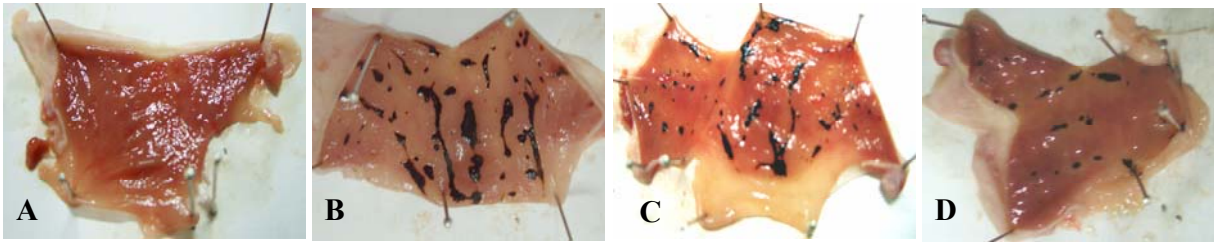
Şekil 21. Rizonil alkol (LP-IV)'ün iki ve üç bağ üzerinden H-C korelasyonları

Sonuç olarak, LP-IV bileşiğinin IR, UV, NMR ve 2D-NMR spektroskopik verilerine dayanarak kimyasal yapısı 2-hidroksi-3,6-dimetil-4-metoksi benzil alkol ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$; MA=182) olarak karakterize edildi. Literatürde 7 numaralı karbonun

yükseltgenmiş türevlerinden karboksilli asit taşıyan türevi Rizonik asit, aldehit grubu taşıyan türevi ise Rizonaldehit olarak isimlendirilmiştir^{76,114}. Bu verilerden yola çıkılarak LP-IV bileşiği ayrıca ‘rizonil alkol’ olarak tarafımızdan isimlendirilmiştir. Rizonik asit ve rizonik asit türevleri daha önce birçok liken türünden izole edilmiş ve karakterize edilmiştir⁷⁶. Bununla beraber ‘rizonaldehit ve rizonil alkol’ *L. pulmonaria* liken türünden ilk defa izole edilmiş yeni doğal bileşiklerdir.

4.3. İndometazin ile Oluşturulan Ülser Modeli Üzerine Deneysel Bulgular:

Yaptığımız *in vivo* deneylerden elde ettiğimiz veriler, bu bölümde Tablo ve Şekiller ile gösterilmiş olup IND grubuna göre mukayeseler “antiülser etki (%)” olarak ifade edilmiştir. Ülkemizde ülser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ticari ilaçlardan H₂ reseptör antagonistleri (HRA) ve proton pompa inhibitörleri (PPI) deneylerimizde referans ilaç olarak, antiülser etkinin derecesinin anlaşılabilmesi amacıyla kullanılmıştır. H₂ reseptör antagonisti olarak famotidin (FAM) ve ranitidin (RAN), proton pompa inhibitörleri olarak ise omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN) seçilmiştir. Ülser gelişiminin tespitinde negatif kontrol olarak indometazin (IND) kullanılmıştır (Şekil 22). Her deneye ait veriler çizelgeler halinde sunulmuştur. Bulgular kısmında çizelge halinde sunulan veriler, 3 tekerrür olarak yapılan deney sonuçlarının ortalaması $\pm$ standart hata (SE) olarak verilmiştir.



Şekil 22. İndometazin (IND) uygulaması sonrasında sağlıklı ve muamele grubu sıçanlara ait mide dokularının makroskobik görünümü. [A: Muamele edilmemiş (sağlıklı), B: Yalnızca IND (25 mg/kg) ile muamele edilmiş, C: IND (25 mg/kg) + rizonil alkol (50 mg/kg) ile muamele edilmiş ve D: IND (25 mg/kg) + rizonil alkol (200 mg/kg) ile muamele edilmiş sıçan midesi].

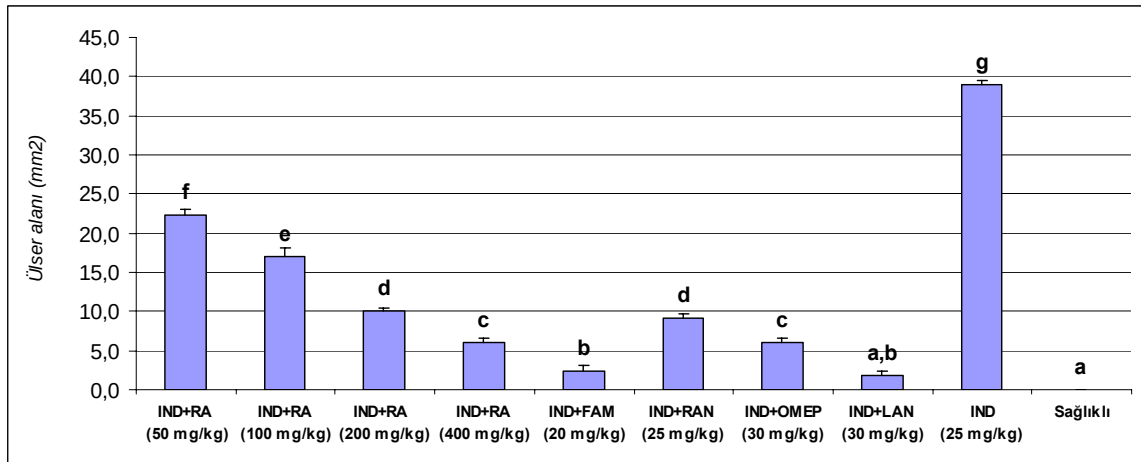
L. Pulmonaria'nın aseton ekstresininden kolon kromatografisi ile elde edilen saf liken metabolitlerinden rizonil alkol (RA; LP-IV) 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda indometazinin neden olduğu gastrik hasarları önemli oranda azaltmıştır (Tablo 2 ve Şekil 23) ($p<0,05$). RA'nın her bir dozu sırasıyla %42.8, 56.4, 74.4 ve 84.6 oranında etki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer yandan araştırmamızda, H_2 reseptör antagonistlerinden olan famotidin (FAM)'in %94.1 ve ranitidin (RAN)'in %76.4 oranında; proton pompası inhibitörlerinden omeprazol (OMEP)'ün %84.6 ve lansoprazol (LAN)'ün %95 oranında IND'nin oluşturduğu ülseri azalttığı belirlendi.

Referans ilaçlar ile mukayese edildiğinde RA'nın tüm dozları H_2 reseptör antagonistlerinden olan FAM'dan daha düşük antiülserojenik etki göstermiştir. Diğer H_2 reseptör antagonisti RAN ile karşılaştırıldığında ise RA'nın 50 ve 100 mg/kg dozlarının daha düşük, 200 mg/kg dozunun eşit, 400 mg/kg dozunun ise daha yüksek ($p<0.05$) bir etkiye sahip olduğu tespit edildi. Proton pompası inhibitörlerinden OMEP'in antiülserojenik etkisi RA'nın 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarından daha yüksek ($p<0.05$) fakat 400 mg/kg dozu ile eşit etkiye sahip olup bu eşitlik istatistiksel açıdan önemsizdir. Doza bağlı olarak RA'nın indometazinin neden olduğu gastrik hasarları çok etkili biçimde azalttığı en yüksek uygulama dozu olan 400 mg/kg dozda ise RAN'dan daha fazla OMEP ile eşit fakat FAM ve LAN'dan daha düşük antiülserojenik aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Bu bulgulara göre RA'nın oldukça yüksek bir antiülserojenik aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

Tablo 2. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ın rat midelerinde deneysel olarak indometazin (IND) ile oluşturulan hasarlar üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	Ülser alanı (mm ²)	Antiülser etki (%) [§]
IND+RA	6	50	22.3±0.7f	42.8*
IND+RA	6	100	17.0±1.1e	56.4*
IND+RA	6	200	10.0±0.5d	74.4*
IND+RA	6	400	6.0±0.6c	84.6*
IND+FAM	6	20	2.3±0.8b	94.1*
IND+RAN	6	25	9.2±0.6d	76.4*
IND+OMEP	6	30	6.0±0.6c	84.6*
IND+LAN	6	30	1.8±0.6a,b	95.0*
IND	6	25	39.0±0.6g	0.0
Sağlıklı	6	-	0.0±0.0a	-*

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



Şekil 23. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ın tek; rizonil alkol (RA)'ın ise dört dozunun IND tarafından rat midelerinde oluşturulan ülserler üzerine etkilerini gösteren diyagram.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

Rat mideleri makroskopik olarak incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı ve dokuların enzim aktiviteleri en geç üç gün içerisinde analiz edildi. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPO), miyeloperoksidaz (MPO),

süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon s-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri ve total glutatyon (GSH) ile lipid peroksidasyon (LPO) miktarları literatürlere dayalı uygun metodlar kullanılarak tespit edildi.

4.4.1. LPO miktarı üzerine rizonil alkolün etkileri

Destile su içerisinde süspansiyon haline getirilerek uygulanan rizonil alkolün (50, 100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MDA miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 24’de gösterilmiştir. Numunelerin LPO miktarları, *nmo/ g doku* olarak tarif edilmiştir.

Tablo 3’de görüldüğü üzere LPO’nun göstergesi olan MDA miktarları kontrol grubunda 16.01 ± 0.43 , IND grubu midelerinde 38.19 ± 0.43 , IND ile birlikte uygulanan RAN grubunda 22.70 ± 0.57 , OMEP grubunda 21.07 ± 0.33 , FAM grubunda 24.16 ± 0.28 , LAN grubunda 18.13 ± 0.43 ve rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 30.44 ± 0.22 , 25.30 ± 0.33 , 22.54 ± 0.59 ve 18.29 ± 0.56 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND’nin önemli oranda ($p<0.05$) artırdığı LPO miktarını, IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozları tarafından doz artışına bağlı olarak önemli ($p<0.05$) oranda azaltıldığını göstermektedir. Referans ilaçlarımızda benzer şekilde FAM (%150.9), RAN (%141.8), OMEP (%131.6) ve LAN (%113.2)’lik oranlarda LPO miktarını azaltmışlardır. Bu oranlar kontrol için %100 ve IND için %238.5 olduğu dikkate alındığında oldukça yüksek olarak kabul edilebilir.

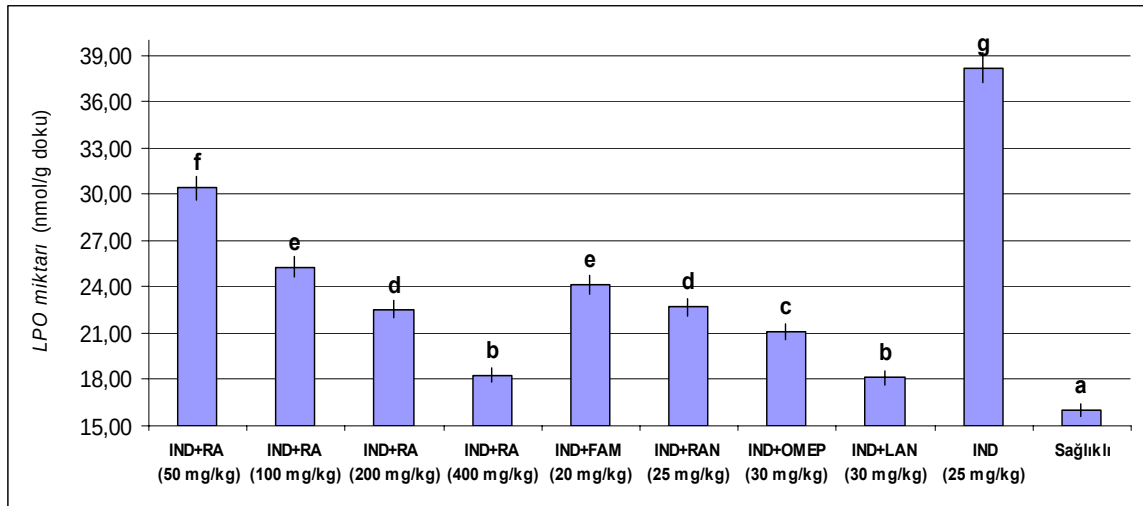
Tablo 3 ve Şekil 24’de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen LPO miktarındaki artış ($p<0.05$) IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozları tarafından ortadan kaldırılmıştır ($p<0.05$). Bu

bulgular rizonil alkol, RAN, OMEP, FAM ve LAN'nın IND ile birlikte uygulandıklarında LPO miktarını azalttığını göstermektedir.

Tablo 3. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif control ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipit peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	LPO miktarı (nmol/g doku)	% miktar
IND+RA	6	50	30.44 ± 0.22f	190.13*
IND+RA	6	100	25.30 ± 0.33e	158.03*
IND+RA	6	200	22.54 ± 0.59d	140.79*
IND+RA	6	400	18.29 ± 0.56b	114.24*
IND+FAM	6	20	24.16 ± 0.28e	150.91*
IND+RAN	6	25	22.70 ± 0.57d	141.79*
IND+OMEP	6	30	21.07 ± 0.33c	131.61*
IND+LAN	6	30	18.13 ± 0.43b	113.24*
IND	6	25	38.19 ± 0.43g	238.54
Sağlıklı	-	-	16.01 ± 0.43a	100.0*

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



Şekil 24. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki lipit peroksidasyon (LPO) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.4.2. SOD aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri

Destile su içerisinde süspansiyon haline getirilerek uygulanan rizonil alkol (50, 100, 200 ve 400 mg/kg), FAM, RAN, OMEP, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen SOD aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 25’de gösterilmiştir. SOD aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak mmol/dakika /mg doku olarak tarif edilmiştir.

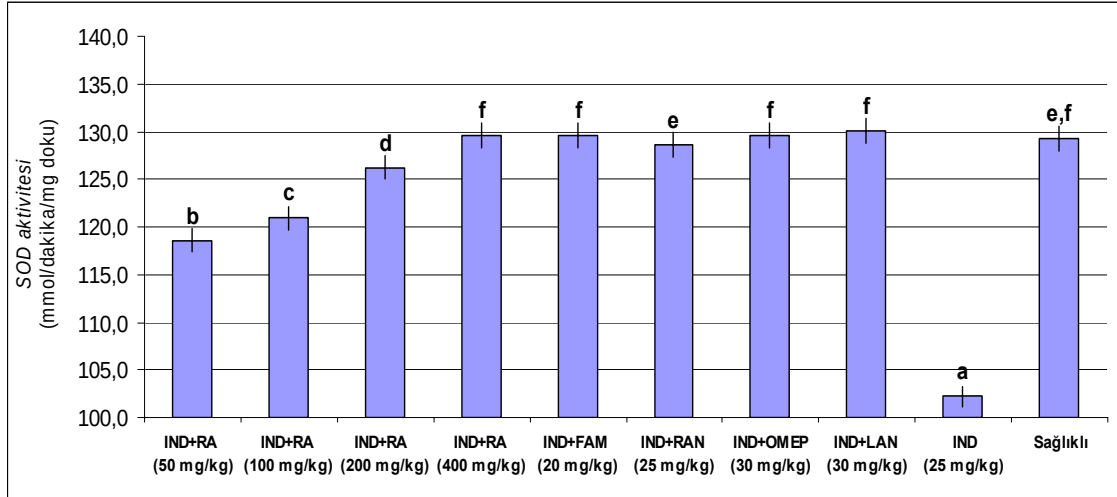
Tablo 4’den görüldüğü üzere SOD aktiviteleri kontrol grubunda 129.2 ± 0.3 , IND grubu midelerinde 102.2 ± 0.4 , RAN grubunda 128.7 ± 0.1 , OMEP grubunda 129.7 ± 0.0 , FAM grubunda 129.5 ± 0.3 , LAN grubunda 130.0 ± 0.1 ve IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 118.6 ± 0.2 , 120.9 ± 0.2 , 126.2 ± 0.2 ve 129.6 ± 0.2 olarak tespit edilmiştir. Tablo 4 ve Şekil 25’de görüleceği gibi IND’nin önemli oranda ($p < 0.05$) azalttığı SOD aktivitesini, rizonil alkolün tüm (50, 100, 200 ve 400 mg/kg) dozları yeniden artırmış ($p < 0.05$) ve hatta 400 mg/kg dozu kontrol seviyesine ulaştırmıştır. Referans ilaçlarda rizonil alkole benzer şekilde uygulandıkları dozlarda bu enzimin aktivitesini artırmışlardır.

Tablo 4 ve Şekil 25’de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen SOD aktivitesinde ki inhibisyon ($p < 0.05$) uygulanan rizonil alkolün tüm dozları ve referans ilaçlar tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular rizonil alkol, RAN, FAM, OMEP ve LAN’nın SOD aktivitesi üzerine aktive edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	SOD aktivitesi (mmol/dakika/mg doku)	% Aktivite
IND+RA	6	50	118.6 ± 0.2b	91.8*
IND+RA	6	100	120.9 ± 0.2c	93.6*
IND+RA	6	200	126.2 ± 0.2d	97.7*
IND+RA	6	400	129.6 ± 0.2f	100.3*
IND+FAM	6	20	129.5 ± 0.3f	100.2*
IND+RAN	6	25	128.7 ± 0.1e	99.6*
IND+OMEP	6	30	129.7 ± 0.0f	100.4*
IND+LAN	6	30	130.0 ± 0.1f	100.6*
IND	6	25	102.2 ± 0.4a	79.1
Sağlıklı	-	-	129.2 ± 0.3e,f	100.0*

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



Şekil 25. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.4.3. CAT aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri

Rizonil alkol (50, 100, 200 ve 400 mg/kg), FAM, RAN, OMEP, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen CAT aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 26'da gösterilmiştir. CAT aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak mmol/dakika/mg doku olarak tarif edilmiştir.

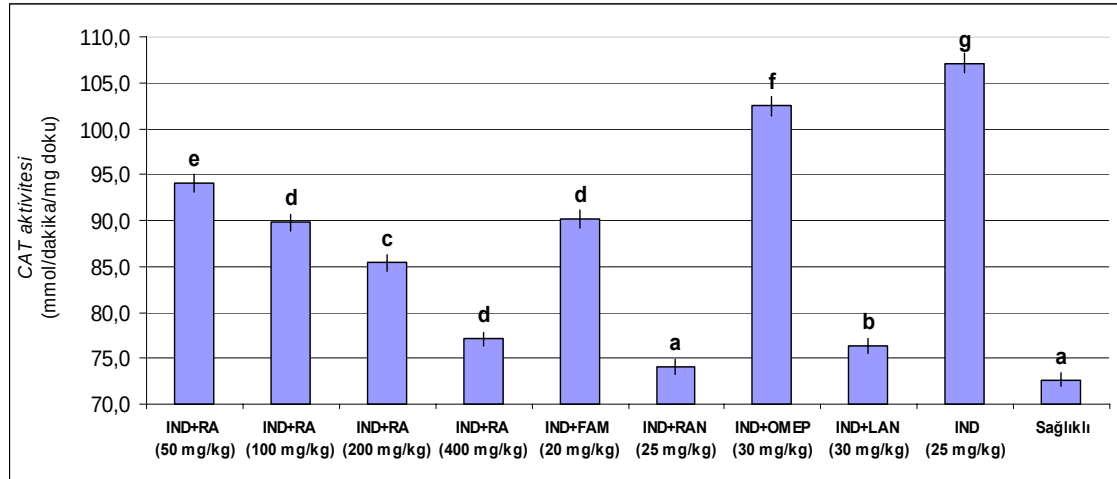
Tablo 5'de görüldüğü üzere CAT aktiviteleri kontrol grubunda 72.6 ± 0.5 , IND grubu midelerinde 107.1 ± 0.8 , RAN grubunda 74.1 ± 0.3 , OMEP grubunda 102.5 ± 0.6 , FAM grubunda 90.2 ± 0.6 , LAN grubunda 76.3 ± 0.2 ve IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 94.1 ± 0.4 , 89.8 ± 0.4 , 85.4 ± 0.5 ve 77.1 ± 1.0 mmol/dakika/mg doku olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND'nin önemli oranda ($p < 0.05$) artırdığı CAT aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan RAN sağlıklı ile aynı seviyeye getirmiş, OMEP ise az miktarda IND seviyesinden azaltırken, FAM (%124.2) ve LAN (%105.1) kontrol (%100) seviyesine yaklaştırmıştır. Diğer yandan, rizonil alkolün tüm dozlarının CAT aktivitesini azaltarak sağlıklı doku seviyesine getirmesi de ($p < 0.05$) oldukça dikkat çekicidir.

Tablo 5 ve Şekil 26'da görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen CAT aktivitesinde ki inhibisyon ($p < 0.05$) uygulanan rizonil alkolün tüm dozları ve referans ilaçlar tarafından ortadan kaldırılmış ve kontrol seviyesine yaklaştırılmıştır ($p < 0.05$). OMEP için ise bu inhibisyon daha düşük düzeyde kalmıştır. Bu bulgular rizonil alkol, RAN, FAM, OMEP ve LAN'ün CAT aktivitesi üzerine inhibe edici etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Tablo 5. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	CAT aktivitesi (mmol/dakika/mg doku)	% Aktivite
IND+RA	6	50	94.1 ± 0.4e	129.6*
IND+RA	6	100	89.8 ± 0.4d	123.7*
IND+RA	6	200	85.4 ± 0.5c	117.6*
IND+RA	6	400	77.1 ± 1.0d	106.2*
IND+FAM	6	20	90.2 ± 0.6d	124.2*
IND+RAN	6	25	74.1 ± 0.3a	102.1*
IND+OMEP	6	30	102.5 ± 0.6f	141.2*
IND+LAN	6	30	76.3 ± 0.2b	105.1*
IND	6	25	107.1 ± 0.8g	147.5
Sağlıklı	-	-	72.6 ± 0.5a	100.0*

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



Şekil 26. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.4.4. GPO aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri

Destile su içerisinde süspansiyon haline getirilerek uygulanan rizonil alkolün (50, 100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GPO aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 27’de gösterilmiştir. GPO aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak nmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi.

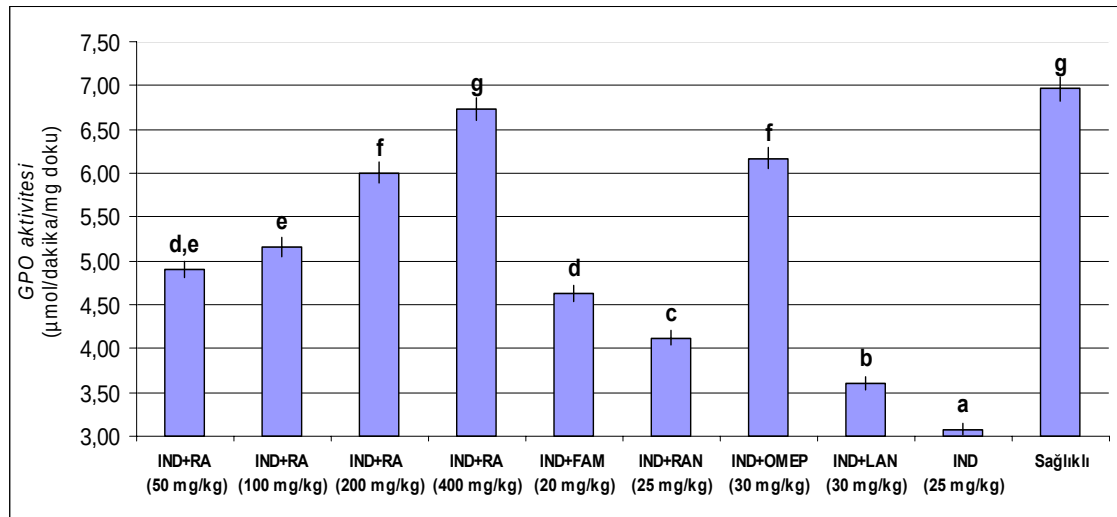
Tablo 6’da görüldüğü üzere GPO aktiviteleri kontrol grubunda 6.97 ± 0.01 , IND grubu midelerinde 3.08 ± 0.03 , RAN grubunda 4.12 ± 0.08 , OMEP grubunda 6.17 ± 0.05 , FAM grubunda 4.62 ± 0.04 , LAN grubunda 3.60 ± 0.01 ve IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 4.90 ± 0.02 , 5.16 ± 0.31 , 6.00 ± 0.04 ve 6.73 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre GPO aktivitesini IND’nin önemli oranda ($p<0.05$) azalttığı belirlendi (Tablo 6 ve Şekil 27). Rizonil alkolün tüm dozları ise doz artışına bağlı olarak GPO aktivitesini yeniden artırmıştır. Referans olarak kullanılan ilaçlar FAM, RAN, OMEP ve LAN içerisinde GPO aktivitesini en çok OMEP aktive etmiş (%88.52) fakat diğer ilaçlarda önemli ($p<0.05$) oranlarda aktivite artışı sağlamışlardır.

Tablo 6 ve Şekil 27’de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GPO aktivitesinde ki inhibisyon ($p<0.05$) IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozlarında ortadan kaldırılmış ve yeniden artırılmıştır ($p<0.05$). Bu bulgular rizonil alkol, RAN, OMEP, FAM, LAN’nın IND ile birlikte uygulandığında GPO aktivitesini artırıcı etkisinin olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 6. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon peroksidaz (GPO) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GPO aktivitesi (μ mol/dakika/mg doku)	% Aktivite
IND+RA	6	50	4.90 $\pm$ 0.02d,e	70.30*
IND+RA	6	100	5.16 $\pm$ 0.31e	74.03*
IND+RA	6	200	6.00 $\pm$ 0.04f	86.08*
IND+RA	6	400	6.73 $\pm$ 0.01g	96.56*
IND+FAM	6	20	4.62 $\pm$ 0.04d	66.28*
IND+RAN	6	25	4.12 $\pm$ 0.08c	59.11*
IND+OMEP	6	30	6.17 $\pm$ 0.05f	88.52*
IND+LAN	6	30	3.60 $\pm$ 0.01b	51.65*
IND	6	25	3.08 $\pm$ 0.03a	44.19
Sağlıklı	-	-	6.97 $\pm$ 0.01g	100.0*

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



Şekil 27. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon peroksidaz (GPO) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.4.5. GSH aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri

Destile su içerisinde süspansiyon haline getirilerek uygulanan rizonil alkolün (50, 100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GSH miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 28’de gösterilmiştir. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg doku olarak tarif edildi.

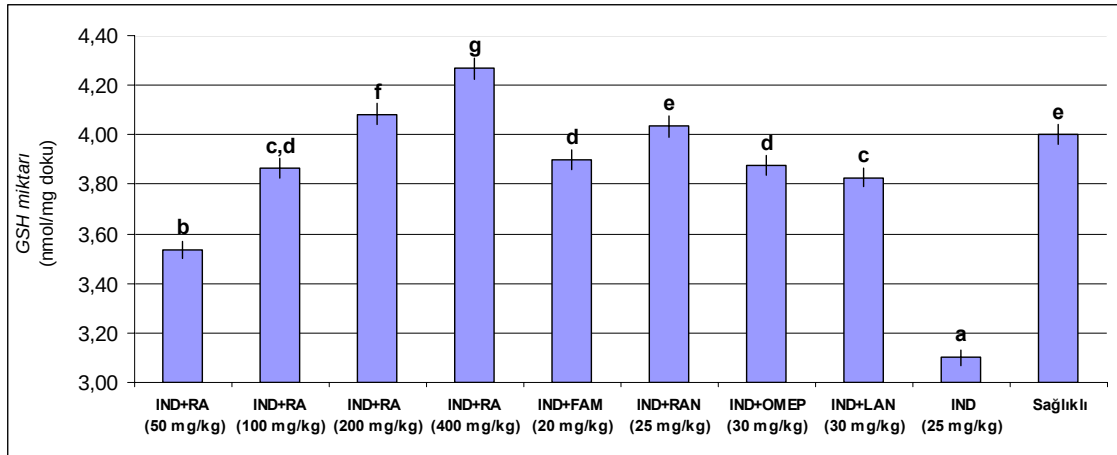
Tablo 7’de görüldüğü üzere GSH miktarları kontrol grubunda 4.00 ± 0.02 , IND grubu midelerinde 3.10 ± 0.02 , RAN grubunda 4.03 ± 0.01 , OMEP grubunda 3.88 ± 0.02 , FAM grubunda 3.90 ± 0.02 , LAN grubunda 3.83 ± 0.02 ve rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 3.53 ± 0.01 , 3.87 ± 0.01 , 4.08 ± 0.01 ve 4.27 ± 0.02 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND’nin azalttığı GSH miktarını, IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün uygulanan tüm dozlarının artırdığını ($p<0.05$) ve hatta 400 mg/kg dozunun kontrolden de yukarı seviyeye çıkardığı ($p<0.05$) belirlendi. Referans ilaçlarımızda rizonil alkole benzer etki göstererek GSH aktivitesini artırmış ($p<0.05$) bu ilaçlardan RAN kontrol seviyesinin de üzerine çıkarmıştır.

Tablo 7 ve Şekil 28’de de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GSH miktarındaki azalma ($p<0.05$) IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozları ve referans ilaçlarımız FAM, RAN, OMEP ve FAM tarafından yeniden artırılmıştır. Bu bulgular rizonil alkolün, OMEP, LAN, FAM ve RAN’nın IND ile birlikte uygulandıklarında GSH miktarını artırdığını göstermektedir.

Tablo 7. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutatyon (GSH) miktarları üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GSH miktarı (nmol/mg doku)	% miktar
IND+RA	6	50	3.53 ± 0.01b	88.25*
IND+RA	6	100	3.87 ± 0.01c,d	96.75*
IND+RA	6	200	4.08 ± 0.01f	102.0*
IND+RA	6	400	4.27 ± 0.02g	106.75*
IND+FAM	6	20	3.90 ± 0.02d	97.5*
IND+RAN	6	25	4.03 ± 0.01e	100.75*
IND+OMEP	6	30	3.88 ± 0.02d	97.0*
IND+LAN	6	30	3.83 ± 0.02c	95.75*
IND	6	25	3.10 ± 0.02a	77.5
Sağlıklı	-	-	4.00 ± 0.02e	100.0*

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



Şekil 28. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki toplam glutatyon (GSH) miktarları üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.4.6. GST aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri

Saf su içerisinde süspansiyon haline getirilerek uygulanan rizonil alkol (50, 100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GST aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 8 ve Şekil 29’da gösterilmiştir. GST aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak nmol/dakika /mg doku olarak tarif edilmiştir.

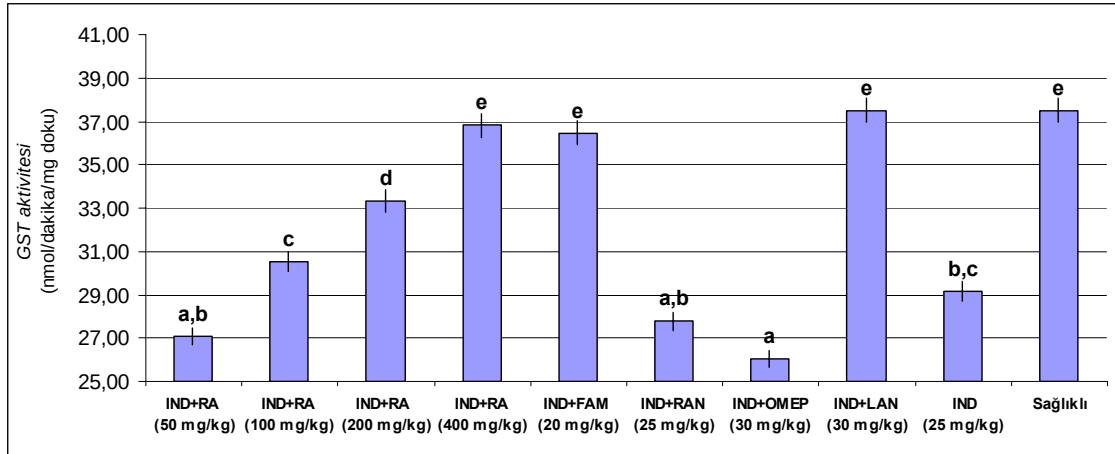
Tablo 8’de görüldüğü üzere GST aktiviteleri kontrol grubunda 37.50 ± 0.6 , IND grubu midelerinde 29.17 ± 0.6 , RAN grubunda 27.78 ± 0.9 , OMEP grubunda 26.04 ± 0.6 , FAM grubunda 36.47 ± 0.6 , LAN grubunda 37.50 ± 0.6 ve IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 27.08 ± 0.6 , 30.56 ± 0.9 , 33.33 ± 0.6 ve 36.81 ± 0.9 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND’nin önemli ($p < 0.05$) düzeyde azalttığı GST aktivitesini rizonil alkolün 50 (%72.21) ve 100 (%81.49) mg/kg dozları etkilemezken ($p > 0.05$), 200 (%88.88) ve 400 (%98.18) mg/kg dozlarının ise artırdığı ($p < 0.05$) gözlemlendi. Referans ilaçlardan LAN ve FAM de GST aktivitesini rizonil alkole benzer şekilde önemli ($p < 0.05$) oranda artırırken, tam tersine RAN ve OMEP ise bu enzimin aktivitesini azaltmıştır.

Tablo 8 ve Şekil 29’dan da görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GST aktivitesinde ki inhibisyon ($p < 0.05$) IND ile birlikte uygulanan 200 ve 400 mg/kg rizonil alkol, LAN ve FAM tarafından ortadan kaldırılmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($p < 0.05$). Bu bulgular rizonil alkolün IND ile birlikte uygulandığında GST aktivitesini artırıcı etkisinin olduğunu göstermektedir.

Tablo 8. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GST aktivitesi (nmol/dakika/mg doku)	% Aktivite
IND+RA	6	50	27.08 ± 0.6a,b	72.21
IND+RA	6	100	30.56 ± 0.9c	81.49
IND+RA	6	200	33.33 ± 0.6d	88.88*
IND+RA	6	400	36.81 ± 0.9e	98.18*
IND+FAM	6	20	36.47 ± 0.6e	97.25*
IND+RAN	6	25	27.78 ± 0.9a,b	74.08
IND+OMEP	6	30	26.04 ± 0.6a	69.44*
IND+LAN	6	30	37.50 ± 0.6e	100*
IND	6	25	29.17 ± 0.6b,c	77.79
Sağlıklı	-	-	37.50 ± 0.6e	100.0*

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



Şekil 29. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.4.7. GR miktarı üzerine rizonil alkolün etkileri

Destile su içerisinde süspansiyon haline getirilerek uygulanan rizonil alkol (50, 100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GR miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 9 ve Şekil 30'da gösterilmiştir. Numunelerin GR miktarları, $\mu\text{mol/dakika/mg}$ doku olarak tarif edildi.

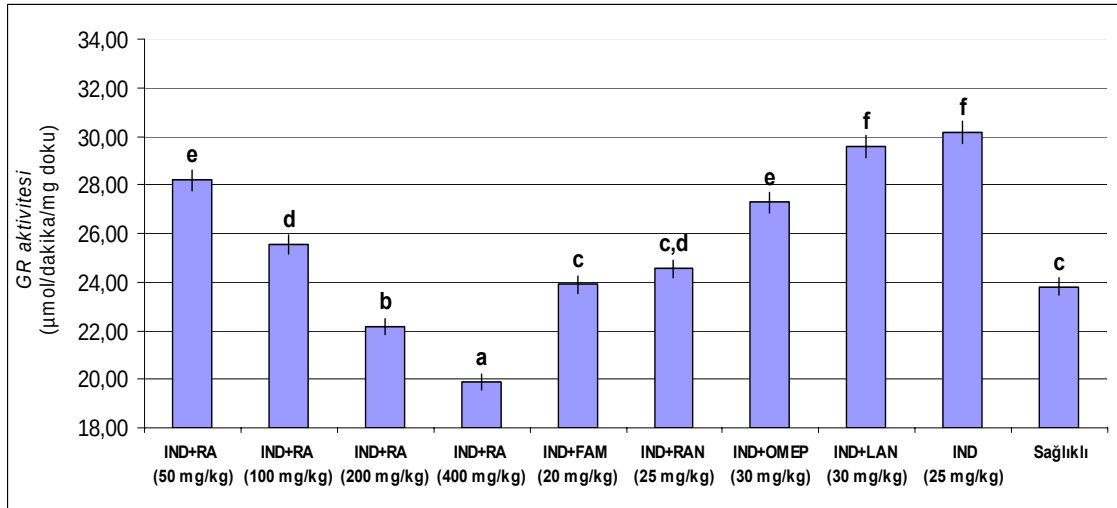
Tablo 9'da görüldüğü üzere GR miktarları kontrol grubunda 23.79 ± 0.10 , IND grubu midelerinde 30.17 ± 0.55 , RAN grubunda 24.55 ± 0.27 , OMEP grubunda 27.28 ± 0.14 , FAM grubunda 23.90 ± 0.51 , LAN grubunda 29.58 ± 0.09 ve IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 28.19 ± 0.24 , 25.56 ± 0.09 , 22.19 ± 0.67 ve 22.19 ± 0.67 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin önemli oranda ($p < 0.05$) artırdığı GR miktarını, IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozları tarafından doz artışına bağlı olarak önemli ($p < 0.05$) oranda azaltıldığını göstermektedir. Referans ilaçlarımızda benzer şekilde FAM (%100.46), RAN (%103.19) ve OMEP (%114.67)'lik oranlarda GR aktivitesini azaltmışlardır. Referans ilaçlardan yalnızca LAN (%124.34)'ın GR aktivitesi üzerine etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Bu oranlar kontrol için %100 ve IND için %126.82 olduğu dikkate alındığında oldukça dikkat çekicidir.

Tablo 9 ve Şekil 30'dan da görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GR miktarındaki artış ($p < 0.05$) IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozları tarafından azaltılmış ($p < 0.05$), FAM ve RAN tarafından kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($p > 0.05$). Bu bulgular rizonil alkolün IND ile birlikte uygulandığında GR miktarını azalttığını göstermektedir.

Tablo 9. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GR aktivitesi ($\mu\text{mol/dakika/mg doku}$)	% Aktivite
IND+RA	6	50	$28.19 \pm 0.24\text{e}$	118.50*
IND+RA	6	100	$25.56 \pm 0.09\text{d}$	107.44*
IND+RA	6	200	$22.19 \pm 0.67\text{b}$	93.27*
IND+RA	6	400	$19.88 \pm 0.19\text{a}$	83.56*
IND+FAM	6	20	$23.90 \pm 0.51\text{c}$	100.46*
IND+RAN	6	25	$24.55 \pm 0.27\text{c,d}$	103.19*
IND+OMEP	6	30	$27.28 \pm 0.14\text{e}$	114.67*
IND+LAN	6	30	$29.58 \pm 0.09\text{f}$	124.34
IND	6	25	$30.17 \pm 0.55\text{f}$	126.82
Sağlıklı	-	-	$23.79 \pm 0.10\text{c}$	100.0*

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



Şekil 30. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

4.4.8. MPO aktivitesi üzerine rizonil alkolün etkileri

Destile su içerisinde süspansiyon haline getirilerek uygulanan rizonil alkolün (50, 100, 200 ve 400 mg/kg) RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MPO aktivitesinin miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 31’de gösterilmiştir. Numunelerin MPO aktiviteleri $\mu\text{mol/dakika/mg}$ doku olarak tarif edildi.

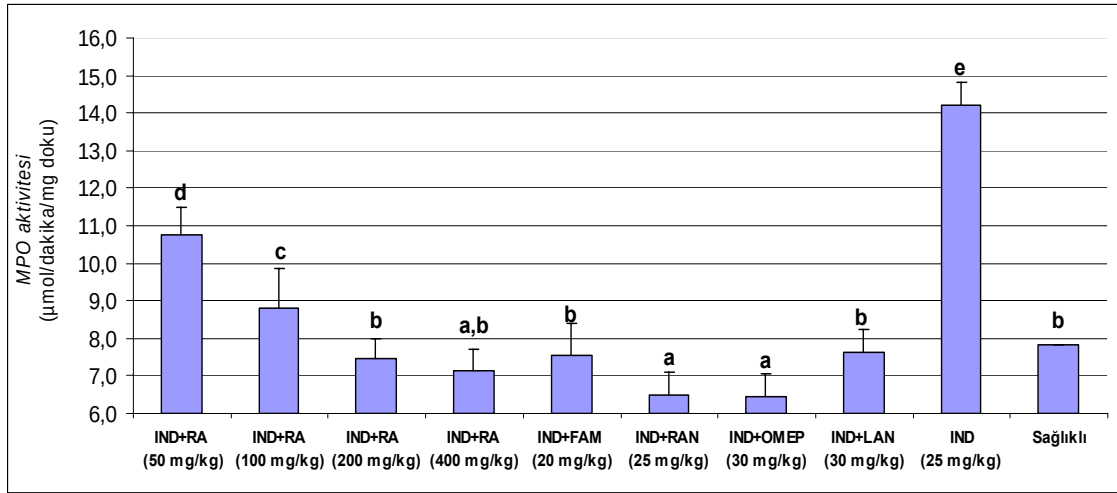
Tablo 10’da görüldüğü üzere MPO aktivitesi kontrol grubunda 7.83 ± 0.026 , IND grubu midelerinde 14.23 ± 0.25 , RAN grubunda 6.50 ± 0.17 , OMEP grubunda 6.46 ± 0.17 , FAM grubunda 7.56 ± 0.11 , LAN grubunda 7.64 ± 0.17 ve IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 10.77 ± 0.6 , 8.81 ± 0.17 , 7.47 ± 0.09 ve 7.47 ± 0.09 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND’nin önemli oranda ($p < 0.05$) artırdığı MPO aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün bütün dozlarda inhibe ettiğini ($p < 0.05$) göstermektedir. Referans olarak kullanılan ilaçlar FAM, RAN, OMEP ve LAN’ın ise sırasıyla % 96.55, 83.01, 82.50 ve 97.57’lik aktiviteyi azalttığı hatta kontrol seviyesinin altına düşürdükleri belirlendi.

Tablo 10 ve Şekil 31’de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen MPO miktarındaki artışın ($p < 0.05$) IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozlarının yanı sıra RAN, OMEP, FAM ve LAN tarafından da net bir şekilde ortadan kaldırıldığı ve kontrol grubundaki seviyeye getirildiği görülmektedir ($p < 0.05$). Bu bulgular rizonil alkol, RAN, OMEP, FAM ve LAN’ın IND ile birlikte uygulandıklarında MPO enziminin miktarını azalttığını göstermektedir.

Tablo 10. *Lobaria pulmonaria*'dan izole edilen rizonil alkol (RA) ile pozitif kontrol ilaçları famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	MPO aktivitesi ($\mu\text{mol/dakika/mg doku}$)	% Aktivite
IND+RA	6	50	$10.77 \pm 0.60\text{d}$	137.55*
IND+RA	6	100	$8.81 \pm 0.17\text{c}$	112.52*
IND+RA	6	200	$7.47 \pm 0.09\text{b}$	95.40*
IND+RA	6	400	$7.15 \pm 0.26\text{a,b}$	91.32*
IND+FAM	6	20	$7.56 \pm 0.11\text{b}$	96.55*
IND+RAN	6	25	$6.50 \pm 0.17\text{a}$	83.01*
IND+OMEP	6	30	$6.46 \pm 0.17\text{a}$	82.50*
IND+LAN	6	30	$7.64 \pm 0.17\text{b}$	97.57*
IND	6	25	$14.23 \pm 0.25\text{e}$	181.74
Sağlıklı	-	-	$7.83 \pm 0.026\text{b}$	100.0*

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



Şekil 31. Famotidin (FAM), ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP) ve lansoprazol (LAN)'ün tek; rizonil alkol (RA)'ün ise dört dozunun deneysel olarak indometazin (IND) ile ülser oluşturulan rat midelerindeki miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren diyagram. Sonuçlar 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklıdır ($\alpha=0.05$).

5. TARTIŞMA

Likenler, simbiyotik ilişki içerisinde uyumlu bir şekilde yaşayan bir fungus ve bir algden oluşur. Bu simbiyotik yaşam formu genellikle “sekonder metabolitler” olarak isimlendirilen çok sayıda madde üretir. Önceki dönemlerde bu maddeler fungal ürünler olarak tariflenirdi fakat izleyen yıllarda likenlerin simbiyotik partnerlerinin kültür ve ayırımı yapılmaya başlandığında çok sayıda araştırmacı bu maddelerin daima fungal partner tarafından üretildiğini rapor etmişlerdir^{52,74-77}. İlginçtirki, liken sekonder metabolitleri bitkiler tarafından da sentezlenememektedir^{75,78}. Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri bu çok özel moleküllerden ileri gelmekte ve yapılan biyolojik aktivite ölçümlerinde liken metabolitlerinin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmektedir^{52,77}. Üstelik bu maddelerin genellikle sitotoksik özelliklerinin az olması da ilaç özelliklerinin araştırılmasında önemli bir kazanç olarak yer almaktadır.

Literatürde liken ekstrelerinin ve liken metabolitlerinin antiülser etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Ülserin önlenmesinde oksidatif süreç üzerinde likenlerin etkili olup olmadığının tespit edilmesi hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Çalışma ekibimiz bu boşluğu biraz olsun doldurabilmek amacıyla bu konuda çalışmalar yapmaktadır^{52,111,113,114,116-120}. Mevcut araştırmada çalışılan liken türü olan *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm, Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya’nın dağlık kesimlerinde özellikle ağaçlarda yayılış gösterir. Ülkemizde genel olarak Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetişmektedir¹²¹. Bu bitki halk tıbbında egzama, solunum sistemi ile ilgili hastalıklar ve artrit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer yandan bazı ülkelerde yiyecek olarak kullanımının yanı sıra kozmetik sanayinde de kullanılmaktadır¹²²⁻¹²⁴. Parfüm sanayinde ise koku verici olarak

kullanılmaktadır¹²⁵. Fransa'da bu türden orman çayı adı verilen bir tür aromatik içki de yapılmaktadır¹²⁶. Ayrıca, bu likeniden hazırlanan ilaçlar uzun süre solunum düzensizliklerinin tedavi edilmesinde kullanılmıştır. *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm'dan hazırlanan çay laksatif (barsak gevşetici) olarak da kullanılmıştır. Ayrıca bir de kremi hazırlanmıştır^{126,127}.

Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. biranın mayalanmasında şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) yerine kullanılmış bir liken türüdür. Bu liken ile yapılan biranın şerbetçi otu ile yapılan birayla tamamen aynı olmasına karşın organizmayı daha çok uyuşturucu özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir¹²⁵. Bu likenin başlıca komponentleri gryrophoric asit, stictic asit ve norstictic asittir^{76,129}. Bunlardan gryrophoric asitin anti-proliferatif etkisinin olduğu tespit edilmiştir¹³⁰. Bu likeniden elde edilen bir polisakkaritin ise kemik iliği hücrelerini radyasyona karşı koruduğu ve hematopoetik kök hücrelerini desteklediği belirlenmiştir¹³¹.

Bütün bu bilgilerden yola çıkarak bu liken türü araştırma ekibimizin de dikkatini çekmiş ve bu liken türü üzerinde ekibimizde bazı araştırmalar yapmıştır. Bu likeniden elde edilen su¹¹⁶ ve metanol¹²⁰ ekstralarının gastroprotektif etkiye ve su¹¹⁶ ekstrelerinin ise anti-enflamatuvar etkiye sahip olduğu araştırma ekibimiz tarafından rapor edilmiştir. Bu liken türünün biyolojik aktiviteye sahip olmasındanyola çıkılarak çalışmalarımız bu likeniden aktiviteden sorumlu madde ve/veya maddelerin izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmaların sonucunda bu likenin aseton ekstrelerinden saflaştırılan stiktik asit, isidioforin ve rizonaldehitin antiülserojenik etkileri ve antioksidant sistem ile mekanistik ilişkileri araştırılmış ve bu konuda bir doktora tezi sonuçlandırılmıştır¹¹⁴. Mevcut araştırma *Lobaria pulmonaria* isimli liken türü üzerinde bugüne kadar araştırma ekibimizin yapmış olduğu çalışmaların bir devamı

niteliğindedir. Bu araştırmada *Lobaria pulmonaria*'nın aseton ekstresinden yukarıdaki maddelere ilave olarak “rizonil alkol” isimli farklı ve yeni bir molekül izole edilmiş ve antiülserojenik aktivitesi sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modeli kullanarak belirlenmiştir. Rizonil alkol ilk defa bu araştırmada saflaştırılarak karakterize edilmiş doğal bir bileşiktir. Ayrıca mevcut araştırmamızda sıçan mide dokularındaki antioksidant sistemin çeşitli parametreleri (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon s-transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, miyeloperoksidaz gibi enzimler ile glutatyon ve lipid peroksidasyon düzeyleri) üzerine etkileri araştırılarak rizonil alkolün anti-ülserojenik etkisi ile ülser sürecinde antioksidan mekanizma üzerine etkisi belirlenmiştir.

Araştırmamızda indometazin (IND) ile muamele edilen rat midelerinde meydana gelen ülserli doku hasarını (Tablo 2, Şekil 23), rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda IND'e göre sırasıyla %42.8, 56.4, 74.4 ve 84.6 ($p<0.05$) azalttığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, RAN'ın IND ile oluşturulan ülseri %76.4 oranında ($p<0.05$), OMEP'un IND ile oluşturulan ülseri %84.6 oranında ($p<0.05$), FAM'in IND ile oluşturulan ülseri %94.1 oranında ($p<0.05$), LAN'nın ise IND ile oluşturulan ülseri %95.0 oranında ($p<0.05$) azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 2 ve Şekil 23). Rizonil alkolün uygulanan dozları arasında en etkili doz 400 mg/kg olup RAN ile mukayese edildiğinde ülser önleyici etkisinin daha fazla, OMEP ile bu etkinin hemen hemen aynı olduğu görülmektedir.

IND'nin gastrik hasar oluşturmasının sebepleri arasında; mide dokusundaki sitoprotektif prostaglandinlerin sentezini inhibe etmesi²⁷⁷, LPO'yu artırması^{278,279}, doku glukoz seviyesini azaltması²⁸⁰, MPO aktivitesini ve NOS aktivitesini artırması²⁸¹⁻²⁸³ sayılabilir. IND, etanol ve diğer ajanlar ile oluşturulan mukozal hasarların reaktif

oksijen molekülleri ile ilişkili olduğu da literatürde kaydedilmiştir²⁸⁴. Literatürde rapor edilmiş çok sayıda araştırmada IND gibi anti-enflamatuar ilaçların hem prooksidan hem de lipit peroksit oluşturucu etkilerinin olduğu ve bu tür ilaçların mukozal hücrelerin antioksidan sistemlerini süratle bloke ederek reaktif oksijen türleri oluşumuna ve bu reaktif maddelerin oluşumunun da lipit peroksidasyonuna neden olabileceği öne sürülmüştür^{45,285}. Oksidatif hasarlar nedeni ile kontrol edilemeyen lipit peroksidasyonu bir süre sonra proteinlerde oksidasyona ve sonunda da hücre ölümüne yol açabilmektedir. IND ile oluşturulan gastrik hasarlı dokularda LPO miktarının arttığı üzerine çok sayıda rapor mevcuttur^{25,30,51,52,111,113,114,314}.

IND vasıtasıyla oluşturulan gastrik hasarın en önemli sebebi olarak prostaglandin sentezinin engellenmesi gösterilmektedir^{7,277, 289,315}. Prostaglandin sentezini gerçekleştiren prostaglandin H sentaz, hem COX hem de hidroperoksidaz aktivitesine sahiptir. İndometazinin gastrik toksisitesinin COX enzimini inhibe etme yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Fakat prostaglandin H sentazın gastrik toksisite ile ilgili olan aktivitesinin COX aktivitesinin yanı sıra peroksidaz aktivitesine bağlı olabileceği de göz ardı edilmemelidir³¹⁴. 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 IND tarafından inhibe edilmez, prostaglandin H sentazın peroksidaz aktivitesi göstermesi IND tarafından inhibe edilmediğine işaret eder³¹⁶. IND, 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. Bizim

bulgularımızda da IND ile muamele sonrası LPO miktarı önemli oranda arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlar bize indometazinin mide dokusunda oksidatif stresi artırarak lipid peroksidasyonuna neden olduğunu ve bunun da gastrik hasara neden olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün tüm dozları ve RAN, FAM, LAN ve OMEP gibi referans ilaçlar önemli oranda LPO miktarını azaltmıştır ($p<0.05$) (Tablo 3 ve Şekil 24).

Organizmalar reaktif oksijen türlerinin toksisitesine karşı hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptirler^{286,287}. ROS'lara karşı (özellikle de $[O_2^{\cdot-}]$ süperoksit anyonuna karşı) savunmada önemli süpürücü enzimlerden biri de SOD'dir. SOD'ler (sitoplazmik Cu / Zn SOD, Mitokondrial Mn-SOD), $O_2^{\cdot-}$ anyonunun H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizlerken CAT ve GPO ise H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşümünü katalizler²⁸⁸.

Araştırmamızda IND ile muamele edilen rat midelerinde belirlenen SOD aktivitesi (Tablo 4 ve Şekil 25) sağlıklı gruba göre önemli oranda az bulunmuştur ($p<0.05$). IND ile muamele edilen ratlarda rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarında uygulanması sonucu SOD aktivitesinde önemli oranda bir artış olmuş ve kontrol (sağlıklı) grubu seviyesine yükselmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde RAN, OMEP, LAN, FAM ile muamele edilmiş mide dokularında da SOD aktivitesini arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Bizim bulgularımızı doğrular mahitte IND ile ülser oluşturulmuş dokularda SOD enzim aktivitesinin azaldığı konusunda pek çok literatür kaydı mevcuttur^{279,289,290}. İndometazinin yanı sıra, diklofenak sodyum, meloksikam ve ketoprofenil gibi çeşitli NSAİİ'lerin de rat mide dokularında SOD aktivitesini azaldığı rapor edilmiştir^{52,113,279,290,291,292}. Fakat IND ve diğer NSAİİ'lerin hangi mekanizma ile SOD aktivitesini azalttığı henüz kesin olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Mevcut

sonuçlar bize IND tarafından azaltılan SOD aktivitesinin anti-ülser ilaçlar tarafından yeniden artırılmakta ve SOD enziminin IND tarafından oluşturulan oksidatif stresini azaltmakta önemli bir enzim olduğunu göstermektedir.

Daha öncede ifade edildiği gibi antioksidan savunma sisteminin inhibisyonu dokularda reaktif oksijen türleri birikimine yol açar. Reaktif oksijen türlerinin fazal üretildiği yerde SOD'yi de içine alan antioksidanların varlığı, IND ile uyarılan patojenezin kontrol edilmesinde koruyucu bir faktör olarak davranır²⁹¹. Araştırma sonuçlarımıza dayanarak IND etkisi ile azalan SOD aktivitesinin, rizonil alkolün tüm dozları, FAM, OMEP, LAN ve RAN tarafından yeniden artırıldığı ve bunun da oksidatif hasarı engelleyerek gastrik hasarın giderilmesinde rol oynadığı düşünülebilir. Cu, Zn ve Mn kompleksleri ile yapılan çalışmalarda SOD aktivitesi ile prostaglandin sentezi arasında bir ilişkiye işaret edilmiş ve IND ile oluşturulan ülser modelinin olası mekanizmalarından birisi olarak kabul edilmiştir^{7,289,293}. Bu araştırmalar ışığında ele alındığında mevcut araştırma çerçevesinde elde ettiğimiz bulgular prostaglandin seviyeleri üzerine de rizonil alkolün etkili olabileceği izlenimini vermektedir.

IND ile muamele sonucu prostaglandin konsantrasyonu azalsa da gastrik korumada prostaglandinlerin yanı sıra antioksidan savunma sisteminin de önemli katkı sağladığı göz ardı edilmemelidir²⁸⁹. SOD veya SOD'ye benzer etki gösteren antioksidanlar tarafından süperoksitlerin elimine edilmesi, gastrik koruma prosesinde önemli bir faktördür. Nitekim etanol ile uyarılan gastrik hasarlı dokularda SOD aktivitesinin azaldığı ve serbest radikallerin gastrik mukozal hasarın patojenezine katıldığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir^{289,294}. SOD inhibitörü olan dietilditiyokarbamat (DDC) verilen IND ile uyarılmış ülserli rat dokusunda SOD aktivitesinin azaldığı, bunun sebebinin ise mukozal asidifikasyonun yol açtığı

bikarbonat salgılanmasındaki artışın DDC tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir²⁹⁵. DDC'nin bikarbonat salgılanması üzerindeki inhibisyon etkisi SOD ilavesiyle tersine döndürülebilir²⁹⁶. Bu bilgilerden yola çıkarak SOD'nin ayrıca bikarbonat salgılanması prosesinde de rol aldığı söylenilebilir.

Bütün bu verilerden yola çıkarak RAN, OMEP, FAM, LAN ve rizonil alkolün 50, 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarının gastroprotektif etki göstermesinde, SOD aktivitesini artırmasının önemli bir paya sahip olduğunu düşünmekteyiz (Şekil 25).

Antioksidan savunma sisteminin diğer önemli bir üyesi ise CAT enzimidir. CAT enzimi dokularda oluşan hidrojen peroksiti (H_2O_2) H_2O ve O_2 gazına dönüştürür. Araştırmamızda IND tarafından önemli oranda artırılan CAT aktivitesinin rizonil alkolün tüm dozları ve RAN, FAM, LAN ve OMEP tarafından yeniden azaltıldığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 26). Bu bilgiler anti-ülser etkide CAT enziminin de önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Daha önce belirtildiği gibi, SOD oldukça reaktif süperoksit radikalini daha az reaktif olan H_2O_2 'e dönüştürür. Dokularda oluşan H_2O_2 ise hem CAT hem de GPO enziminin substratıdır. Daha önce yapılan bilimsel çalışmalar SOD aktivitesinin NSAİİ ler tarafından azaltıldığını göstermiştir^{267,273,284,291,317}. Indometazin ile muamele edilmiş mide dokularındaki düşük SOD aktivitesi superoksit radikallerinin SOD tarafından H_2O_2 'e dönüştürülememesi anlamına gelir. Bununla beraber, indometazin ile muamele edilmiş mide dokularında CAT enziminin aktivitesi sağlıklı dokuya nazaran daha yüksek bulunmuştur (Tablo 5, Şekil 26). Halbuki, CAT aktivitesindeki bu artış dokulardaki H_2O_2 miktarının artışına bir delildir³¹⁸. Yaptıkları bir çalışmada dokularda H_2O_2 oluşumu sadece SOD enzimi ile olmadığını ve asidik ortamda (özelikle pH=4.8) superoxide radikallerinin kendiliğinden H_2O_2 ve peroksil ($HOO\cdot$) radikaline

dönüştüğünü tespit etmişlerdir. Üstelik superoxide ve perhidroksil radikalleri birbirleri ile reaksiyona girerek biri yükseltgenirken diğeri ise indirgenerek H_2O_2 oluşumuna neden olabilirler³¹⁹. Tablo 6 ve Şekil 27’den görüleceği üzere indometazin GPO enziminin aktivitesini de azaltmıştır. Mevcut bulgularımız literatürle uyum içerisinde ve GPO aktivitesinin IND tarafından azaltıldığı rapor edilmiştir^{30,263,291}. Bu açıdan bakıldığında IND ile muamele edilen dokularda CAT aktivitesi artarken GPO aktivitesinin azalması her iki enzimin H_2O_2 ’yi kullanmakta yarışıyor olmalarından kaynaklanıyor da olabilir^{126,298}. CAT ve GPO enzimleri H_2O_2 ’yi H_2O ’ya dönüştürerek zayıf radikal etkisini ortadan kaldırır. Çünkü H_2O_2 ortaklanmamış bir elektron içermediği için kendi başına güçlü bir radikal değildir^{299,300}. Bununla beraber, hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. GPO enziminin inhibisyonu ve yukarıda bahsedilen bu dönüşümlerin sonucu olarak, dokulardaki H_2O_2 miktarındaki artış indometazin ile muamele edilmiş dokularda CAT enziminin aktivitesinde bir artışa neden olmuş olabilir. Bunların yanısıra, H_2O_2 , Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturabilir^{111,163}. Bu yüzden dokularda oluşan H_2O_2 ’nin suya dönüştürülmesi zorunludur ve bu etmende CAT enziminin aktive etmiş olabilir. Indometazinin aksine, Rizonil alkol ve referans ilaçlarla ülserin azaltıldığı dokularda CAT enziminin aktivitesi oksidatif stresin azalmasına bağlı olarak daha az düzeyde bulunmuştur (Tablo 5 ve Şekil 26).

Dokulardaki glutatyon (GSH) ve glutatyon-bağı enzimler (GST, GR ve GPO) antioksidan özelliklerinden dolayı önemli koruyucu ajanlar olarak görülmektedir³²⁰. GSH ve GST antioksidan sistemin önemli bileşenleridir ve bu özelliklerinden dolayı

dokularda fazla miktarda bulunurlar. NSAİİ kullanımı sonucu bu antioksidanların mide dokusunda azalması midede lipid peroksidasyonuna ve bunun sonucunda da gastrik hasara neden olur^{141,290,321}. Bu sonuçlara uygun olarak Şekil 28 ve Tablo 7'den görülebileceği gibi GSH miktarı IND tarafından önemli oranda azaltılmıştır ($p<0.05$). Bu bulgular IND tarafından meydana getirilen gastrik hasarın temel sebeplerinden birisinin de gastrik GSH düzeyinin azaltılması olduğunu doğrulamaktadır. Bulgularımız literatürlerdeki bulgular ile tam bir uyum içerisinde^{289,290,306}. Diğer taraftan, IND ile birlikte uygulanan rizonil alkolün bütün dozları (özellikle 200 ve 400 mg/kg) ve referans ilaçlar (FAM, LAN, RAN ve OMEP) ise GSH miktarını yeniden artırarak ($p<0.05$) antioksidan savunma sistemini olumlu yönde etkilemiş ve gastrik hasar oluşumunu azaltmıştır.

Tablo 8 ve Şekil 29'dan görüldüğü üzere kontrol grubunda ki GST aktivitesi 37.50 ± 0.6 olup, IND ile muamele edilen grupta 29.17 ± 0.6 'lık seviyeye düştüğü gözlenmiştir. Indometazinin aksine, rizonil alkol ile muamele edilmiş gastrik dokularda bu dokularda GST enziminin doza bağlı olarak aktive olduğu tespit edilmiştir. GST aktivitesindeki artış özellikle 200 ve 400 mg/kg dozlarda daha belirgindir. Bu sonuçlar rizonil alkolün 200 ve 400 mg/kg dozlarının GST aktivitesi üzerinde önemli oranda etkin olduğunu göstermektedir. Çeşitli kimyasal ajanların çoğu GSH ve GSH-bağlı enzimlerin konsantrasyonunu artırarak etki gösterdikleri rapor edilmiştir³⁰⁷⁻³⁰⁹. Özellikle GPO ve GST gibi faz II enzimlerinin uyarıcıları potansiyel kemopreventif ajanlar olarak düşünülmektedir³¹¹ ve bazı kemopreventif ajanların çeşitli dokularda GSH ve GSH-bağlı enzimleri uyardığı da belirlenmiştir³¹⁰. Çeşitli dokulardaki GSH ve GSH-bağlı enzimler (GPO ve GST) antioksidan ve detoksifikasyon özelliklerinden dolayı kemoprevensiyon biomarkırları olarak dikkate

alınırlar^{312,313}. Bu açıdan bakıldığında, GST, GSH ve GPO aktivitesinde meydana getirdiği artış nedeniyle rizonil alkole, potansiyel bir kemopreventif ajan gözüyle bakılabilir.

Tablo 7 ve Şekil 28'den görüleceği üzere gastrik hasardan korunmada önemli bir antioksidan olan GSH düzeyi indometazin verilmiş dokularda sağlıklı dokuya nazaran daha düşük düzeyde bulunmuştur. Antioksidan savunma sisteminin diğer önemli bir bileşeni ise GR enzimi olup bu enzim NADPH'ı kullanarak yükseltgenmiş olan glutatyonu (GSSG) GSH a dönüştürür³²². Mevcut araştırma sonuçlarımız indometazinin sağlıklı dokuya nazaran GR aktivitesini azalttığını göstermektedir (Tablo 9 ve Şekil 30). Indometazin ile muamele edilmiş dokularda GSH miktarındaki bu azalma dokulardaki GSSG/GSH oranını korumak üzere GR aktivitesindeki artış ile sonuçlanmış olabilir. Bununla beraber, rizonil alkolün muamelesi ile bu enzimin aktivitesindeki artış yeniden tersine döndürülmüştür (Tablo 9 ve Şekil 30). Bu sonuçlar literatür ile de uyumlu olup indometazin ile muamele edilmiş mide dokusunda GR aktivitesinin artışı belirtilmiştir^{279,291,297}.

Gastrik mukozal dokuların içerisindeki nötrofil salınımı MPO enzimi ile kontrol altında tutulmaya çalışılır. MPO deneysel olarak oluşturulmuş çeşitli gastrik yaralarda nötrofil salınımının bir göstergesi olarak kullanılır^{301,302}. Gastrik mukozal dokuların içerisindeki nötrofil salınımı çeşitli gastrik lezyonların patolojisinde tehlikeli bir oluşumdur^{303,304}. Nötrofil salınımının artması durumunda MPO ve reaktif oksijen türlerini içeren doku zararlılarının hücre içerisinde dışarıya doğru salınımında bir artışın olduğu artık iyi bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar da mide dokusunda oluşan gastrik mukozal hasarların MPO aktivitesini artırdığını göstermektedir^{304,305}.

Tablo 10 ve Şekil 31’den de görüldüğü üzere kontrol grubunda ki MPO aktivitesi 7.83 ± 0.26 ve IND grubu midelerinde ise 14.23 ± 0.25 olarak ölçülmüştür. İndometazin muamelesi sonucu mide dokusundaki yüksek MPO aktivitesi gastrik dokuya nötrofil salınımının arttığını göstermektedir. Bununla beraber bu enzimin aktivitesi IND ile birlikte uygulanan FAM, RAN, OMEP, LAN’nın ve rizonil alkolün de tüm dozları tarafından önemli oranda azaltılmış ($p < 0.05$) olup bu maddelerin nötrofil salınımını azalttığına işaret etmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada,

1. *Lobaria pulmonaria* isimli likenin aseton ekstresinden LP-IV olarak kodlanmış bir madde izole edilerek kimyasal yapısı UV, IR, 1D- ve 2D-NMR spektroskopik yöntemleri ile aydınlatıldı. Araştırma ekibimiz tarafından “rizonil alkol” olarak isimlendirilen bu maddenin yapılan literatür taramalarının sonucunda yeni bir madde olduğu anlaşıldı.
2. Rizonil alkolün IND ile oluşturulan ülseri önemli oranda önlediği belirlendi.
3. Rizonil alkolün CAT, MPO, GR, GPO, GST, SOD aktivitesi, GSH ve LPO miktarları üzerine etki ederek dokuların lehine olacak şekilde modülatör etkiye sahip olmasının gastroprotektif etkisi ile ilişkili olduğu anlaşıldı.
4. Rizonil alkolün diğer ülser modellerinde denenmesinin, onun ülser koruyucu ve antiülserojenik etkisi hakkında daha detaylı bilgilere ulaşabilmek açısından faydalı olacağı kanaatine varıldı.
5. Bu çalışmadan elde edilen bulguların “IND ile oluşturulan ülserlerde ROS’ların etkin rol oynadığı” hipotezini desteklediği ve antiülserojenik süreçte önemli parametreler olan “NOS, PGE ve COX seviyeleri ile mide asit ve mukus salgısı üzerine etkileri de araştırılmak suretiyle rizonil alkolün gastroprotektif çalışmalarda değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.ss

6. KAYNAKLAR

1. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Philadelphia: WB Saunders Co 6th ed. 2002: 604–615.
2. 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. *Eur J Pharmacol* 1998; 348: 257–263.
3. Sen T, Abdul Salam CA, Pal S, Sen S, Chaudhuri AKN. Effect of dothiepin on gastric ulceration mediated by lipid derived eicosanoids. *Life Sci* 2000; 66 (23): 325–330.
4. Wallace JL, Granger DN. Pathogenesis of NSAID gastropathy: are neutrophils the culprits? *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 129–131.
5. Banerjee S, Hawksby C, Dahill S, Beattie D, Mc Coll KEI. Effect of *H. pylori* and its eradication on gastric juice ascorbic acid. *Gut* 1994; 335: 317–322.
6. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS. *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut* 1994; 32: 179–185.
7. Whittle BJR. Temporal relationship between COX inhibition, as measured by prostaglandin biosynthesis and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in rat. *Gastroenterol* 1981; 80: 94–98.
8. Kauffman G. Aspirin induced gastric mucosal injury: lessons learned from animal model. *Gastroenterol* 1989; 96: 606–614.
9. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PD, Howley CJ. Mechanism of gastric and duodenal damage and protection. *Hepatogastroenterol* 1992; 39 (Suppl. 1): 31–36.

10. Ito S, Lacy ER. Morphology of rat gastric mucosal damage, defence and restitution in the presence of luminal ethanol. *Gastroenterol* 1985; 88: 250–260.
11. Hudson N, Everitt S, Edwards T. Elevation of gastric mucosal leukotriene B4 levels of patients on long-standing NSAID therapy. *Gastroenterol* 1991; 100: A86.
12. Lau ATS, Graham GG, Day RO, Perry MA. Effect of aspirin an ulcer site blood flow in cat stomachs. *American J Physiol* 1992; 263 (26): G155–160.
13. Lanza LL, Walker AM, Bortnichak EA, Dreyer NA. Peptic ulcer and gastrointestinal haemorrhage associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use in patients younger than 65 years. *Archives of Internal Medicine* 1995; 155: 1371–1377.
14. Taha AS, Sturrock RD, Russel RI. Mucosal erosions in long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug users: predisposition to ulceration and relation to *Helicohacter pylori*. *Gut* 1995; 36: 334–336.
15. Isenberg JI, Mc Quaid KR, Laine L, Walsh JH. Acid peptic disorders. In: Yamada, T. (Ed.), *JB Lippincott, Philadelphia: Text Book of Gastroenterol* 2nd ed., PA. 1995; pp: 1347–1430.
16. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major cousative factor in stressinduced gastric ulceration. *Free Radical Biol Med* 1997; 23: 8–18.
17. Takuji M, Sato H, Hirose F, Doteuchi M. Effects of antioxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci* 1987; 41: 755–763.
18. Hung CR, Neu SL. Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. *J Nutr* 1997; 127: 630–6.

19. Tarnasky PR, Livingston EH, Jacobs KM, Zimmerman BJ, Guth PH, Garrick TR. Role of oxyradicals in cold water immersion restraint-induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 173–7.
20. Hye Kyung J, Kyung Eun L, Sang Hui C, Sun Young Y. *Helicobacter pylori* infection reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1336–1340.
21. Itoh M, Guth PH. Role of oxygen derived free radicals in hemorrhagic shock induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterol* 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. *J Clinical Biol* 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. *J Ethnopharmacol* 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, Martin 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 dipyrone on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa. Comparison with acetaminophen and diclofenac. *Dig Dis Sci* 2001; 47(6): 1389–1398.
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, 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.
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 Pres, 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). İstanbul Roche Bilimsel Eserler Serisi, 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. USA, *Proc Natl Acad Sci* 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. *Gastroenterol* 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-induced 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 sulphydryl compounds. *Pharmacol* 1997; 54: 193–202.

50. Bjarnason I, Zanelli G, Smith T *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterol* 1987; 93: 480–489.

51. Mizoguchi H, Ogawa Y, Kanatsu K, Tanaka A, Shinichi Kato And Koji Takeuchi. Protection by drugs of experimental intestinal lesions; Protective effect of rebamipide on indomethacin-induced intestinal damage in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1112–1119.

52. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C.. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 103 (1): 59–65.

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* 2002a; 54 (3): 255–259.
54. Suleyman H, Akcay F, Altinkaynak K. The effect of nimesulide on the indomethacin- and ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol Res* 2002b; 45 (2): 155–158.
55. Bilici D, Suleyman H, Banoglu ZN, et al. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 2002c; 47 (4): 856–861.
56. Banoğlu NZ, Süleyman H, Gepdiremen A, Sadeler D. *Sophora japonica*'dan Elde Edilen Ekstrenin Stres Ülserleri Üzerine Etkileri ve Ranitidin ile Karşılaştırılması. Antalya: Türk Farmakoloji Derneği-XIII. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 1996.
57. Ulak G, Çiçek R, Sermet A. et. al. Balık Yağının Sıçanlarda Soğuk ve İmmobilizasyon Stresinde Koruyucu Etkisi. Antalya: Türk Farmakoloji Derneği-XII. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 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, Alarcon de la Lastra C. Healing process induced by flavonic fraction of *Bidens aurea* on chronic gastric lesion in rat. *Zeitschrift für Naturforschung C-A J Biosci* 1996; 51 (7–8): 570–577.
63. Manonmani S, William S, Subramanian S, 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 charatia* 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, 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, 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, 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, Carlini EA. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* Species in Laboratory Animals. *J Ethnopharmacol* 1991; 34 (1): 21–27.
71. Tanaka S, Yoon YH, Fukui H, Tabata M, Akira T, Okano K, Iwai M, Iga Y, Yokoyama K. Antiulcerogenic Compounds isolated from *Chinese 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* 2002c. 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. Crittenden PD, David JC, Hawksworth DL, Campbell FS. Attempted isolation and success in the culturing on a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. *New Phytol* 1995; 130: 267–298.
75. Odabasoglu F. Likenler. *Pharma Sark* 2006b; 1 (3): 16–19.
76. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1996.
77. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 1999; 86: 559–570.
78. Lawrey JD. Biological role of lichen substances. *The Bryologist* 1986; 89(2): 111–122.

79. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, Milne GWA, Proksa B, 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.
80. Karagöz A, Aslan A. Antiviral and cytotoxic activity of some lichen extracts. *Bratislava: Biologia* 2005; 60 (3): 281–286.
81. Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortis A, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E, Hidalgo ME. Activity of Compounds Isolated from Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Comp Biochem Physiol C* 1997; 116: 51–55.
82. Gücin F, Dülger B, Aslan A. *Pseudoevernia furfuracea*(L.) Zopf. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji-Çevre Dergisi* 1997; 7(25): 22–24.
83. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotech Lett* 2005a; 27 (14): 991–995.
84. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Tissue culture of some lichens and screening of their antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties. *Phytother Res* 2007; 21(12): 1159–1170.
85. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. *Bioresource Tech* 2008; 99 (4): 776–784.
86. Rankovic B, Misic M, Sukdolak S, Milosavljevic D. Antimicrobial activity of the lichens *Aspicilia cinerea*, *Collema cristatum*, *Ochrolechia androgyna*, *Physcia aipolia* and *Physcia caesia*. *Italian J Food Sci* 2007; 19 (4): 461–469.

87. Rankovic B, Misic M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24 (7): 1239–1242.
88. Zovko M, Kosalec I, Pepeljnjak S, KaloPera Z, Partl A, Bakmaz M. Antioxidant and antimicrobial activity of lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. Planta Medica 2006; 72 (11): 1035–1035.
89. Aslan A, Gulluce M, Sokmen M, Adiguzel A, Sahin F, Ozkan H. Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. Pharm Biol 2006; 44 (4): 247–252.
90. Cansaran D, Atakol O, Halici MG, Aksoy A. HPLC analysis of usnic acid in some Ramalina species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities. Harm Biol 2007; 45 (1): 77–81.
91. Güllüce M, Aslan A, Sökmen M, Şahin F, Adıgüzel A, Ağar G, Sökmen A. Screening the antiaxidant and Antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. Phytomedicine 2006;13: 515–521.
92. Yucel O, Odabasoglu F, Gulluce M, Calik ZZ, Cakir A, Aslan A, Yazici K, Halici M. Antioxidant and antimicrobial properties of a lichen species, Cladonia rangiformis growing in Turkey. Turkish J Pharmaceutical Sci 2007; 4 (2): 101–109.
93. Odabasoglu F, Gulluce M, Cakir A, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Yazici K. Investigation of antioxidant and antimicrobial properties of three lichen species growing in Turkey. Antalya-Turkey: 19th European Workshop on Drug Metabolism (DMW-2004), October 2004a; 03-08

94. Wei XL, Jeon HS, Han KS, Koh YJ, Hur JS. Antifungal activity of lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. *Plant Pathol J* 2008; 24(2): 202–206.
95. Schindler H. Zur Geschichte der Anwendung von Flechten(Lichens) in der Medizin. *Carolinea* 1988; 46: 31–36.
96. Demleitner S, Kraus J, Franz G. Synthesis and Antitumor Activity of Derivates of Curdlan and Lichenan Branched at C-6. *Carbohydr Res* 1992; 226: 239-245.
97. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Vanella L, Cardile V, Garbarino J. Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Anti-cancer Drugs* 2006; 17 (10): 1163–1169.
98. Braasch J, Jacopsen P. Flechten und Ihre Allergene. *Allergologie* 1991; 14: 99–104.
99. Huneck S, Schreiber K. Wachstumsregulatorische Eigenschaften von Flechten- und Moos-Inhaltsstoffen. *Phytochem* 1972; 11: 2429–2433.
100. Ingolfssdottir K, Wiedemann B, Birgisdottir M, Nenniger A, Jonsdóttir S, Wagner H. Inhibitory Effects of Baeomycesic Acid from the Lichen “*Thamnolia subulisformis*” on 5-Lipoxygenase in vitro. *Phytomed* 1997; 4: 125–129.
101. Higuchi M, Miura Y, Boohene J, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Yoshimura Y, Yamada Y. Inhibition of Tyrosinase Activity by Cultured Lichen Tissues and Bionts. *Planta Med* 1993; 59: 195–199.
102. Seifert P, Bertram C. Usnic Acid-Natural Preservation from Lichens. *Seifen Öle Fette Wachse* 1995; 121: 480–485.
103. Galun M, Ronen R, Interaction of Lichens and Pollutants. In: Galun M, ed. *CRC Handbook of Lichenology Vol. Boca Raton: III. CRC, 1988; P: 55.*

104. Yazıcı K, Aslan A. Distribution of epiphytic lichens and air pollution in the city of Trabzon, Türkiye. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicol 2006; 77: 838–845.
105. Kirschbaum U, Wirth V. Flechten Erkennen, Luftgüte Bestimmen. Stuttgart: Eugen Ulmer 1995.
106. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1998.
107. Paudel B, Bhattarai HD, Lee JS, Hong SG, Shin HW, Yim JH. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island .Antarctica: Polar Biol 2008; 31(5): 605-608.
108. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U, Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. LWT-Food Sci TECH 2006; 39 (1): 80–85.
109. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. Phytotherapy Res 2005b; 19 (1): 58–64.
110. Devehat FLL, Tomasi S, Elix JA, Bernard A, Rouaud I, Uriac P, Boustie J. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. J Natural Products 2007; 70 (7): 1218–1220.
111. Halıcı M. Ratlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde “*usnea longissima*” dan elde edilen su ekstresinin antiülserojenik ve bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması. Sağ Bil Enst Ecz Fak Biyokimya ABD, Yüksek Lisans tezi Erzurum, 2003.

112. Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y, Halici M. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia* 2005; 76 (2): 216–219.
113. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine* 2005;12: 656–662.
114. Halıcı M. Bazı likenlerden izole edilen maddelerin sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde antiülserojen mekanizmalarının araştırılması. Fen Bil Enst-Kimya ABD, Doktora Tezi, Erzurum, 2007a.
115. Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Halici M, Bayir Y. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytother Res* 2004b; 18: 938–941.
116. Suleyman H, **Odabasoglu F**, Aslan A, Cakir A, Karagoz Y, Gocer F, Halici M, Bayir Y. Antiinflammatory and antiulcer effects of aqueous extract of *Lobaria pulmonaria*. *Phytomedicine* 2003; 10 (6–7): 552–557.
117. Bayir Y, **Odabasoglu F**, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine* 2006a; 13 (8): 584–590.
118. Bayir Y, Karakus B, **Odabasoglu F**, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Yucel O, Halici M. Effects of the methanol extract of *Lobaria pulmonaria* on antioxidant system and gastric damages in rats. 31st FEBS CONGRESS-Molecules in Health & Disease Abstracts. The FEBS Journal **2006b**; 273 (Supp1): 176.
119. **Odabasoglu F**, Karakus B, Bayir Y, Suleyman H, Yucel O, Aslan A, Cakir A, Halici M. Effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria* on glutathione s-

transferase activity and gastric damages in rats. Abstracts from XIXth International Symposium on Medicinal Chemistry. Drugs of the Future **2006c**; 31 (Suppl A): 168.

120. Karakus-Ayas B. Deneyisel olarak ülser oluşturulan ratlarda *Lobaria pulmonaria* isimli likenden elde edilen metanol ekstratlarının antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkisi. Sağ Bil Enst Ecz Fak Biyokimya ABD, Yüksek Lisans tezi Erzurum, 2007.

121. Aslan A. Erzurum-Kars-Artvin arasında yer alan bölge likenleri üzerine taksonomik incelemeler. Uludağ üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Doktora tezi BURSA, 1995.

122. Biswas K. Common medicinal plants of Darjeeling and the Sikim-Himalayas 1956: pp 90.

123. Wirth V. Die flechten. Baden Württembergs Verleg Eugen. Turner 1987: pp 528.

124. Zeybek U, John V. Likenler (Lichenes), kimyasal bileşikleri ve tıbbi kullanımları. Pharmacia-JTPA 1992; 32(1): 37–48.

125. Smith AL. Lichens. England: The Richmond Publishing Co Ltd. Surrey, 1975.

126. Aslan A, Öztürk A, Kaya E. Likenlerin ekonomik önemi ve Oltu bölgesinden tesbit edilen önemli liken türleri. Erzurum: Geçmişten geleceğe Oltu ve Çevresi Sempozyumu. 1-3 Temmuz 1998; 356–364.

127. Öztürk Ş. Yüzyılların çevrecisi likenler. Bilim ve Teknik 1995; 328: 74–79.

128. EMPVMEU. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit; Summary report ‘*Lobaria pulmonaria*’, EMEA/MRL/672/99-Final. August 1999.

129. Culberson CF. Chemical and botanical guide to lichen products. The Univ of North Carolina Press Chapel Hill 1969.

- 130.** Kumar KCS, Müller K. Lichen metabolites. II. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Prod* 1999; 62: 821–826.
- 131.** Liu S. Radiosensitivity of marrow stromal cells and the effect of some radioprotective agents *Zhongguo Yi Xue Ke Yuan Xue Bao. Zhongguo Yi Xue Ke Yuan Xue Bao. Acedemiae Medicinae Sinicae* 1991; 13 (5): 338–342.
- 132.** Arıncı K, Elhan A. *Anatomi I.Cilt . Ankara: Güneş Kitabevi, 2001; 241-245*
- 133.** Junquiera L-C, Corneiro J, Keley RO. *Basic Histology. İstanbul: Barış Kitabevi, 1993; 356.*
- 134.** Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi fizyoloji. TÜRKİYE: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 1013s.*
- 135.** Karataş C. Klasik ve çapraz gastrojejunostomi yapılan ratlarda mide boşaliminin karşılaştırılması. *TC Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 1. Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık tezi İstanbul, 2006.*
- 136.** Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. *Feryal Matbaacılık Sanayi ve Tic Ltd Şti 3. Cilt, 7.Baskı: 1997; 2818-2856.*
- 137.** Schmassmann A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104: 43–51.
- 138.** Mozsik G, Jovar T. Biochemical and pharmacological approach to the genesis of ulcer disease. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 92–105.
- 139.** Sullivan M, Yool DA. Gastric disease in the dog and cat. *The Vet J* 1998; 156: 91-106.
- 140.** Vatn S, Sjaastad OV, Ulvund MJ. Histamine in lambs with abomasal bloat, hemorrhage and ulcers. *J Vet Med* 2000; 47: 251–255.

141. Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K, Maity P, Banerjee RK. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radical Biol Med* 2006; 40: 1397–1408.
142. Özden A. İşte *Helicobacter pylori*, gastrit, peptik ülser. *Türk Gastroenteroloji derneği yayını*, 1996.
143. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, et al. Cyclo-oxygenase isoenzymes. *Drugs* 1997; 53: 563–82.
144. Lee S, Simon MD. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 1999; 106: 37–42.
145. Maricic N, Ehrlich K, Gretzer B, Schuligoi R, Respondek M, Peskar BM. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors aggravate ischemia-reperfusion injury in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1659–1666.
146. Burke A, Smyth E, Fitz Gerald GA. In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Laurence L. Brunton, Ed. Mc Graw. New-York: Hill Companies 2006;11: 671–717.
147. Suleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 2007b; 59: 257–268.
148. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15: 801–820.
149. Laine L. Gastrointestinal effects of NSAİİs and coxibs. *J Pain Symptom Manage* 2003; 25: 32–40.

- 150.** Takeuchi K, Kagawa S, Mimaki H, Aoi M, Kawauchi S. COX and NOS isoforms involved in acid-induced duodenal bicarbonate secretion in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2116–2124.
- 151.** Brendan JRW. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500: 427–439.
- 152.** Villegas Í, La Casa C, La Lastra CA, Motilva V, Herrerias JM, Martin MJ. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response. *Life Sci* 2004; 74: 873–884.
- 153.** Jung H, Kyung Eun L, Sang Hui C, Sun Young Y. Helicobacter Pylori infection reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol and Hepatol* 2001; 16: 1336–1340.
- 154.** Jainu M, Devi CSS. Gastro protective action of Cissus quadrangularis extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chemico-Biol Interac* 2006; 161: 262–270.
- 155.** Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291–295.
- 156.** Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by Punica granatum L. (pomegranate) methanol extract. *J Ethnopharmacol* 2005; 96: 171–176.
- 157.** Jain A, Mehta T, Krauss AN, Auld PA, Meister A. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects of lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 5093–5097.

- 158.** Fornai M, Natale G, Colucci R, Tuccori M, Carazzina G, Antonioli L, Baldi S, Lubrano V, Abramo A, Blandizzi C, Del Tac M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAİİ-induced gastric mucosal damage. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005; 372: 79–87.
- 159.** Sandor V, Cuparencu B, Dumitrascu DL, Birt MA, Krausz TL. Protective effects of amphetamine on gastric ulcerations induced by indomethacin in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7168–7171.
- 160.** Berenguer B, Sanchez LM, Quilez A, Lopez-Barreiro M, Haro O, Galvez J, Martin MJ. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAİİ- induced gastric ulcers. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 194–200.
- 161.** Barros MP, Sousa JPB, Bastos JK, Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 567–571.
- 162.** Monteiro MVB. Ana Karine Rocha de Melo Leite, Luciana Medeiros Bertini, Selene Maia de Moraes, Diana C'elia Sousa Nunes-Pinheiro. Topical antiinflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves, *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 378–382.
- 163.** Odabaşoğlu F. Antioksidan Vitaminler, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Erzurum: Konferans Kitapçığı, 8 Mart 1999.
- 164.** Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995; 1-80.
- 165.** Rucker RB, Steinberg F. Vitamin C. *Encyclopedia of Biol Chem* 2004; 4: 367-371.
- 166.** Kanfer JG, Ashwell JJ, Burns JJ. Formation of L-lyxonic and L-xylonic acids from L-ascorbic acid in rat kidney. *J Biol Chem* 1960; 235: 2518–2521.

- 167.** Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *J Nutr* 2003; 2: 1-10.
- 168.** Tuncer ŞD. Vitaminler: Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Ankara: Pozitif yayıncılık, 2006; 117-118.
- 169.** Fox PF, McSweeney PLH. Dairy Chemistry and Biochemistry. London: Blackie Academic & Professional, an imprint of Yhomson Science 1998; 289-291.
- 170.** İmİK H, Fidancı UR, Sel T. Ankara Keçisi oğlaklarında C ve E vitaminlerinin metabolik strese karşı etkisi. *Vet Bil Derg* 1999; 15: 47-53.
- 171.** Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am College of Nutr* 2003; 22: 18–35.
- 172.** Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border Membrane Vesicles. *J Nutr* 2000; 130: 63–69.
- 173.** Rose RC, Choi JL. Intestinal absorption and metabolism of ascorbic acid in rainbow trout. *Am J Physiol* 1990; 258: 1238- 41.
- 174.** Olson JA, Hodges RE. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin C in humans. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 693- 703.
- 175.** Huges DA. Dietary antioxidants and human immune function. *Founda. British Nutr* 2000; 25: 35-41.
- 176.** McCorkle F, Taylor R, Stinson R, Day EJ, Glick B. The effects of a mega level of vitamin C on the immune response of the chicken. *Poultry Sci* 1980; 59: 1324- 1329.
- 177.** Wu CC, Dorairajan T, Lin TL. Effect of ascorbic acid supplementation on the immune response of chickens vaccinated and challenged with infectious bursal disease virus. *Vet Immunol and Immunopathol* 2000; 74: 145-152.

- 178.** Perdue SL, Thaxton JP, Brake J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *J Applied Physiol* 1985; 58: 1511- 1516.
- 179.** Iqbal K, Khan A, Khattak MMAK. Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health – A review. *Pakistan J Nutr* 2004; 3: 5- 13.
- 180.** Halpern SL. Quick reference to clinical nutrition a guide for physicians. America, 1979; 175-176.
- 181.** Belaiche J, Burette A, De Vos M, Louis E, Huybrechts M, Deltenre M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. *Acta Gastroenterol Belg* 2002; 65: 65-73.
- 182.** Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 1999; 106: 37- 42.
- 183.** Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon: AKÜ Yayın, 2000; 1-35.
- 184.** Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
- 185.** Weis SJ, LoBuglio AF. Biology of disease: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982; 47: 5-18.
- 186.** Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Med.* 2007; 1-9.
- 187.** Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoat K, Xin W. Nutritional aspects of free radicals. *Pro Nutr Soc* 1987; 46: 1-12.
- 188.** Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Rad Biol Med* 1985; 1: 3-25.

189. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41(12): 1819-1828.
190. Szabo S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. Scand J Gastroenterol 1987; 127: 21-8.
191. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions . Mol Biotechnol 2007; 37: 2–4.
192. Auroma O. Free radicals, antioxidants and international nutrition review. Asia Pacific J Clin Nutr 1999; 8: 53- 63.
193. Halliwell B. Tell me about radicals, doctor: a review. J Royal Society of Med 1989; 82: 747-752.
194. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 7915-7922.
195. Robison TW, Murphy JK, Beyer LL, Richters A, Forman HJ. Depression of stimulated arachidonate metabolism and superoxide production in rat alveolar macrophages following in vivo exposure to 0.5 ppm NO₂. J Toxicol Environ Health 1993; 38: 273-92.
196. Aslan R, Dündar Y. Bir fizyolojik eleman ve radikal olarak azot oksit. Hay Araş Derg 1998; 8: 34-38.
197. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. Med Sci Monit 1998; 4: 1089-1095.
198. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>.

- 199.** Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37: 1932-7.
- 200.** Georgieva NV. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – A Review. *Bulgarian J Vet Med* 2005; 8: 1:11.
- 201.** Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
- 202.** Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Biochem. and Biophys* 1978; 191: 351-357.
- 203.** Dengiz GO, Odabasoglu F, Halici Z, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y. Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Arch Pharm Res* 2007. 30 (11): 1426–1434.
- 204.** Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Office J Turk Nephrol Assoc* 1997; 3-4: 92-95.
- 205.** Prichard M, Ducharme NG, Wilkins PA, Erb HN, Butt M. Xanthine Oxidase Formation during Experimental Ischemia of the Equine Small Intestine. *Can J Vet Res* 1991; 55: 310-314.
- 206.** Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free Radicals: The Pros and Cons of Antioxidants, *J Nutr* 2004; 134: 3143–3163.
- 207.** Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklundi S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. *J Biol Chem* 1999; 274: 4985–4994.
- 208.** Doctor RB, Mandel LJ. Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1: 959-969.

- 209.** McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England J Med* 1985; 312: 159-163.
- 210.** Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 -dioxygenase reaction. *J Biol Chem* 1971; 25: 7825.
- 211.** Hung-Hai K, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med* 1993; 15: 621-627.
- 212.** Ersoy A, Dilek K. Hemodiyaliz Hastalarında Eritrosit Membran Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidatif Homeostazis Değişiklikleri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg* 1999; 1: 1-4.
- 213.** Jana AK, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by ultrasound: Mechanism and implications. *J Biosci* 1990; 15: 211–215.
- 214.** Li JM, Shah AM. ROS Generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 221–226.
- 215.** Comporti M. Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 599- 623.
- 216.** Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letter* 1991; 281: 9-19.
- 217.** Panduri V, Weitzman SA, Chandel NS, Kamp DW. Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: 1220–1227.
- 218.** Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 1987; 262: 8220-8226.

219. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Ann Emerg Med* 1986; 15: 1075-83.
220. Goulart M, Batore'u MC, Rodriguez AS, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagen* 2005; 20: 311–315.
221. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424: 83–95.
222. Halici M, Kufrevioglu OI, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aslan A, Koc M, Cadirci E, Atalay F. Gastroprotective and anti-oxidative properties of the some extracts from *Ramalina capitata*. 5th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry ISPC-, Abstracts. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007b; 4 (Special issue): 78.
223. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-25.
224. Long CA, Bislskl HJ. Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species *J Phys Chem* 1980; 84: 555- 557.
225. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrah Paşa Tıp Derg* 2004; 35: 140-149.
226. Dalle-Donne İ, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chem Acta* 2003; 329: 23–38.
227. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Gebicki JM, Dean RT. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem J* 1992; 282: 621-624.
228. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicol* 2002; 181-182: 219-222.

229. Epe B, Ballmaier D, Adam W, Grimm GN, Saha-Möller CR. Photolysis of N-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1625–1631.
230. Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Cadirci E, Suleyman H. Gastroprotective effect of vegetable oils and alpha-tocopherol on indomethacine-induced gastric ulcer in rats and its relation with myeloperoxidase and glutathione s-transferase activities. Antalya, TURKEY: 3rd International Meeting on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry 2007xxx October 16-21; P: 73.
231. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem.J* 1998; 335: 85-94.
232. Dilsizoğlu A, Kavuncuoğlu Z, Oba D. Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. *Tübitak Bilim ve Teknik* 2004; 439: 86–89.
233. Richardson DHS. *The Vanishing Lichens*. David and Charles Newton Abbot, 1975.
234. Richardson DHS. *Lichens as Pollution Monitors*. Richmond Publishing, 1992.
235. Taylor TN, Hass H, Remy W, Kerp H. The oldest fossil lichen. *Nature* 1995; 378, 244.
236. Nash I, Thomas H. *Lichen Biology*. Cambridge University Press 1996; 304p, UK.
237. Baron G. *Understanding Lichens*. England. Richmond Publishing Slough 1999.
238. Dobson FS. *Lichens: An Illustrated Guide to British and Irish Species*, by Fifth Edition Richmond Publishing, 2005.
239. <http://www.earthlife.net/lichens/intro.html>.

- 240.** Altun D. *Usnea longissima* Ach. Likenin Drosophila Melanogaster’ İin Çeşitli Gelişim Parametreleri Ve Ömür Uzunluğu Üzerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi ERZURUM, 2007.
- 241.** Ahmadjian V. The lichen symbiosis. Wiley. New York, 1993: 1- 6
- 242.** Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften 2002; 89:137–146.
- 243.** Sanders WB. Bacteria, algae, and phycobionts: maintaining useful concepts and terminology. The Lichenologist 2004; 36 (5): 269–275.
- 244.** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Likenler>.
- 245.** Armstrong RA. Lichens, Lichenometry And Global Warming. Microbiologist 2004; 5(3): 32–35.
- 246.** Boustie J, Grube M. Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genetic Resources 2005; 3(2): 273–287.
- 247.** Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 56: 9–16.
- 248.** Öztürk A, 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.
- 249.** Aslan A, Öztürk A. Oltu (Erzurum) Yöresine ait liken florası üzerine çalışmalar. Tr J Botany 1994; 18: 103–106.
- 250.** Aslan A. Lichens from the Regions of Artvin, Erzurum, Kars, Turkey. Israel J Plant Sci 2000; 48: 143–155.
- 251.** İçlim A, Dığrak M, Bağcı E. Bazı bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Tr J Biology 1998; 22: 119–125.

- 252.** Casselman KD. Lichen Dyes: The New Source Book. Mineola. Dover Publications 2001
- 253.** Harmala P, Hiltunen R, Caldentey KM, Laakso T, Kauppinen V. Isolation and in vitro cultivation of lichen alga and their antimicrobial properties. *Fitoterapia* 1992; 63 (3): 3217–3225.
- 254.** Tutel B. Liken biyolojisi ve faydaları. *Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 1986; 2(2): 185–94.
- 255.** Sommerfeldt M, John V. Evalution of a method for the reassessment of air quality by lichen mapping in the city of Izmir, Turkey. *Turkish Journal of Botany* 2001; 25: 45–55.
- 256.** Ingólfssdottir K. Molecules of interest: usnic acid. *Phytochem* 2002; 61: 729– 736.
- 257.** Vartia KO. Antibiotics in lichens. *I Ann-Med Ex Biol Fenn* 1950; 27: 46–54.
- 258.** Dülger B, Gücin F, Kara A, Aslan A. *Usnea florida* (L) Wigg likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Tr J Biology* 1997; 21: 103–108.
- 259.** Huneck S. New results on the chemistry of lichen substances. *Fortschr-Chem-Org-Naturst* 2001; 81: 1–276.
- 260.** Aslan A, Yazici K, Karagoz Y. Lichen flora of the Murgul district, Artvin, Turkey. *Israel J Plant Sci* 2002; 50 (1): 77–81.
- 261.** CCAC. Guide to the care and use of experimental animals, Vol I, 2nd Ed. Canadian Council on Animal Care. Ottawa, ON, Canada: Bradda Printing Services Inc, 1993.
- 262.** Guidobono F, Ticozzi PC, Sibilia BF, et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 581–586.

- 263.** 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.
- 264.** Abdel-Wahab MH, Arafa HMM, El-Mahdy MA, Abdel-Naim AB. Potential protective effect of melatonin against dibromoacetonitrile-induced oxidative stress in Mouse stomach. *Pharm Res* 2002; 46: 287-293.
- 265.** Bayır Y. *Usnea longissima* ACH. Liken türünden izole edilen difraktaik asitin indometazin ülseri üzerine koruyucu etkisi ve in-vivo antioksidan özelliklerinin araştırılması. Sağ Bil Enst Ecz Fak Biyokimya ABD, Yüksek Lisans tezi Erzurum, 2004.
- 266.** Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
- 267.** Sedlak J, Lindsay RHL. Estimation of total and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192–205.
- 268.** Sun Y, Larry WO, Ying LA. simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988; 34(3): 497–500.
- 269.** Aebi H. Catalase. *Method Enzymol*. 1984; 105: 121-126.
- 270.** Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952–958.
- 271.** Habig WH, Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. *Methods Enzymol* 1981; 77: 398–405.
- 272.** Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113: 484–490.

- 273.** Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206–209.
- 274.** Erdik E. Organik kimyada spektroskopik yöntemler. Gazi Kitabevi 1993; 531p.
- 275.** Fessenden RJ, Fessenden JS. Organik kimya. Ankara: Güneş Kitabevi, 1992; 1219p.
- 276.** Balci, Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi. METU yayınları, 2000.
- 277.** 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.
- 278.** 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.
- 279.** Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1969; 4: 265–267.
- 280.** 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 J Physiol* 2002; 283: 1082-1090.
- 281.** 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.
- 282.** 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.

- 283.** Jansson EA, Petersson J, Reinders C, Sobko T, Björne H, Phillipson M, Weitzberg E, Holm L, Lundberg JO. Protection from nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers by dietary nitrate. *Free Radical Biology Med* 2007; 42: 510–518.
- 284.** Eliot SN, Wallace JL. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can J Gastroenterol* 1998; 12: 559–568.
- 285.** 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.
- 286.** Verspaget HW, Mulder TPJ, van der Sluys Veer A, Pena AS, Lamers CBHW. Reactive oxygen metabolites and colitis; a disturbed balance between damage and protection. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 44–51.
- 287.** Smith SM, Kvietys PR. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Crit Care Med* 1988; 16: 892–898.
- 288.** Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481–493.
- 289.** 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.
- 290.** Alarcon de la lastra C, Barranco MD, Martin MJ, Herrerias J, Motilva V. Extra-virgin olive oil-enriched diets reduce indomethacin-induced gastric oxidative damage in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47 (12): 2783–2790.

291. Basiviredy J, Jacob M, Ramamoorthy P, Pulimood AB, Balasubramanian KA. Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. *Biochemical Pharmacol* 2003; 65: 683–695.
292. Halıcı M, Odabasoglu F, Suleyman H, Aslan A, Cakır A, Gocer F, Yucel O, Bayir Y. An Investigation On The Effects Of Water Extract Of *Usnea Longissima* On The Antiulcerogenic, And Some Antioxidant Enzymes Activities On The Model Of Indomethacine-Induced Ulcer In Rats. KUSADASI (Poster Presentation): 13th Balkan Biochemical Biophysical Days, 2003.
293. Franco L, Velo GP. A copper-complex reduced gastric damage caused by acetyl salicylic acid and ethanol. *Prostaglandins* 1996; 51: 331–338.
294. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 1395-1401.
295. Takeuchi K, Takehara K, Ohuchi T. Diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor, reduces indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Digestion* 1996; 57: 201–209.
296. Takeuchi K, Nishiwaki H, Niida H, Ueshima K, Okabe S. Duodenal ulcers induced by diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor in the rat: role of antioxidative system in the pathogenesis. *Jpn J Pharmacol* 1991; 57: 299–310.
297. Konjeti R, Sekhar, Spitz DR, Harris S, Nguyen TT, Meredith MJ. Et al. Redox-sensitive interaction between KIAA0132 and Nrf2 mediates indomethacin-induced expression of γ -glutamylcysteine synthetase. *Free Radical Biol Medicine* 2002; 32(7): 650–662.
298. Odabaşoğlu F, Küfrevioğlu Öİ. Effects of the Treating with Pesticides and Plant Hormones on Catalase, Peroxidase, and Polyphenol Oxidase Activities in Spinach (*Spinacia oleraceae* L.). *Bulletin Pure and Applied Sciences* 2001; 20B(2): 79–88.

- 299.** McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. *The J biological chemistry* 1969; 244: 6049–6055.
- 300.** Hemler ME, Cook HW, Lands WE. Prostoglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys* 1979; 193: 340–345.
- 301.** Nishida K, Ohta Y, Kobayashi T, Ishiguro I. Involvement of the xanthine–xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *Digestion* 1997a; 58: 340–351.
- 302.** Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthases in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997b; 236: 275–279.
- 303.** Yoshida M, Fukumura D, Wakabayashi G, Otani Y, Oshima A, Shimazu M, Kubota T, Kumai K, Kurose I, Miura S. Gastric microcirculatory disturbance and behavior of leukocytes after thermal-injury-intravital observation of arteriovenous shunting channels in the gastric submucosal layer. *J Gastro Hepatol* 1995; 10: 365–370.
- 304.** Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett* 1998; 425: 243–248.
- 305.** Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001; 43: 535–541.
- 306.** Yukgunja G, Shin H.M. Anti-oxidative herbs and indomethacin-induced rat gastric mucosal lesions. *Americcan Jou Chinese Med* 2001; 29: 101.

- 307.** 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.
- 308.** Stadler RH, Turesky RJ, Muller O, Markovic J, Leong Morgenthaler PM. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat Res* 1994; 308: 177–190.
- 309.** Prestera T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak C, Talalay P. The electrophilic counter attack responses: protection against neoplasia and toxicity. *Adv Enzyme Regul* 1993; 33: 281–296.
- 310.** Van Lieshout EMM, Peters WHM, Jansen JBMJ. Effect of oltipraz, α -tocopherol, β -carotene and phenyl isothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1439–1445.
- 311.** Aruna K, Sivaramakrishnan VM. Plant products as protective agents against cancer. *Ind J Exp Biol* 1990; 28: 1008–1011.
- 312.** Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione S-transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988; 202: 343–361.
- 313.** Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family; regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445–600.
- 314.** 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.

- 315.** Robert A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterol* 1975; 69: 1045–1047.
- 316.** 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.
- 317.** Figge H L, Figge J. The effects of amiodarone on thyroid hormone function: A review of the physiology and clinical manifestations. *J Clin Pharmacol* 1990; 30: 588–595.
- 318.** Mahadik S P, Scheffer R E. Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essenty Fatty Acids* 1996; 55: 45–54.
- 319.** Weiss J S, Lobuglio A F. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982; 47: 5–16.
- 320.** Meister A, Anderson M E. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711–760.
- 321.** Davies K J A. Oxidative stres, antioxidant defenses and damage removal, repair and replacement systems. *I U B M B Life* 2000; 50: 279–289.
- 322.** Shacter E, Lopez R L, Pati S. Inhibition of myeloperoxidase- H_2O_2 - Cl^- system of neutrophils by indometahcin and other non-steroidal anti- inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 975–984.