

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME
HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN GASTRİK
HASAR ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN GASTROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN VE BU ETKİLERİN ANTİOKSİDANT SİSTEM İLE
İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ.**

Murat KOÇ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Halit İMİK
Yardımcı Danışman
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2007

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
TABLOLAR LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET.....	IX
SUMMARY.....	X
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. ASKORBİK ASİT (VİTAMİN C).....	4
2.1.1. ASKORBİK ASİT’İN EMİLİMİ.....	8
2.1.2. ASKORBİK ASİT’İN İMMÜN SİSTEM VE HASTALIKLAR ÜZERİNE ETKİSİ.....	8
2.1.3. ASKORBİK ASİT YETERSİZLİĞİ.....	10
2.2. ÜLSER.....	10
2.2.1. İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN ÜLSERLER.....	12
2.3. ANTİOKSİDANLAR.....	13
2.3.1. SERBEST RADİKALLER.....	13
2.3.1.1. SERBEST RADİKAL ÇEŞİTLERİ.....	15
2.3.2. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI.....	20
2.3.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ.....	25
2.3.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	29
2.3.4.1. ENDOJEN (DOĞAL) ANTİOKSİDANLAR.....	29
2.3.4.1.1. PRİMER ANTİOKSİDANLAR.....	29
2.3.4.1.2. SEKONDER ANTİOKSİDANLAR.....	35
2.3.4.2. EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR.....	38
2.3.4.3. GIDA ANTİOKSİDANLARI.....	38
2.3.5. ANTİOKSİDAN ETKİ TİPLERİ.....	39
3. MATERYAL METOD.....	40
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR.....	40
3.2. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR.....	40
3.3. DENEYLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI.....	41

3.4. DENEY HAYVANLARI.....	45
3.5. RATLARDA İNDOMETAZİN-ÜLSERİNİN OLUŞTURULMASI VE ASKORBİK ASİT'İN VERİLMESİ.....	47
3.5.1.MİDE DOKUSUNUN MAKROSKOBİK İNCELENMESİ.....	47
3.5.2. MİDE DOKUSUNUN BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ.....	48
3.5.2.1. DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI.....	48
3.5.2.2. KATALAZ (CAT) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	48
3.5.2.3. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPx) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.	49
3.5.2.4. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ....	50
3.5.2.5. GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	52
3.5.2.6. MİYELOPEROKSİDAZ (MPx) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	53
3.5.2.7. GLUTATYON-S-TRANSFERAZ (GST) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	54
3.5.2.8. TOTAL GLUTATYON (GSH) MİKTARI ÖLÇÜMÜ.....	55
3.5.2.9. LİPİT PEROKSİDASYON (LPO) MİKTARI ÖLÇÜMÜ	56
3.5.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. MAKROSKOPİK BULGULAR.....	58
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	61
4.2.1. CAT AKTİVİTESİ ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ.....	61
4.2.2. SOD AKTİVİTESİ ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ	63
4.2.3.GST AKTİVİTESİ ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ.....	65
4.2.4. GSH MİKTARI ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ	67
4.2.5. GPx MİKTARI ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ	69
4.2.6. MPx MİKTARI ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ	71
4.2.7. LPO MİKTARI ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ	73
4.2.8. GR MİKTARI ÜZERİNE ASKORBİK ASİT'İN ETKİLERİ	75
5. TARTIŞMA.....	78
6. KAYNAKLAR.....	88

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve hazırlanmasında rehberlik eden ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Halit İMİK'e ve ko-danışmanım hocam Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU'na, Araş.Gör.Mesut B.HALICI ve Okt. Yasin BAYIR'a

Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.B.D. Başkanı sayın Prof. Dr. Fatma GÖÇER ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında çok büyük emekleri olan ve çalışmalarım esnasında hayvanlarla çalışmayı öğreten, kıymetli hocam; sayın Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN'a, bilgi ve becerileriyle her zaman yanımda olan hocam Yrd. Doç. Dr. Zekai HALICI' ya, çalışmamız esnasında desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, Arş. Gör. Elif ÇADIRCI'ya ve tüm Tıp Fakültesi Farmakoloji A.B.D. ekibine,

Sabır, anlayış ve hoş görüsüyle yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR'a

Eczacılık Fakültesi Dekanı sayın Prof. Dr. Yunus KARA ve Temel Bilimler Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU nezdinde tüm Eczacılık Fakültesi personeline,

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın ortaya çıkmasında bütün imkanlarını seferber eden Fakültemiz Dekanı ve Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları A.B.D Başkanı sayın Prof. Dr. Leyla YILDIZ ve dekan yardımcısı Doç. Dr. Mustafa ATASEVER başta olmak üzere Doç. Dr. Armağan HAYIRLI, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif YÖRÜK, Yrd. Doç. Dr. Mehmet GÜL ve Arş. Gör. M. Ali TUNÇ'a, ayrıca hayatımın her anında ve her alanında yanımda olan eşim Ayşegül KOÇ'a teşekkür ederim.

ŞEKİLLER LİSTESİ	Sayfa No :
Şekil 1. Askorbik Asit'in Molekül Yapısı.....	4
Şekil 2. Hayvanlarda Askorbat Mekanizması.....	6
Şekil 3. Glutasyon'un Molekül Yapısı.....	35
Şekil 4. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	56
Şekil 5. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	57
Şekil 6. IND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasarlı dokudan (A) ve askorbik asit (400 mg/kg) ile muamele edilmiş gruptan alınan (B) rat mideleri.....	58
Şekil 7. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki gastrik hasar alanlarının karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	60
Şekil 8. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki CAT aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	62
Şekil 9. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki SOD aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	64
Şekil 10. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GST aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	66
Şekil 11. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GSH aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	68
Şekil 12. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GPx aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	70

Şekil 13. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki MPx aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	72
Şekil 14. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki LPO aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	74
Şekil 15. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GR aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.....	76

TABLÖLAR LİSTESİ	Sayfa No :
Tablo 1. Yemlerin bileşimleri (%) ve besin madde değerleri.....	46
Tablo 2. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın rat midelerinde deneysel olarak indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine etkileri.	60
Tablo 3. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	62
Tablo 4. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	64
Tablo 5. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	66
Tablo 6. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutatyon (GSH) düzeyi üzerine etkileri.....	68
Tablo 7. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	70
Tablo 8. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki miyeloperoksidaz (MPx) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	72
Tablo 9. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki lipit peroksidasyon (LPO) düzeyi üzerine etkileri.....	74
Tablo 10. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	76

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin di fosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT	: Katalaz
CDNB	: 1-kloro 2,4-dinitrobenzen
COX	: Siklooksijenaz enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ETS	: Elektron taşıma sistemi
FAD	: Flavın adenin difosfat
GI	: Gastrointestinal
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MPx	: Miyeloperoksidaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NSAID	: Steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar
NBT	: Nitro blue tetrazolium
PG	: Prostaglandin
PUFA	: Polidoymamış yağ asiti

RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
XD	: Ksantin dehidrogenaz

ÖZET

Bu çalışmada, askorbik asitin sıçanlarda indometazin (IND) ile oluşturulan ülser modelindeki (*in vivo*) koruyucu etkisi araştırıldı. Her bir deney grubu 6'şar rattan oluşturuldu. 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda askorbik asit, 50 mg/kg dozda ranitidin (RAN), 30 mg/kg omeprazol (OMEP), 20 mg/kg famotidin (FAM), 30 mg/kg lansoprazol (LAN) ve 25 mg/kg dozda IND (negatif kontrol) oral yolla verildi. Çalışmada kontrol grubu (sağlıklı) olarak kullanılmak üzere bir gruba da musluk suyu verildi.

IND ile muamele edilen grupta meydana gelen ülserin, uygulanan Askorbik asit'in 100 ve 200 mg/kg dozlarında ($P<0.01$) ve 400 mg/kg dozda ($P<0.005$) da önemli oranda ülser oluşumunu azalttığı belirlendi. Diğer yandan, antioksidan savunma sistemlerinin ülser gelişimindeki rolünün belirlenmesi amacıyla, rat mide dokularında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon s-transferaz (GST), miyeloperoksidaz (MPx), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerinin aktiviteleri ile total glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) miktarları belirlendi. Bulgular, kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. IND uygulanan dokularda GST, SOD ve GPx enzim aktiviteleriyle GSH miktarı azalırken, GR, MPx ve CAT aktivitesiyle LPO miktarının arttığı tespit edildi.

Bu sonuçlar, askorbik asit, RAN, OMEP, FAM ve LAN verilen dokularda antioksidan savunma sisteminin IND verilen dokulardakinin aksine olumlu yönde etkilendiği ve gastrik mukozada üretilen serbest radikallerin etkilerinin de azaldığı bulunmuştur. IND'nin antioksidan savunma sistemini olumsuz etkileyerek gastrik hasar oluşumuna neden olduğu ve gastrik hasar oluşumu sırasında serbest radikallerin üretildiğini göstermektedir.

SUMMARY

Determination of Gastroprotective Effects Ascorbic Acid and the Relation of These Effects of With Antioxidant System on Indomethacin-Induced Gastric Damage in Rats.

In this study, the gastro-protective effects of Ascorbic acid in indomethacin induced ulcer model in rats was investigated, in vivo. Each of the experimental groups consisted from 6 rats. Ascorbic acid at 100,200 and 400 mg/kg doses, ranitidine (RAN) at 50 mg/kg, omeprazol (OMEPR) at 30 mg/kg, famotidine (FAM) at 20 mg/kg, lansaprazol (LAN) at 30 mg/kg dose and indomethacin (IND) at 25 mg/kg dose (negative control) administrated per orally. One group is separated as (healthy) control group and only water is given to this group.

It is determined that ulcers occurred in IND administrated tissues were significantly decreased by all doses of Ascorbic acid [100 and 200 mg/kg doses ($P<0.01$), 400 mg/kg doses ($P<0.005$)]. In order to discuss the role of antioxidant defense systems on ulcer progress, activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glutathione s-transferase (GST), Myeloperoxidase (MPx), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), and total glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO) amounts were determined in rat stomach tissues. Results appreciated by comparing with control groups. In IND administrated tissues, increased CAT and MPx activity and LPO amount in contrast to decreased activities of GST, GR, SOD and GPx and GSH amount were fixed.

These results suggested that ascorbic acid, RAN, OMEPR, FAM, LAN administrated-tissues, antioxidant defense system was affected affirmative in contrast to IND administrated tissues, and negative effects of free radicals (ROS), produced in gastric mucosa were reduced. Free radicals are produced in the gastric mucosal damage and IND also effects negatively to the antioxidant defense systems that to cause gastric mucosal damage formation.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Askorbik asit monasakkaritlere benzeyen 6 karbonlu enediol yapısında lakton şeklinde bir asittir. İkinci ve üçüncü karbonlarının meydana getirdiği enediol yapısı vücutta dehidro şekline kolayca dönüşebildiği için indirgendir. Askorbik asit bir hidrojen atomunu verdiği zaman oldukça kararlı-stabil olan askorbil radikaline dönüştüğü için oldukça güçlü bir antioksidan olarak bilinmektedir. Askorbik asit'in nitrojen oksit türleri, singlet oksijen, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve süperoksit radikaline karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür¹. Askorbik asit ve antioksidan enzimler gibi savunma faktörlerinin, radikali, hidrojen peroksit ve süperoksit radikali yıkıcı faktörlerle etkileşimi sürecindeki düzensizlikten mide de gastrik hasar meydana gelmektedir².

Gastrik hasar; mide ve duodenumda mukus, bikarbonat, prostaglandin sentezi gibi mukozal koruma mekanizmaları ile mukozaya zarar verebilen asit-pepsin arasındaki dengenin bozulması ve *Helicobacter pylori* ile de ortaya çıkabilen bir hastalıktır. Gastrointestinal (GI) ülserasyonda enflamatuvar cevap genellikle yıkıcıdır. Çalışmalar parental lökotrien uygulamasının gastrik vazokonstriksiyon, vasküler permeabilitede artış, gastrik mukozada yıkım, asit ve pepsin sekresyonunda artış meydana getirdiğini göstermiştir. Gastrik hasarın midedeki savunma ve yıkıcı faktörlerin etkileşim sürecindeki düzensizlikten ileri geldiği iyi bilinmektedir. Bu düzensizliğe sebep olan etmenler stres, alkol ve sigara tüketimi, steroid olmayan antienflamatuvar ilaçların (NSAID) yan etkileri vb. şeklinde sıralanabilir. NSAID indüklemeli GI mukozal hasarın temel olarak sitoprotektif prostaglandinlerin eksikliğine bağlanır. Bu prostaglandinlerin eksikliği mide de asit-pepsin, duodenumda

safra tuzlarının ve etanol'ün mukus ve bikarbonat sekresyonunu engelleyerek tahrip edici etkilerini artırmaktadır. İndometazin'in siklooksijenaz (COX) enzim sistemini bloke ederek antieflamatuar aktivite gösterdiği düşünülmektedir. İndometazin gibi antieflamatuar ilaçların COX enzim sistemini bloke etmesi ise prostaglandin biyosentezinin baskılanması ve gastrik mukozal bariyerin bozulmasına bağlı olarak gastrik hasar ile sonuçlanır³⁻⁷.

İndometazin-indüklemeli gastrik hasar oluşumunun serbest radikal oluşumu ile ilişkili olduğu ve bu oluşun serbest radikallerin prostaglandin biyosentezini baskılayarak gastrointestinal hasara karşı bir savunma faktörü olan mukus ve bikarbonat sekresyonunu engellediği belirlenmiştir^{8,9}.

İndometazin-indüklemeli mide gastrik hasar oluşum mekanizması ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır. Bunlar arasında prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışında bir azalmanın olması topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi sayılabilir¹⁰⁻¹⁴.

İndometazin gibi NSAID'lar tarafından uyarılan akut gastrik deneysel lezyonlarda oksijenden türevli ROS'un önemli rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur¹⁵⁻²⁰. Oksijen radikallerinin stres, etanol yada NSAID'larla oluşturulan akut deneysel gastrik lezyonların patogenezindeki rolü de çok iyi bilinmektedir^{15,21-23}. Bunun yanı sıra, insanlarda kronik ülserlerin %75-85'i *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna bağlı olup, bu bakteri polimorfik nükleer lökositlerin oksidatif baskısına yol açar. Bunun sonucunda önemli miktarda oksijen metabolitleri üretilir ve bu metabolitler ise dokuyu dejenere ederek ülsera sebep olur^{6,7}. Diğer birçok doku hasarı gibi gastrik hasarlar da süperoksit anyonlarının oluşumuyla yönlendirilir.

Gastrik mukozadaki hasarın giderilmesinde antioksidan enzimlerin koruyucu fonksiyonlarına ve karşılıklı olarak birbirlerini etkilemelerine dikkat çekilmiştir^{22,24-36}.

Hücreler ROS'un zararlı etkilerini önleyebilecek veya oluşan zararlı etkileri tamir edebilecek birçok mekanizmaya sahiptir. ROS'un tahribatları, primer olarak enzimler [SOD, CAT, MPx, GST, GR ve GPx] ve sekonder olarak da antioksidan vitaminler, glutatyon (GSH) ve birçok makro ve mikro moleküller tarafından azaltılarak serbest radikallerin hücrelerde düşük ve belirli konsantrasyonlarda tutulmaları sağlanır^{37,38}. Şayet süperoksit (O_2^-), hidroksil ($HO\cdot$) ve hidrojen peroksit ($HOOH$) gibi ROS üyeleri 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^{15-17,20,25,30,35}. Serbest radikalleri etkisizleştiren sekonder moleküllerden GSH ise, gastrointestinal doku lipidlerini oksidatif hasardan korumada önemli görev üstlenmiştir^{17,20,31-41}.

Bu gün bilinen pek çok etken madde ve bitki ekstraktları'nın indometazin ile uyarılan gastrik hasar üzerine pozitif etkileri gösterilmiştir⁴²⁻⁴⁵.

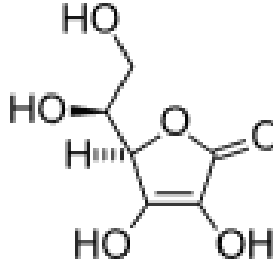
Askorbik asitin antiülserojen etkilerinin incelendiği çok az sayıda araştırmaya rastlanmıştır^{46,47}. Antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında bu çalışma gastrik hasarların önlenmesinde oksidatif süreç üzerinde askorbik asitin etkili olup olmadığının tespit edilmesi açısından önemli bir eksikliği tamamlayacaktır.

Bu araştırma; askorbik asitin antiülserojen etkisinin belirlenmesi ve bu etkinin oksidatif süreçten nasıl etkilendiğinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Askorbik Asit (vitamin C)

Askorbik asit doğal olarak beyaz kristaller şeklinde D-xylo-askorbat ve L-xylo-askorbat formunda bulunmaktadır. L-xylo-askorbat hafif alkali durumda, sıcaklıkta ve bakır iyonlarına maruz kalınması halinde okside olarak L-dehidroaskorbik asit'e dönüşür. Bu reaksiyon geri dönüşümlü bir reaksiyondur. Ancak L-dehidroaskorbik asit'tin oksidasyona uğraması sonucu oksalat ve 2,3-diketo-L-gulonik asite dönüşüm reaksiyonu geri dönüşümsüz reaksiyondur. Hem L-askorbik asit hemde L-dehidroaskorbik asit fizyolojik olarak askorbik asitin aktif formlarıdır⁴⁸.

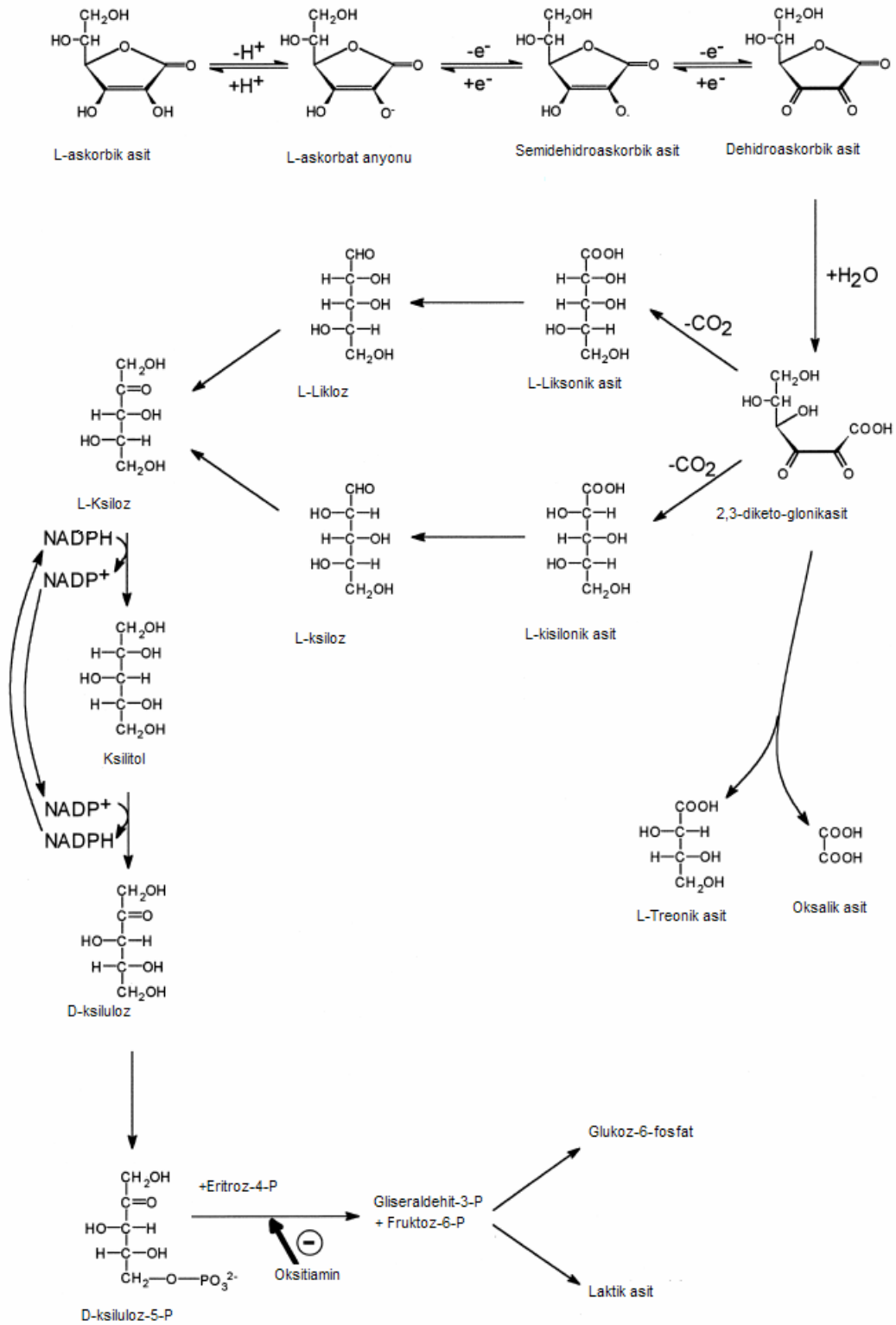


Şekil 1. L- Askorbik asit'in molekül yapısı

L-askorbik asitin molekül formülü $C_6H_8O_6$ ve molekül ağırlığı 176,12 g/mol olan suda eriyebilen bir vitamindir. Bu vitamin kan damarları, kıkırdak ve kemiğin yapısında bulunan ve aynı zamanda bir protein olan kollajen biyosentezinde rol oynamaktadır. Askorbik asit lizinin hidroksilizine ve prolinin hidroksiproline dönüşümünü katalizleyen hidroksilaz enziminin aktifleşmesi için gereklidir. Bu

enzimin normal seviyenin altında oluşması özellikle skorbit hastalığının bir nedeni olarak görülmektedir. Ayrıca aminoasit metabolizmasında, infeksiyonlara karşı direncin artırılmasında ve demir iyonlarının emiliminde de görev almaktadır ⁴⁹⁻⁵¹.

Askorbik asit birçok hayvan türü tarafından D-galaktoz ya da D- glikozdan elde edilebilir. Çoğu canlıda meydana gelen bu sentez “glukoz yada galaktoz→D-glukuronik asit→glukuronolakton→ gluno-1,4-lakton→ askorbik asit” yolunu izleyerek askorbik asit’i üretmiş olur. Hayvanlarda askorbik asit sentezinin anahtar enzimi L-glukonolakton oksidazdır. Bu enzim sayesinde gluno-1,4-lakton oksidize edilerek askorbik asit meydana getirilmiş olur. L-glukonolakton oksidaz enzimi memelilerin karaciğerinde, sürüngen ve birçok kuş türünde ise böbreklerde bulunmaktadır. L-glukonolakton oksidaz enzimi kobaylarda, bazı meyve yiyen yarasalarda insanlarda ve çoğu primatda ya yoktur yada az miktarda bulunmaktadır. Bu yüzden bu canlıların beslenmesinde askorbik asit kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır ^{52,53}.



Şekil 2. Hayvanlarda askorbat katabolizması.

Askorbik asit ihtiyacı cinsiyet, fizyolojik stres ve yaş vs. durumlara bağılı olarak değışmektedir. Canlılarda meydana gelen askorbik asit ihtiyacının karşılanması için ya askorbik asit preparatları alınmalı ya da askorbik asit yönünden zengin olan bitkiler tüketilmelidir. Patates, pancar ve yeşil bitkiler askorbik asit yönünden oldukça zengindir. Bu doğal kaynakları tüketen hayvanlar askorbik asit ihtiyacını yeterli düzeyde karşılamaktadır⁵⁴.

İnsan sütü ve kolostrumunda sırasıyla %4 ve %7 oranında askorbik asit içermektedir. İşlenmemiş koyun sütü inek sütüne göre daha fazla askorbik asit içermektedir. Ancak inek ve koyun sütündeki askorbik asit miktarı süt işleme tekniğine ve saklama koşulları gibi birçok faktöre bağılı olarak değışmektedir⁵⁵. Askorbik asit'in hayvanlarda homeostatik dengenin korunmasında veya dengenin yeniden kurulmasında, çevresel stres şartlarına adaptasyonda faydalı olabileceğı düşünölmektedir⁵⁶.

Askorbik asit canlılar için fizyolojik bir ihtiyaçtır. Dokularda büyüme ve yara iyileşmesi için gereklidir. Tirozin, folik asit, triptofan metabolizmasına yardımcı olduğı bilinmektedir. Ayrıca sinir sistemini düzenler, katekolaminler ve karnitin gibi aminoasitlerin sentezine katkıda bulunduğı, kandaki kolesterol seviyesinin düşürölmesine yardımcı olduğı ve barsaklarda demir emilimini artırdığı bilinmektedir^{51,57}.

Kimyasal yapı bakımından monasakkaritlere benzeyen 6 karbonlu askorbik asit enediol yapısında lakton şeklinde bir asittir. İkinci ve üçüncü karbonlarının meydana getirdiğı enediol yapısı vücutta dehidro şekline kolayca dönüşebildiğı için indirgendir. Askorbik asit bir hidrojen atomunu verdiği zaman oldukça durgun olan askorobil radikaline dönüştüğü için oldukça güçlü bir antioksidan olarak bilinmektedir. Askorbik

asit'in nitrojen oksit türleri, singlet oksijen, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve süperoksit radikaline karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür⁴¹.

2.1.1. Askorbik asitin emilimi

Askorbik asitin yaklaşık %80-90'ı gastrointestinal sistemden emilmektedir. İnsanlar ve kobaylarda Askorbik asit'in emilimi ince barsaklar ve midede bulunan buccal mukaza tarafından yapılmaktadır. Askorbik asit'in buccal mukoza boyunca buccal çukurluklardan emilimi pasif difüzyon ile gerçekleşmektedir. Gastrointestinal emilimin etkili bir şekilde yapılması taşıyıcı çukurluklarda sodyuma bağlı aktif transport mekanizması ve enerji gereksiniminin giderilmesi ile yapılmaktadır^{58,59}. Askorbik asit'in barsaklardan aktif transport ile etkili bir şekilde geçişinin olduğunu böbreklerden ise re-absorpsiyonunun yapıldığını ortaya koymuştur. Böbrek ve barsaklardaki emilim mekanizması düşük miktarlarda Askorbik asit alınmasının yüksek miktarda Askorbik asit alınmasından daha faydalı olacağını öne çıkarmıştır⁵¹.

Absorbe edilen askorbik asit lökositler, kırmızı kan hücreleri ve plazma ile bütün dokulara taşınarak canlı vücudundaki askorbik asit'in sirkülasyonunu sağlamaktadır. Ateş, viral hastalıklar, antibiyotikler, ağrı kesici ilaçlar, karbon monoksit ve ağır metallerle karşı korunmasız kalınması durumunda askorbik asit'in emilimi azalmakta ve buna bağlı olarak değerlendirilebilirliği düşmektedir⁶⁰.

2.1.2. Askorbik asitin immün sistem ve hastalıklar üzerine etkisi

İmmün sistem oksidatif hasara karşı oldukça hassastır. Canlılarda birçok immün sistem hücresi tarafından oluşturulan radikaller, vücuda dışardan alınan askorbik asit , α - tokoferol, beta-karoten ve canlı vücudunda bulunan antioksidan enzimler ile

dengelenerek optimum koruma sağlanır. Askorbik asit özellikle fagositler tarafından oluşturulan radikallerin plazma membranlarına ve plazma lipidlerine zarar vermesini engeller. Ayrıca askorbik asit'in hücre içi siklik nükleotit seviyelerini ayarlama, prostaglandin sentezinin düzenlenmesinde ve sitokin üretiminin artırılması gibi metabolik faaliyetlerde etkisinin olduğu düşünülmektedir⁶¹.

İmmün sistem hücrelerinde yüksek miktarda askorbik asit bulunması bu vitaminin immün sistem için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada stres'e maruz bırakılan oğlaklarda askorbik asit'in immünite üzerine olumlu etkileri gözlenmiştir⁶². Askorbik asit'in düzenli olarak alınması ya da vücut tarafından sentezlenmesi immün sistemin düzenli olarak çalışabilmesi için oldukça önemlidir. Ancak bazı çevresel stres yapıcı ajanlar ve hastalıkların etkisi ile canlılarda askorbik asit'in sentez metabolizmasında da bozukluklar meydana gelebilir. Örneğin günlük civcivlerde ve strese maruz kalan ergin tavuklarda askorbik asit sentezinin yetersiz olduğu belirtilmiştir⁶³. Bu tip durumlarda yemlere ilave edilen askorbik asit'in canlı metabolizmasının düzenlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Kanatlı yemlerine katılan askorbik asit'in kanatlılarda meydana gelen birçok viral hastalığa karşı immün sistemi güçlendirdiği ve hastalıklara karşı direnci artırdığı gösterilmiştir⁶⁴.

Askorbik asit antioksidan özelliği vasıtasıyla lökosit membranlarının yapısal bozulmalarını önler ve nötrofillerin, granulositlerin optimum fonksiyonlarını gerçekleştirmelerine yardımcı olur. Ayrıca askorbik asit glukokortikoidlerin sentezini azaltarak kanatlıların sıcak stresinden olumsuz etkilenmesini de engellemektedir⁶⁵.

Askorbik asit'in çeşitli hastalıkların önlenmesindeki fonksiyonlarını şu şekilde sıralayabiliriz⁵⁴.

- 1- Patojenlerin yok edilmesinde direkt etkilidir. Askorbik asit özellikle metal iyonlarının varlığında virüs ve bakterilerin DNA ve RNA yapısını bozarak virusidal ve bakterisidal aktivite gösterir.
- 2- Askorbik asit hücrelerde bulunan interferonların miktarını artırarak hücrelerin virüsler tarafından enfekte olmasını yada enfekte olan hücrelerin savunmasını artırarak hastalık oluşumunu engeller.
- 3- Askorbik asit nötrofillerin fonksiyonunu artırarak savunma sistemine yardımcı olur⁵⁴.

2.1.3. Askorbik asit yetersizliği

Askorbik asit eksikliğine bağlı olarak en yaygın görülen rahatsızlıklar anemi, skorbit hastalığı, enfeksiyonlar, diş etlerinde kanamalar, arterosklerotik plak oluşumu, kaslarda dejenerasyonlar, yara iyileşmelerinde gecikmeler ve nörolojik bozukluklardır. Askorbik asit sentezleyemeyen canlılarda yeterli askorbik asit alınamadığı zaman immün sistemlerinde zayıflama meydana gelmektedir. Güçlü immüniteye sahip olmak için gerekli miktarlarda askorbik asit almak gerekmektedir. Askorbik asit grip, soğuk algınlığı, HIV, hepatit gibi farklı enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde de faydalı olduğu görülmüştür⁶⁶.

2.2. Ülser

Hayvanlarda yapılan araştırmalar 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, karbonhidrat 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 süten kesimin gastrik hasar oluşmasını etkilediği aynı zamanda beslenmenin, parazitik faktörlerin, savunma ve saldırgan (ROS) faktörlerdeki değişikliklerin gastrik hasar oluşumu ile paralellik gösterdiği görülmektedir⁶⁷⁻⁶⁹.

Gastrik hasar mukozal epitelin asit ve pepsine karşı korunmasız kaldığı yerlerde yani gastrik mukozada ortaya çıkan lezyondur. Canlılarda meydana gelen gastrik hasar mide yada duodenum bölgesinde kanama, besin geçişinin engellenmesi ve ağrı gibi birçok semptom görülebilmektedir⁷⁰. Stress, sigara, beslenme eksikliği ve NSAID ilaç kullanımı ROS'un oluşumunu arttırarak gastrik hasar gelişimine neden olmaktadır⁷¹. NSAID'ların gastrik hasar oluşturmadaki temel mekanizmaların başında ROS miktarını artırması ve prostaglandin miktarını düşürmesi gelmektedir. Bu ROS miktarındaki artış ve buna paralel olarak prostaglandinlerin eksikliği midede gastrik asitlerin, safra tuzlarının ve etanol'ün tahrip edici etkilerini arttırmaktadır. ROS'nin gastrik ve duodenal mukozaya verdiği tahrip edici ülseratif etkileri (kanamalarda dahil olmak üzere), hayvanlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede araştırılmıştır^{6,72,73}.

İndometazin gibi NSAID'lar kullanılarak oluşturulan deneysel akut gastrik lezyonlarda oksijenden türevli ROS ve LPO'nun önemli rollerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca bu çalışmalarda lipit peroksit ve hidrojen peroksitin gastrik mukozal hücelerde birikiminin hızlanmasına rağmen glutatyon peroxidaz aktivitesinin azaldığı görülmektedir. Hidroksil, süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit, peroksinitrit gibi radikallerin çeşitli reaksiyonlarla dokularda oluşturduğu hasarlar gibi

gastrik hasar oluşmunda da birçok reaksiyonu yönlendirdikleri görülmektedir. Bu yüzden gastrik mukozadaki ülser formasyonunun giderilmesinde antioksidan enzimlerin koruyucu fonksiyonlarının olduğu düşünülmüştür^{29,74,75}.

Hücreler ROS'un zararlı etkilerini önleyebilecek veya oluşan zararlı etkileri tamir edebilecek birçok mekanizmaya sahiptir. ROS'un tahribatları, primer olarak enzimler [SOD, CAT, MPx, GST, GR ve GPx] ve sekonder olarak da antioksidan vitaminler, glutatyon (GSH) ve birçok makro ve mikro moleküller tarafından azaltılarak serbest radikallerin hücrelerde düşük ve belirli konsantrasyonlarda tutulmaları sağlanır^{36,37}.

2.2.1. İndometazinle oluşturulan ülserler:

NSAID siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek prostaglandin sentezini inhibe ederler. İndometazin de diğer nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar gibi COX enzimini inhibe eder⁷⁶. 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 farklıdır⁷⁶⁻⁷⁹. 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 indüklenebilir⁸⁰. NSAID'lerin gastrik yan etkilerinden COX-1 inhibisyonu, anti-inflamatuar etkilerinden ise daha çok COX-2 inhibisyonu sorumludur⁸¹. 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 NSAID'lardan meloksikam,

tenoksikam ve nabumeton halen tıbbi kullanımı yaygın olan ilaçlardır^{76,82}. Gastrik bikarbonat ve mukus sekresyonunun azalması indometazinin hasarlayıcı etkisine yardım eder⁸³.

Eğer vasküler hasar varsa, süperfisyal mukozal kapiller kan akımı yavaşlar ve dolaşımdan plazma sızar. Bu durum mukozal kan damarlarında dolaşımın tamamen durması sonucu konjesyonu hızlandırır. Nekrotik yüzey epitelinin dökülmesi ile oluşan erozyon hipoksik ortamda genişler ve böylece hemorajik derin erozyon ve ülser meydana gelir. Şayet vasküler hasar minimal derecede ise veya yoksa kan akımı devam eder ve süperfisyal mukozal hücre hasarına rağmen gastrik pit'deki proliferatif zon çabucak hasarı karşılar ve hücre proliferasyonu gelişir. Eğer vasküler hasar yoksa veya az ise süperfisyal epitelin %95'i etanolle yıkıldığı halde hasardan 15–60 dakika sonra derindeki kübik hücreler yüzeyi kaplar. Vasküler hasar ve derin hemorajik erozyon veya ülserlerin yokluğunda, gastrik mukozanın epitelyal yenilenmesi son derece hızlı ve yeterlidir. Başka bir deyişle eğer vasküler hasarı farmakolojik olarak dikkate alırsak, gastrik mukozal epitel doğal ve yeterli tamir kapasitesinden dolayı kendi kendine iyileşir^{82,84}.

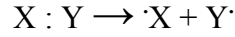
2.3. Antioksidanlar

2.3.1. Serbest radikaller:

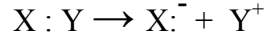
Serbest radikaller orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Elektronlar atomlar içerisinde orbital olarak bilinen bölgelerde en fazla iki tane olacak şekilde ve birbirlerine zıt konumda bulunmaktadır. Demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezken bazı atom kombinasyonları (nitrit dioksit, nitrik

oksit) bir orbitalinde tek elektron bulunduran dağılımları nedeni ile radikal özellik gösterirler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dizilişlerinin yanında termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilmelidir. Serbest radikaller üç yolla meydana gelir⁸⁵.

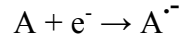
1. Hemolitik bağ ayrılması ve bir elektronun bir molekülden diğerine transfer edilmesi sonucu oluşan serbest radikallerdir. En yaygın görülen serbest radikal oluşumu hemolitik bağ ayrılmasıdır.



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



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

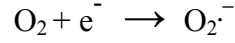


Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlamaktadır.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

aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin en fazla olduğu canlı grubudur. Bu yüzden aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin etkilerine daha fazla maruz kalırlar⁸⁶.

2.3.1.1. 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 binmektedir⁸⁶.

Süperoksit radikali nadir olarak oksidatif hasara neden olurlar. Çünkü SOD 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 uğrar. Süperoksit radikallerinin asıl zararları hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır⁸⁷.

İki süperoksit radikalının bir araya gelmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



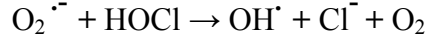
Süperoksit radikali ve peroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.



Süperoksit radikalinin nitrik oksit radikali ile birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlamaları sonucu peroksinitrit meydana gelir⁸⁸.

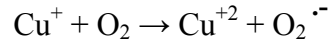
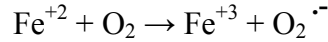


Hipoklorik asit (HOCl) oksijen metabolitleri ile reaksiyona girme özelliğine sahip olması nedeniyle ilgi uyandırmıştır. Hidroklorik asitin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda oldukça güçlü oksidan olan hidroksil (OH[•]) radikalının oluştuğu görülmüştür⁸⁹.



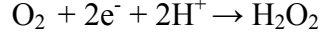
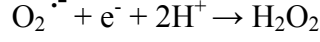
Süperoksit anyonu hem indirgeyici hem yükseltgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitler nitrobluetetrazolium ve sitokrom c'yi indirger. Redüktan olarak görev yaptığında ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksit indirgenir⁹⁰.

Diğer taraftan geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir.

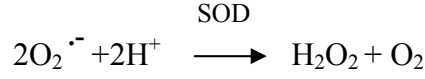


Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olup serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir⁹¹.

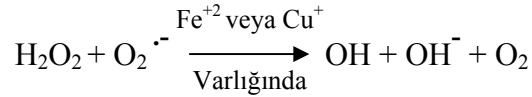
Hidrojen peroksit (H₂O₂): Asidik ortamda moleküler oksijenin ortamdaki iki elektron alması veya süperoksit'in bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir⁹².



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

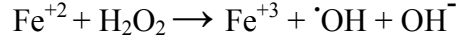
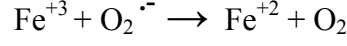


Hidrojen peroksit kendi başına çok zayıf oksidant özelliği gösterir. Çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir. Hidrojen peroksit gerektiğinde hücreler tarafından selenyum içeren glutation peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılabilir. H_2O_2 serbest bir radikal olmadığı halde, ROS 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 yıkılabilir⁹².

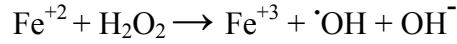
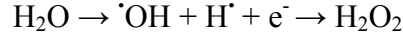


Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz olarak meydana gelebilir. Ancak katalizör olmadığı zaman çok yavaş ilerler. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demir'e (Fe^{+2}) indirgenir. Daha sonra bu ferro demir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

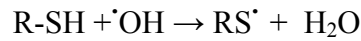
hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir^{93,94} reaksiyonun mekanizması aşağıdaki şekildedir.



Hidroksil radkali ($\cdot\text{OH}$): Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında yani fenton reaksiyonu sonucu ve suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılması ile oluşan son derec reaktif oksidan radikaldır. Hidroksil radikali özellikle biyolojik moleküller üzerine saldıran ve oluştuğu yerde büyük hasarlara neden olan oldukça hareketli bir oksidandır⁹⁵.



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



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

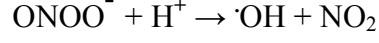
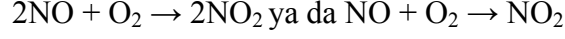
Bekli de OH^- en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu stimüle etmesidir. Bu durum hidroksil radikallerinin membrana yakın bir yerde üretilmesi ve

membran fosfolipid zincirinin yağ asidi tabakasına atak tapması ile meydana gelir. Ayrıca hidroksil radikalının araşidronik asit gibi doymamış yağ asitlerine olan ilgisinin de fazla olduğu ileri sürülmektedir.

Singlet Oksijen (1O_2): Singlet oksijen eşleşmemiş elektron yada elektronlara sahip olmadıdan 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 içerdği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer ROS ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen özellikle fotokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir^{96,97}.

Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO₂): Nitrik oksit ve nitrojen dioksit eşleşmemiş elektronları ile birer radikaldirler. Nitrojen dioksit, nitrik oksitin oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir. NO₂ oldukça zehirli ve çok güçlü bir oksidandır. Oksijen redüksiyonu sırasında NO₂'ye maruz kalması durumunda araşidronik asit metabolizmasının NO₂ konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Düşük miktarda NO₂'nin araşidronik asit metabolizmasını büyük oranda artırdığı gözlenmiştir^{92,98,99}.

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 hasar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir^{92,99,100}.



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 oluşturabilirler.

2.3.2. 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 radikal kaynakları olmak üzere ikiye ayrılır.

Eksojen radikal kaynakları:

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

- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksit, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotikler.
- Stres: Stresin katekolamin düzeyi artırması ve katekolaminlerin oksidasyonu ile serbest radikal oluşumu gözlenir^{90,102,103}.

Endojen radikal kaynakları:

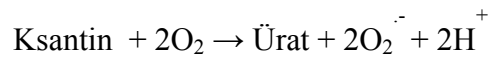
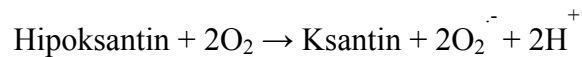
a. Küçük moleküllerin otooksidasyonu:

Normal ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiyopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon reaksiyonları ile serbest radikalleri oluşturur^{104,105}.

b. Enzimler ve proteinler:

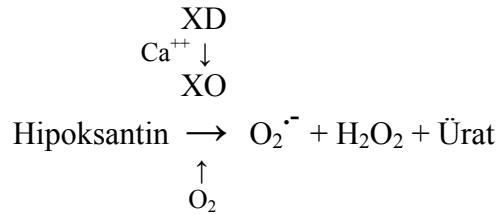
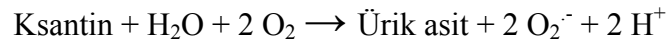
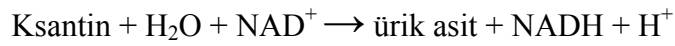
Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, serbest radikal oluşumuna neden olurlar^{90,106}.

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^{107,108}.



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^{109,110}.

Normalde NAD bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal oluşumuna neden olmaz. Ancak ilk iskemi atağından sonra hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası oluşturma eğilimine girer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması proteazların miktarı artsa bile devam eder. Bu sırada hücre ksantin dehidrogenazın (XD) ksantin oksidaz (XO)'a dönüşümüne izin verir. Bu oluşan hücre içi olayların sonunda XD enzimi dehidrojenaz formundan oksidaz formuna dönüşür ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalinin üretimine neden olur. Oluşan süperoksit radikalleri hızlı bir şekilde hidrojen peroksit dönüşür. Hidrojen peroksit güçlü bir radikal olmasa da, Fe^{+2} varlığında fenton reaksiyonu oluşturarak güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur^{85,111}.



Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğunu da aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler¹¹².

c. Mitokondriyal elektron taşınması:

Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynaklarından biri elektron taşıma sisteminden (ETS) sızan elektronlardır. Mitokondriyal ETS'den elektron iki yerde sızmaktadır. Birincisi, nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat (NADH)-dehidrogenaz basamağında, iki olarak koenzim Q ya da ubikinon basamağında elektron sızması görülmektedir. ETS'nin son basamağında elektronların O_2 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi, oksijenin %97-99'unu harcayarak suya indirger. Ancak O_2 'nin %1-3'ü, elektron transport zincirinden sızan elektronlarla bir araya gelerek süperoksit radikalının üretimini artırır. Böylece NAD^+ bağlı substratlar, süksinat, adenosin di fosfat (ADP) ve oksijen gibi endojen faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretime etki eder^{101,113}.

d. 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.

e. 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 bilinmemektedir⁹⁰.

f. 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^{114,115}.

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 görülmektedir¹¹⁶.

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 PG'leri, tromboksanları, lökotrienleri ve anafleksinin slow-reakting substratını içerir. Son zamanlarda araşidonat metabolizmasında yer alan bu enzimatik proseslerin otokatalitik LPO'nun öncülük etmesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır.

Serbest radikal üretimini bazı toksik maddeler artırabilir. Bu maddeler dört gruba ayrılır^{90,117}.

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 antioksidan aktiviteyi düşürebilir. Parasetamol karaciğerde sitokrom P-450 tarafından GSH ile reaksiyona girip miktarını azaltan bir ürün oluşturur.

2.3.3. Serbest radikallerin etkileri:

Serbest radikaller etkilerini özellikle canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip olan DNA, yağlar ve proteinler 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^{118,119}.

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 $\cdot\text{OH}$ radikalının membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür^{90,120,121}.

Lipid peroksidasyonu başlatan ilk hareket membran yada 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 $\text{H}^\cdot$ parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam ederek zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur^{92,103}.

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 MDA ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. 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^{117,122-124}.

LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder⁹².

LPO sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar kısaca¹²⁵;

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

Proteinler üzerine etkileri: Proteinler, lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Proteinlerin radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin (PCO) ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinlerde fragmentasyon, 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^{90,126}.

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 spesifiklerdir. Bazı oksidatif protein modifikasyonları ise geniş çaplı özellik taşıyor ve çok sayıda amino asitte değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir. Spesifik modifikasyonlara tirozin'in 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^{127,128}.

DNA üzerine etkileri: İyonize edici radyasyondan kaynaklanan hücre ölümünün başlıca nedeni olarak nükleik asitlerin ROS 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^{129,130}.

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazılarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer ve DNA hasarına neden olurlar. 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^{131,132}.

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. ROS, DNA'nın oksidative hasarı sonucu karsinogenesis ve çeşitli hastalıklar görülebilir^{130,133-135}.

2.3.4. Antioksidan savunma sistemleri

Canlılar serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranının da etki gösteren birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engelleyerek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. İşte canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme 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.

2.3.4.1. Endojen (Doğal) antioksidanlar:

2.3.4.1.1. Primer antioksidanlar (Enzimler):

SOD Enzimi: Bu 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 katalizleyebilirler¹³⁶⁻¹³⁸.



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 düşünülmektedir¹³⁹.

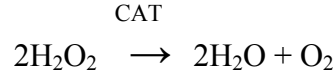
Cu-Zn SOD; ilk kez 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Cu-Zn SOD, hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32000 Dalton'dur. Birbirinin aynı olan iki alt üniteden meydana gelir. Her alt ünite bir Cu atomu ve bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetilenmiş terminal amino grubu bulunduğu tesbit edilmiştir^{104,139}.

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 yoktur¹⁴⁰.

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) bulundurur¹⁴¹.

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 önlenmektedir¹⁴².

CAT Enzimi: 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^{143,144}.

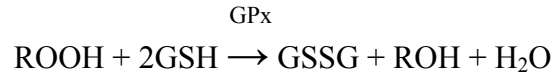
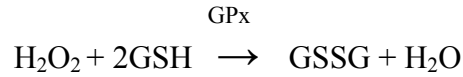


Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda lokalizedir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır^{90,145,146}.

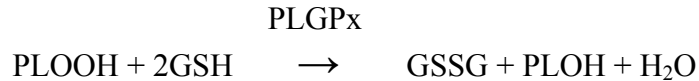
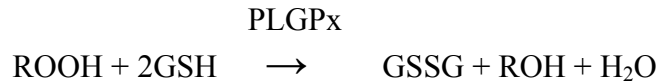
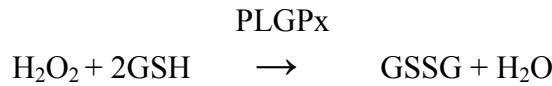
GPx Enzimi: Bu iminin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir^{90,147,148}.

Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. GPx, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur^{149,150}.

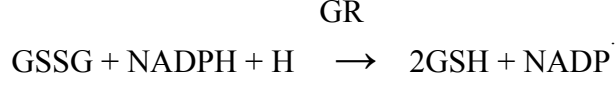
GPx, aşağıdaki reaksiyonları katalizler^{147,151}.



Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPx) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGPx membranın peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar^{152,153}.



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

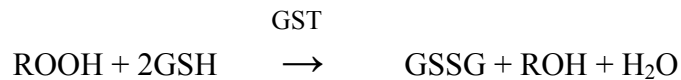


GPx'ın, hücredeki dağılımı, GR'a bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur¹⁵³.

GST Enzimi: “Selenyuma bağlı olmayan GPx” olarak adlandırılır. GST'ler, sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere glutatyonu aktaran proteinlerdir. *E.coli*'den insana kadar çok çeşitli türlerden GST saflaştırılabilirken en çok da rat karaciğerinden saflaştırılmıştır¹⁵⁴.

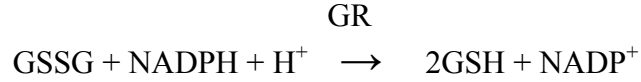
GST'ler başta araşidonik ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere LPO'lara karşı Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi koruyucu mekanizma oluştururlar¹⁵⁵.

GST'ler antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahip GST'lerin tüm canlı hücrelerde bulunması hayati önemlerinin bir göstergesidir. Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak, yabancı maddeleri glutatyonda ki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir ve daha ileri bir ürüne metabolize olabilirler. GSH'den glutamat ve glisin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür¹⁵⁵.



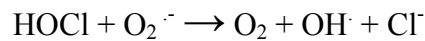
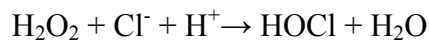
GR Enzimi: GR 50.000 daltonluk alt birimlere sahip bir dimerdir. Görevi yükseltgenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirmektir. Bu indirgenme

işlemi sırasında NADPH'dan gelen elektronlar okside glutatyonun disülfid bağına direkt olarak transfer edilemezler. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan flavin 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 gerekir¹⁵⁶.



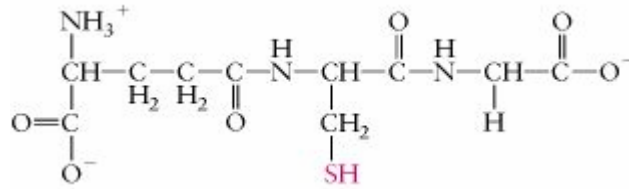
Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu ise, GR'nin GSSG'yi GSH'ye çevrimi için gereken NADPH'ı sağlar¹⁵⁷.

MPx Enzimi: Nötrofil granüllerde bol mitarda bulunan MPx enzimi H₂O₂'den hipoklorik asit (HOCl) oluşturmak üzere etki eder. Asidik pH oluşumuna bağlı olarak MPx aktivitesi artmakta ve membranı kolayca geçen H₂O₂ bakteriye toksik etki yapmakta ya da hidroksil (OH⁻) radikaline dönüşmektedir. Bu tepkimede HOCl yer almaktadır. H₂O₂ ile MPx Cl⁻ iyonlarını kullanarak H₂O₂'yi HOCl'ye dönüştürmektedir. Çok reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir^{41,157}.

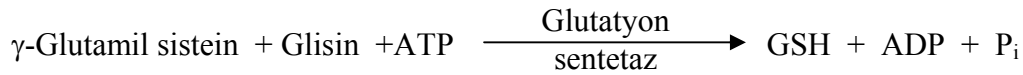
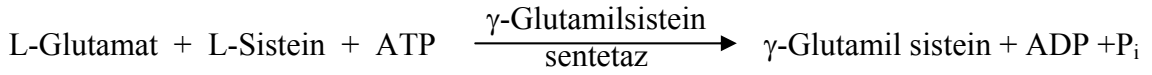


2.3.4.1.2. Sekonder antioksidanlar:

Glutasyon (GSH): GSH, birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir. GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır¹⁵⁸.



Şekil 3. Glutasyon'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 glutasyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde H₂O₂ ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki sergiler ve H₂O₂'yi alyuvarlardan uzaklaştırır. H₂O₂ 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 oluşur¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH 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 GPx'e substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'ye indirgenerek GSH miktarı düzenlenir¹⁶⁰.

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. Örneğin GPx ve CAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden askorbik asit, α -tokoferol ve B-karoten gibi diyetle alınan antioksidanlarla ilgilidir¹⁶¹.

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. Glutatyon hücrede bir ko-enzimden ziyade var olan amino asit öncüllerinden kolayca sentezlenen doğal bir antioksidandır. Fenilalanin ve tirozinin oksidatif yıkımında görev alan maleilasetoasetat izomeraz da dahil olmak üzere glutatyon çok az sayıda enzim için spesifik bir koenzimdir. Glutatyonun hücre içi derişimi kontrol edilerek birçok enzimin aktivitesi düzenlenebilir¹⁶¹.

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 nötürleştirerek korurlar. Bunlar uyum içerisinde çalışan bir takım gibi radikalik saldırılara karşı koyarlar. β -Karotenin, askorbik asitin ve tokoferolün antioksidan etkileri yıllardan beri bilinmektedir. β -Karoten organizmada A vitaminin parsiyal oksijen öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidan olarak görev yapar. Bununla beraber, 15 torr'da 150 torr'dan daha iyi antioksidan olduğu, 760 torr'da ise prooksidan olarak davrandığı bildirilmiştir. Hücrelerin dışında β -Karoten nöbet tutarken; hücre duvarından, içeri girmek isteyen saldırganlara karşı savunmayı ise eser elementlerden selenyumun da yardımıyla E vitaminini üstlenmiştir¹⁶².

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^{163,164}.

2.3.4.2. Ekzojen antioksidanlar:

1. *Ksantin oksidaz inhibitörleri*: Tungsten, allopürinol, oksipürnol, folik asit ve pterin aldehit
2. *Soya fasulyesi inhibitörleri*: Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.
3. *NADPH oksidaz inhibitörleri*: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, cetiedil ve difenilin iyodoniyum
4. *Recombinant süperoksit dismutaz*
5. *Trolaks-c*: E vitamini analogu
6. *Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler*: GPx aktivitesini artırır. Bunlar; Ebselen ve asetil sisteindir.
7. *Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları*: Mannitol ve albümin
8. *Demir redoks döngüsünün inhibitörleri*: Desferroksamin ve seruloplazmin
9. *Nötrofil adezyon inhibitörleri*
10. *Sitokinler*:
 - *Tümör Nekroz Faktör (TNF)*
 - *Interlökin 1*
11. *Barbitüratlar*
12. *Demir şelatörleri*¹⁶⁵

2.3.4.3. Gıda antioksidanları:

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Etoksigin
- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)

- Propilgalat
- Sodyum benzoat
- Fe-superoksid dismutaz ¹⁶⁵

2.3.5. Antioksidan etki tipleri:

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler^{162,165},

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

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Askorbik Asit’de dahil olmak üzere Sigma Chemicals Company (Germany)’den temin edilmiştir.

3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

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

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. *CAT Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, %1 Triton x-100 içeren Fosfat Tamponu):*

1.7 g KH_2PO_4 ve 2.5 ml Triton x-100 alınarak 200 ml distile suda çözüldü. pH, bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

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

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

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

0.6804 g KH_2PO_4 ve 0.2236 g KCl alınarak 1-2 damla 5 M NaOH ile 90 ml distile suda çözüldü ve pH bir pH metre kullanılarak 7.8'ye ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4. *GPx Ölçüm Karışımı:*

A - 50 mM Fosfat tamponu: 0.6804 g KH_2PO_4 alındı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

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

C – 1 mM GSH: 0.0031 g GSH alındı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra 10 ml'ye distile su ile tamamlandı.

D – 0.2 mM B-NADPH: 0.0016 g alındı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra 10 ml'ye distile su ile tamamlandı.

E – 1 mM NaN_3 : 0.0065 g tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

F – 1 EU/ml Glutatyon Redüktaz: 5.2 µl GR alındı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra 10 ml'ye distile su ile tamamlandı.

5. *GPx enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.25 mM H₂O₂):*

25.53 µl H₂O₂ alındı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

6. *SOD Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu):*

1.7 g KH₂PO₄ ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml distile suda çözüldü ve pH bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

7. *SOD Ölçüm Karışımı:*

A - 0.3 mM Ksantin: 0.0018 g Ksantin alınarak bir miktar distile suda çözüldü.

Hacmi distile su ile 40 ml'ye tamamlandı.

B - 0.6 mM EDTA: 0.0035 g EDTA alındı ve bir miktar distile suda çözüldü.

Hacmi distile su 20 ml'ye tamamlandı.(2 damla 5 M NaOH ile çözünür)

C – 150 µM NBT (Nitro blue tetrazolium) : 0.0024 g NBT alınarak bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile su ile 20 ml 'ye tamamlandı.

D – 0.4 M Na₂CO₃: 0.5088 g alınarak bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile su ile 12 ml'ye tamamlandı.

E – 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartıldı bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile 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 (NH₄)₂SO₄ çözeltisi eklendi.

9. *SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (2 M (NH₄)₂SO₄):*

0.7928 g (NH₄)₂SO₄ alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile 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 CuCl₂):* 0.0108 g

CuCl₂ alındı, bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

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

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

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

6.05 g Tris-HCl ve 0.0146 g EDTA alınarak 200 ml distile suda çözüldü ve pH, bir pH metre kullanılarak 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

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

0.03963 g DTNB alındı ve bir miktar metanolde çözülerek hacmi 10 ml'ye metanol ile tamamlandı.

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

10 g KCl alınarak bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

15. *LPO Ölçüm karışımı:*

A - % 8 Sodyum lauril sülfat (SLS): 0.8 gr SLS alınıp bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

B - % 0.08 Tiyobarbütirik (TBA): 0.48 gr TBA alınarak 1-2 damla 1 M NaOH ilavesi ile bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile su ile 60 ml'ye tamamlandı.

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

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

1.7 g KH_2PO_4 alınarak 200 ml distile suda çözülür pH bir pH metre kullanılarak 7.8 yapıldı. Son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

17. *GR ölçüm karışımı: sırayla 3 ml'de*

A- 0,2 M Fosfat Tamponu (pH 7, 2 mM EDTA içeren): 0.02922 gr EDTA, 1.3609 KH_2PO_4 alınır, 45 ml distile suda çözülür pH bir pH metre kullanılarak 7'ye ayarlanır son hacim 50 ml'ye tamamlanır.

B- 2 mM NADPH (MA, 833.4), 10mM Tris-HCl pH 7 içinde: 0.06057 gr Tris alınır 45 ml suda çözülür HCl ile pH bir pH metre kullanılarak 7'ye ayarlanır son hacim 50 ml'ye tamamlanır. 0.0083 gr B-NADPH alınır 5 ml'ye tris HCl ile tamamlanır.

C- 20 mM GSSG (MA, 612,6) : 0.06126 gr alınır bir miktar distile suda çözüldü. Hacmi distile su ile 5 ml'ye tamamlandı.

18- *MPx 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 distile suda çözülür pH bir pH metre kullanılarak 6.0 yapılarak son hacim distile su ile 150 ml'ye tamamlandı.

19- MPx 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 H_2O_2 (%30'luk tan) 45 ml için: 83.3 μl % 30'luk H_2O_2 'den alınır 500 ml'ye tamamlandı ve ardından bundan 4,5 ml alındı.

C– 50 mM KH_2PO_4 pH 6: 0.3062 gr KH_2PO_4 alındı.

Bu üç tartım alınır 40 ml distile suda çözülülerek pH bir pH metre kullanılarak 6.0 'a ayarlanıp 45 ml'ye tamamlandı.

20- 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 distile suda çözüldü ve pH bir metre kullanılarak 7.8 'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

21- GST Ölçüm karışımı (0,11 M Fosfat Tamponu):

3.02 g KH_2PO_4 alınarak 75 ml distile suda çözüldü ve pH bir pH metre kullanılarak 6.5'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

A- 30 mM Glutasyon çözeltisi: 0.046 g glutasyon tartıldı ve bir miktar destile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 5 ml'ye ayarlandı.

B- 30 mM CDNB: 0.03 CDNB tartıldıktan sonra bir miktar absolute etanol ile çözümlenerek son hacim saf etanol ile 5 ml'ye tamamlandı.

3.4. Deney Hayvanları

Tez çalışmamızda 180–200g ağırlıkta toplam 54 adet erkek Wistar rat kullanılmıştır. Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve

Araştırma Merkezi Laboratuvarlarından alınıp Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.B.D. denemeler yapılmıştır. Hayvanlar deneye alınmadan önce gruplara ayrılmış ve standart şartlar altında muhafaza edilmiştir.

Araştırmada hayvanlar Tablo 1’de bileşimleri ve besin madde oranları belirtilen yemlerle beslenmişlerdir.

Tablo 1. Yemlerin bileşimleri (%) ve besin madde değerleri.

Yem Ham maddesi	Oranları
Mısır %8.5	36.8
Sert Buğday %12	2.5
Soya Küspesi %42	39.22
Ayçiçeği Tohumu Küspesi %30	1.5
Razmol	5.0
Kepek	4.0
Soya Yağı	3.7
DCP	2.8
Balık unu %65	2.5
Mermer tozu	1.0
Tuz	0.3
Sodyum bicarbonat	0.25
Vitamin ve mineral karması	0.25
L-lysine	0.1
D-L Methionin	0.08
Besin madesi*	oranları
Kuru madde	88.93
Ham protein	23.00
Ham yağ	5.97
Ham selüloz	4.92
Metabolik enerji	2754.38
Kül	7.49
Kalsiyum	1.28
Fosfor	1.04
Sodyum	0.22
Potasyum	1.06

Vitamin ve mineral karması: Vitamin A 7.000.000 IU, vitamin D3 700.000 IU, vitamin E 30.000 mg, mangan 50.000 mg, demir 50.000 mg, çinko 50.000 mg, bakır 10.000 mg, iyot 800 mg, kobalt 150 mg, selenyum 150 mg.

* Hesaplama ile bulunmuştur.

3.5. Ratlarda İndometazin-Ülserinin Oluşturulması ve Askorbik asit'in Verilmesi

İndometazin ile uyarılan gastrik hasarlı doku üzerine askorbik asitin antiülserojen etkisini araştırmak üzere yapılan bu çalışma, Guidobono ve arkadaşları¹⁶⁶'nın yöntemi temel alınarak gerçekleştirildi. Her birinde 6 adet rat kullanılarak oluşturulan 9 adet deney grubu bir gün boyunca aç bırakıldıktan sonra; her bir grupta bulunan ratlara sırasıyla 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda askorbik asit distile su içinde süspansiyon haline getirilerek oral yoldan verildi. Diğer yandan pozitif kontrol gruplarına da distile su içerisinde çözölen ranitidin (50 mg/kg), omeprazol (30 mg/kg), famotidin (20 mg/kg), lansoprazol (30 mg/kg) oral yoldan verildi. Bir gruba ise sadece musluk suyu (kontrol grubu) verilerek deneyler gerçekleştirildi.

Askorbik asit, ranitidin (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM), lansoprazol (LAN) ve musluk suyu yukarıda belirtilen doz ve miktarlarda oral olarak verildikten 5 dakika sonra da indometazin 25 mg/kg yine aynı şekilde oral yola verildi. Yapılan muamelelerden 6 saat sonra yüksek dozda anestezi madde (thiopental sodium 50 mg/kg) kullanılarak hayvanlar sakrifiye edilerek mideleri çıkarıldı. Mideler büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkandı ve makroskopik olarak incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de saklandı. Askorbik asit'in antiülserojen etkileri, makroskopik ve biyokimyasal analizlere dayandırılmak suretiyle belirlendi. Askorbik asit, IND, RAN, OMEP, FAM ve LAN gruplarından elde edilen sonuçlar ve kontrol grubu ile mukayese edildi.

3.5.1. Mide dokusunun makroskopik incelenmesi

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 belirlendi. Ülser alan genişlikleri ise milimetrik kâğıt kullanılarak bir büyüteç yardımıyla tespit edildi.

3.5.2. Mide dokusunun biyokimyasal incelenmesi

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

3.5.2.1. Doku homojenatlarının hazırlanması:

Mide dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildikten sonra 0.5 g tartılarak üzerine 4.5 ml tampon çözeltiler (her parametre için farklı bir tampon sistemi kullanılarak) ilave edildi ve sonra da 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 süpernatantta enzim aktiviteleri tayin edildi^{167,168}.

3.5.2.2. CAT aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: Aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂'nin CAT vasıtasıyla H₂O’ya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbands azalmasının 240 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Harcanan H₂O₂ miktarından CAT aktivitesi aşağıda bahsedilen yöntemle göre hesaplanmıştır.

CAT ölçümü: CAT'ın aktivitesi Aebi (1984) 'nin belirttiği kurallar uygulanarak ölçüldü¹⁶⁹. 0.5 g doku alınarak üzerine 4.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7.8) ilave edilerek homojenize edildi²¹. Oluşan homojenat 18000 g'de 4°C'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar katalaz aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H₂O₂ çözeltisinden 1,5 ml konularak numune çözeltisinden 1,5 ml ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuartz küvet alt üst etme sonrası spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 15 saniye aralıklarla 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 x mm⁻¹) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 240 nm'de, dakikada 1 mmol H₂O₂'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı¹⁶⁹. Formül pratik olarak mmol/min= $A/39,4 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. CAT aktivitesi, dilüsyon faktörleri dikkate alınarak mmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapıldı.

3.5.2.3. GPx aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: Aktivite ölçümü GPx ve GR arasındaki dönüşümlü tepkimelere dayandırılmıştır. GPx ortamdaki GSH ve H₂O₂'yi H₂O'ya dönüştürerek GSSG sentezler. GR ise oluşan GSSG' yi pentoz fosfat yolundan gelen NADPH'ı kullanarak tekrar GSH' ye dönüştürür. Bu esnada harcanan NADPH miktarı 340 nm'de belirlenebilir.

Absorbans azalması ile GPx aktivitesi arasında doğrudan bağlantı kurulması esasına dayanarak ölçüm yapıldı.

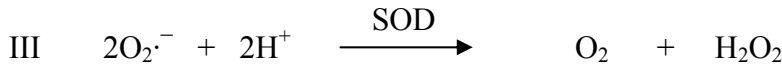
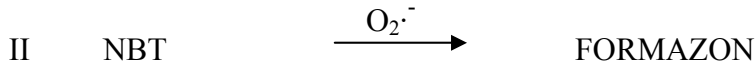
GPx ölçümü: GPx aktivitesi, Lawrence (1976) 'nin belirttiği metot kullanılarak ölçüldü¹³⁶. 0.5 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (30 mM KCl içerir ve pH 7.8) ilave edilerek homojenize edildi¹⁶⁷. Homojenatlar, 18000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar GPx aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2400 µl ölçüm karışımı (son konsantrasyonlar 50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 0.2 mM B-NADPH, 1 mM NaN₃ ve 1 EU/ml GR olacak şekilde) ve 300 µl supernatant konularak birkaç dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra 300 µl 0.25 mM H₂O₂ konulur konulmaz kronometre çalıştırıldı. Alt üst etme sonrası spektrofotometre de 340 nm dalga boyundaki absorbans azalması, 15 saniye aralıklarla 5 dakika süreyle, köre karşı kaydedildi.

GPx aktivitesi'nin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı (ϵ_{NADPH}), 6.22 (mmol⁻¹ x mm⁻¹) alınarak $A = \epsilon.b.c$ formülünden 340 nm'de, dakikada 1 µmol NADPH'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (EÜ) hesaplandı¹⁷⁰. GPx aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol/dakika/mg doku}$ olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapıldı.

3.5.2.4. 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 absorbands 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 absorbands azalacaktır. Absorbandaki 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 yönteme göre ölçüldü¹⁷¹. Mide dokuları homojenize edildikten sonra 18000 g'de 1 saat santrifüj edildi¹⁶⁷. Cam bir spektrofotometre küvetine 2450 µl ölçüm karışımı (0.3 mM ksantin, 0.6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0.4 M Na_2CO_3 , 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 CuCl_2 ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

SOD aktivitesi'nin hesaplanması: Oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik quartz küvetler kullanılarak okundu ve dilüsyon yada sulandırma 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.

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

3.5.2.5. GR aktivitesinin ölçümü:

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

GR ölçümü: GR aktivitesi Carlberg (1985) 'nin yönteminde tarif edildiği şekilde ölçüldü¹⁷². 0.5 g doku alınarak üzerine 5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7.8) ilave edilerek homojenize edildi¹⁶⁷. Oluşan homojenat 20000 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. Kuartz küvet alt üst etme sonrası spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla 5 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedildi.

GR aktivitesi'nin Hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans 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) hesaplandı¹⁷². 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 paralel tekrar halinde yapıldı.

3.5.2.6. MPx aktivitesinin ölçümü:

Ölçüm prensibi: MPx 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 , MPx vasıtasıyla harcanırken oluşan hipoklorit absorbansta bir artışa sebep olur. Ölçüm prensibi, meydana gelen absorbands artışının 460 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Oluşan hipoklorit miktarından MPx aktivitesi hesaplanabilir.

MPx ölçümü: MPx aktivitesi Bradley (1982) 'nin belirttiği yöntem esas alınarak ölçüldü¹⁷³. 0.1 g doku alınarak üzerine 10 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ilave edilerek homojenize edildi¹⁷⁴.

Oluşan homojenat 3500 Rpm 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar MPx 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. Kuartz küvet spektrofotometrede 460 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla ve 5 dakika süreyle ölçülerek absorbands azalması köre karşı kaydedildi.

MPx aktivitesi'nin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbands azalması olan aralıktan dakika başına absorbands azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}$), $0.00394 (\mu\text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1})$ alınarak $A = \epsilon.b.c$

formülünden 460 nm'de, dakikada 1 mmol H_2O_2 'nin harcanmasını sağlayan enzim

miktarı (=EÜ) hesaplandı¹⁷². Formül pratik olarak $\text{mmol/min} = A/39,4 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. MPx aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol/dakika/mg doku}$ olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapıldı.

3.5.2.7. 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 (1981) tarafından belirtilen prosedür doğrultusunda belirlendi¹⁷⁵. Son konsantrasyonları: 0.1 M KH_2PO_4 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 aktivitesi’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 ($\text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 340 nm’de, dakikada 1 mmol konjugatın üretilmesini sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak $\text{mmol/min} = (A / 9.6) \times 300$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. GST

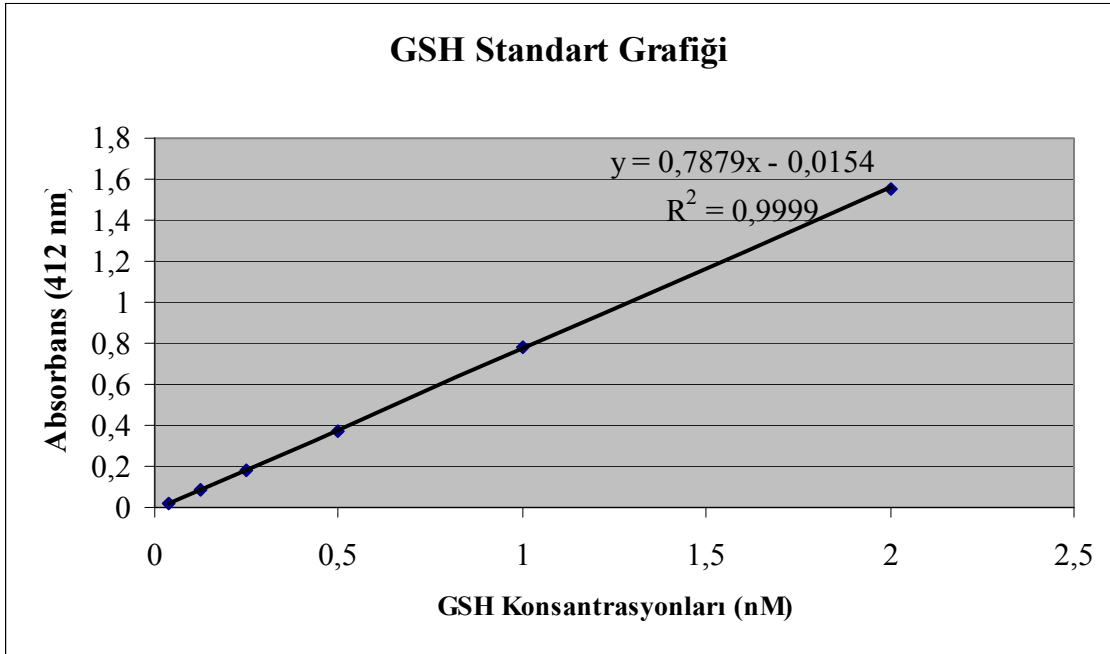
aktivitesi, bulunan EÜ'lerinin süpernatantlarda belirlenen total protein miktarına bölünerek $mmol \times l / (dakika \times mg \text{ protein})$ olarak tarif edildi. Her bir ölçüm 3 tekrar halinde yapıldı.

3.5.2.8. Total glutatyon (GSH) miktarı ölçümü:

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

GSH miktarının ölçülmesi: Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi¹⁷⁶. 0.5 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ilave edilerek homojenize edildi¹⁶⁷. Homojenatlar, 12000 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 quartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten (Şekil 4) yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, $nmol/mg \text{ doku}$ olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak belirlendi.



Şekil 4. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

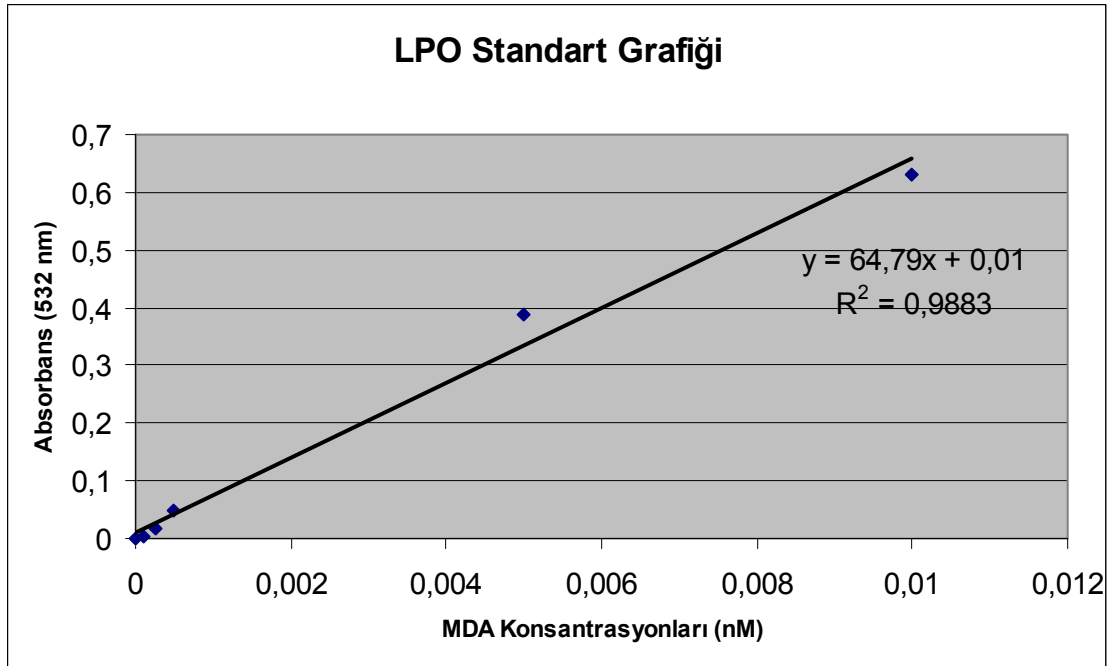
3.5.2.9. Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü:

Ölçüm prensibi: Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu LPO'nun son ürünlerinden olan MDA^{177,178} 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'le oluşturduğu rengin 532 nm'de ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı¹⁷⁹.

LPO ölçümü: Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi¹⁷⁹. 0.5 g doku üzerine 4.5 ml %10 KCl ilave edilerek homojenize edildi⁶⁵. Homojenatlar, 5000 g 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl %8 sodium lauryl sulphate (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 5). Numunelerin LPO miktarları, *nmol MDA/g doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.



Şekil 5. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

3.5.3. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS 12.0 software programı kullanılarak yapıldı. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri one-way variance analyzes (ANOVA) testi ile belirlendi ve $P < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda Scheffe's testi uygulandı.

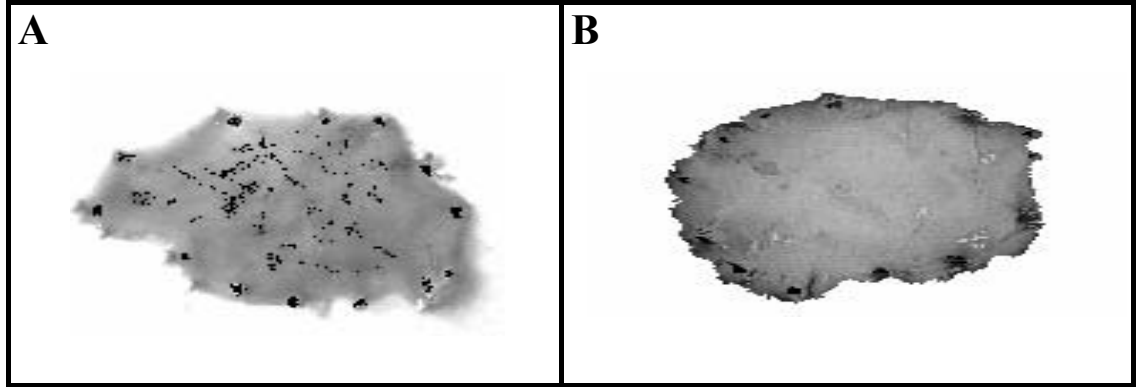
4. BULGULAR

Yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz veriler, bu bölümde tablo ve şekiller ile gösterilmiş olup kontrole göre mukayeseler ‘% kontrol’ olarak ifade edilmiştir. Deneylerde pozitif kontrol olarak ranitidin (RAN), famotidin (FAM), omeprazol (OMEP), lansoprazol (LAN), negatif kontrol olarak indometazin (IND) kullanılmıştır. Her deneye ait veriler tablo halinde ve 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.

4.1. Makroskopik Bulgular

Makroskopik inceleme sonuçları Tablo 2, Şekil 6 ve 7’de sunulmuştur.



Şekil 6. IND (25 mg/kg) tarafından oluşturulan gastrik hasarlı dokudan (A) ve askorbik asit (400 mg/kg) ile muamele edilmiş gruptan alınan (B) rat mideleri.

Tablo 2’den görüldüğü üzere sadece musluk suyu verilen grupta ülser oluşmazken IND ile muamele edilen mideler’de $35.0 \pm 1.18 \text{ mm}^2$, RAN grubunda $11.7 \pm 0.76 \text{ mm}^2$, FAM grubunda $4.7 \pm 0.49 \text{ mm}^2$, OMEP grubunda $6.3 \pm 1.12 \text{ mm}^2$, LAN grubunda $2.5 \pm 0.42 \text{ mm}^2$, askorbik asit’in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele

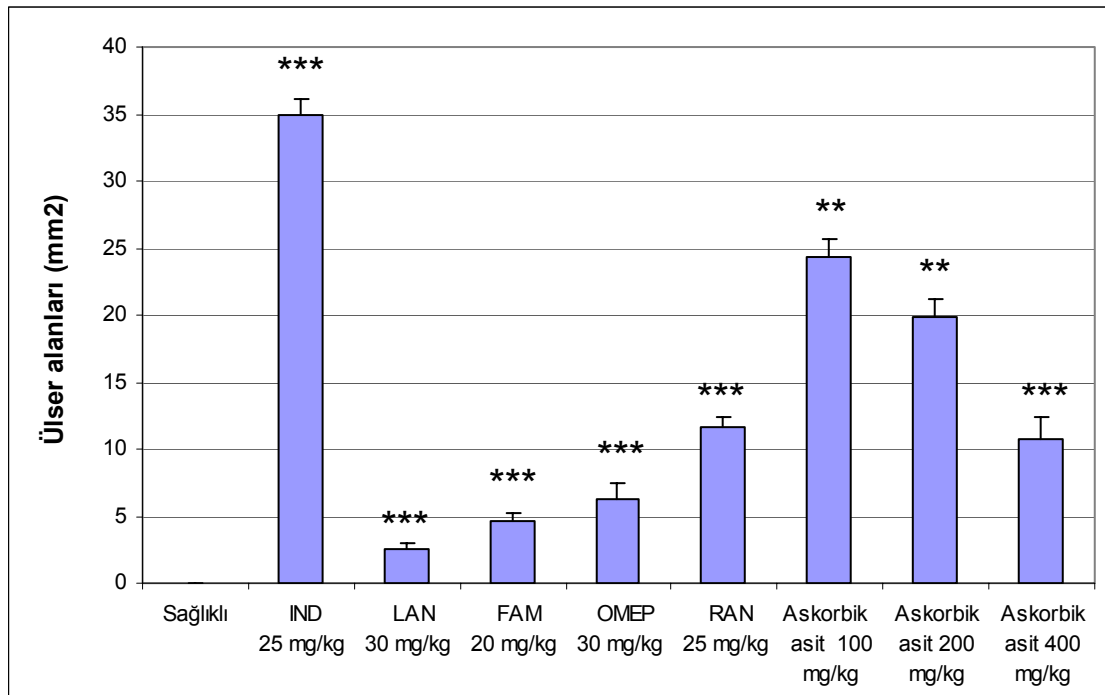
edilen gruplarda ise sırası ile 24.3 ± 1.33 , 19.8 ± 1.35 , 10.7 ± 1.69 mm² ülser alanı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND ile oluşturulan ülseri askorbik asit'in 100, 200 mg/kg dozları ($P < 0.01$) ve 400 mg/kg dozu ile RAN, FAM, OMEP ve LAN uygulanan dozları oluşan gastrik hasarı önemli oranda ($P < 0.005$) azaltmıştır.

Şekil 6 ülserli ve tedavi edilmiş mideleri temsil etmektedir. Bu şekilden görülebileceği gibi IND muamelesi sonucu gastrik dokuda kanamalar şeklinde oluşan ülserler askorbik asit ve diğer standart ilaçlar ile muamele edildiğinde ya çok azaltılmış veya yok edilmiştir. Şekil 7'den de net bir şekilde görülebileceği üzere IND grubunda meydana gelen ülser, uygulanan askorbik asit'in 100, 200 mg/kg dozları ($P < 0.01$) ve 400 mg/kg dozu ile RAN, FAM, OMEP ve LAN'ün uygulanan dozları oluşan gastrik hasarı önemli oranda ($P < 0.005$) azaltmıştır. IND'nin meydana getirdiği gastrik hasar dikkate alındığında RAN %66.6, FAM %86.6, OMEP %82, LAN %92.9, askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarının ise sırasıyla %30.6, %43,4 ve %69,4 oranında ülseri engellediği belirlenmiştir.

Tablo 2. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın rat midelerinde deneysel olarak indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	Ülser alanı (mm ²) ^a	% Inhibition ^b
Askorbik asit	6	100	24.3±1.33**	30.6
Askorbik asit	6	200	19.8±1.35**	43.4
Askorbik asit	6	400	10.7±1.69***	69.4
RAN	6	25	11.7±0.76***	66.6
OMEP	6	30	6.3±1.12***	82.0
FAM	6	20	4.7±0.49***	86.6
LAN	6	30	2.5±0.42***	92.9
IND	6	25	35.0±1.18***	-
Sağlıklı	6	-	-	-

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve **p<0.01 ve ***p<0.005 seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. ^b % olarak IND'ye göre inhibisyon miktarını ifade etmektedir.



Şekil 7. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki gastrik hasar alanlarının karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

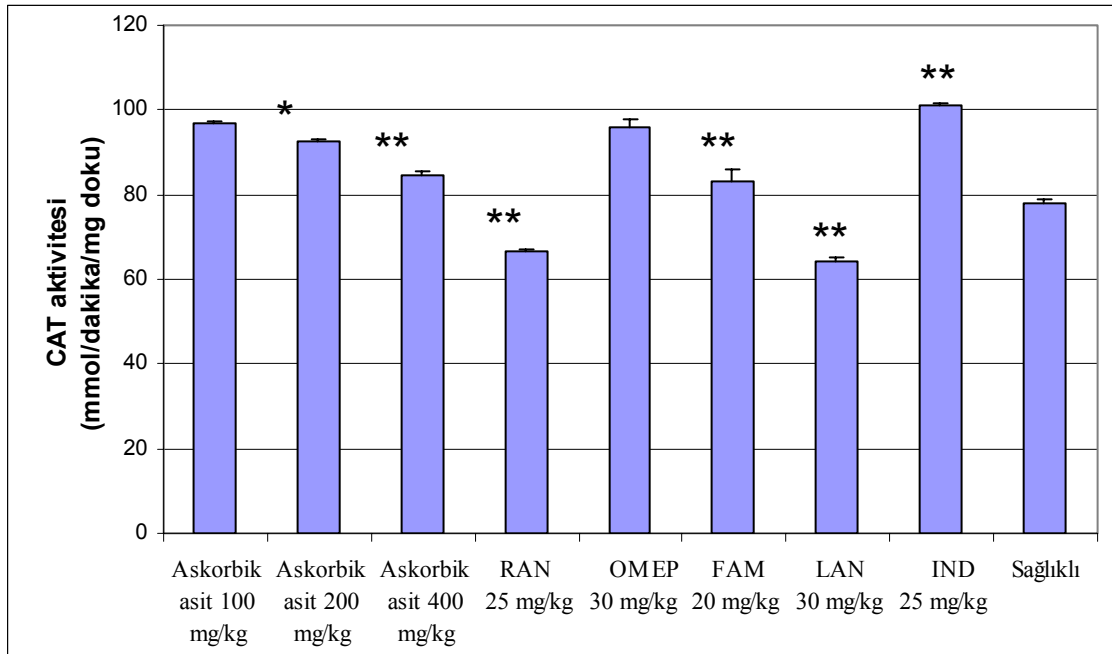
Rat mideleri makroskopik olarak incelendikten sonra mide dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C’de saklandı ve dokuların enzim aktiviteleri en geç üç gün içerisinde analiz edildi. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda CAT, GPx, MPx, SOD, GST, GR enzim aktiviteleri ve total glutatyon (GSH) ile lipid peroksidasyon (LPO) miktarları literatürlere dayalı uygun metodlar kullanılarak tespit edildi.

4.2.1. CAT aktivitesi üzerine askorbik asit’in etkileri: Askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM ve LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen CAT aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 8’de gösterilmiştir. Tablo 3’den görüldüğü üzere CAT aktiviteleri kontrol grubunda 78.0 ± 0.79 , IND grubu midelerinde 101.3 ± 0.49 , RAN grubunda 66.8 ± 0.52 , OMEP grubunda 95.8 ± 2.14 , FAM grubunda 83.2 ± 2.56 , LAN grubunda 64.1 ± 0.99 ve IND ile birlikte uygulanan askorbik asit’in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 97.0 ± 0.49 , 92.5 ± 0.76 ve 84.7 ± 0.67 *mmol/dakika/mg doku* olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND’nin önemli oranda artırdığı CAT aktivitesini ($P < 0.05$), IND ile birlikte uygulanan RAN, FAM ve LAN’ın önemli oranda azalttığı ($P < 0.05$) tespit edildi. Diğer yandan OMEP ve askorbik asit’in 100 mg/kg dozda IND ile birlikte uygulandığında CAT aktivitesini etkilemezken ($P > 0.05$), yine IND ile birlikte uygulanan 200 ve 400 mg/kg önemli oranda ($P < 0.05$) aktiviteyi azaltmıştır.

Tablo 3. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	CAT aktivitesi (mmol/dakika/mg doku)
Askorbik asit	6	100	97.0±0.49
Askorbik asit	6	200	92.5±0.76*
Askorbik asit	6	400	84.7±0.67**
RAN	6	25	66.8±0.52**
OMEP	6	30	95.8±2.14
FAM	6	20	83.2±2.56**
LAN	6	30	64.1±0.99**
IND	6	25	101.3±0.49**
Sağlıklı	6	-	78.0±0.79

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 8. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki CAT aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

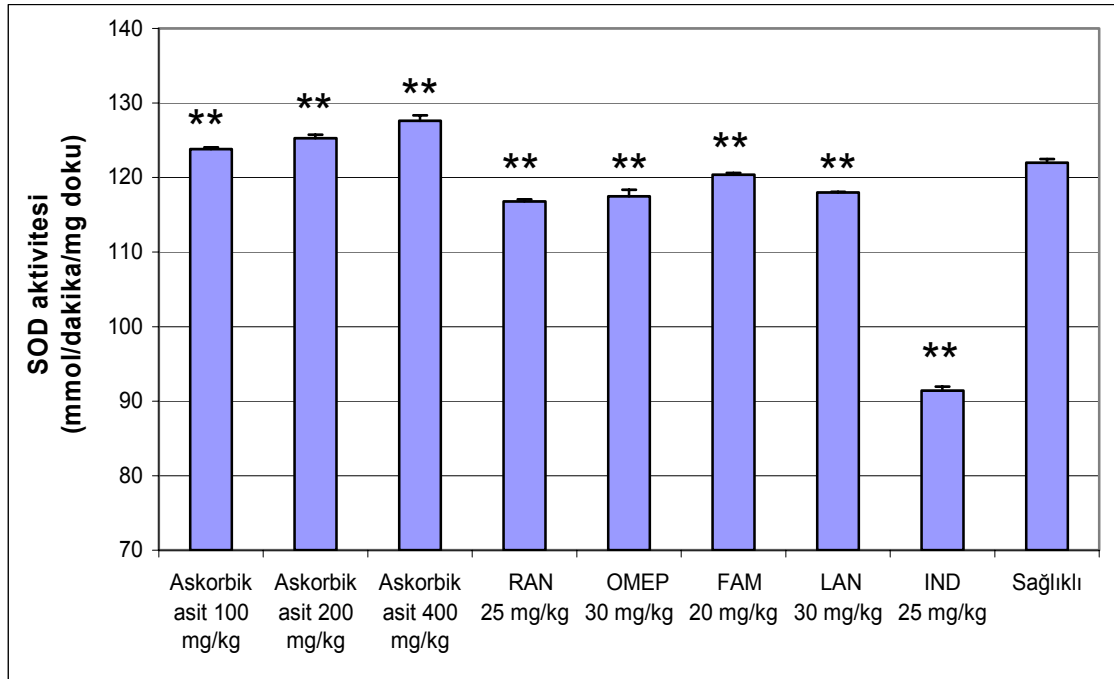
Tablo 3 ve Şekil 8’den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen CAT aktivitesinde ki artışı ($P<0.01$) IND ile birlikte uygulanan 400 mg/kg askorbik asit tarafından net bir şekilde azaltmıştır ($P<0.01$), diğer yandan IND ile birlikte 100 mg/kg dozda uygulanan Askorbik asit ise CAT aktivitesini etkilememiştir ($P>0.05$). Bu bulgular askorbik asit, RAN, LAN ve FAM’ın CAT aktivitesi üzerine inhibisyon etkisine sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.2. SOD aktivitesi üzerine askorbik asit’in etkileri: Distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen SOD aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 9’da gösterilmiştir. Tablo 4’den görüldüğü üzere SOD aktiviteleri kontrol grubunda 122.0 ± 0.47 , IND grubu midelerinde 91.4 ± 0.57 , RAN grubunda 116.8 ± 0.27 , OMEP grubunda 117.5 ± 0.84 , FAM grubunda 120.4 ± 0.23 , LAN grubunda 118.0 ± 0.07 ve IND ile birlikte uygulanan askorbik asit’in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 123.8 ± 0.23 , 125.3 ± 0.46 ve 127.6 ± 0.74 olarak tespit edilmiştir. Tablo 4 ve şekil 9’dan da görüleceği gibi IND’nin önemli oranda ($P<0.01$) azalttığı SOD aktivitesini, askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), LAN, FAM, OMEP ve RAN’ın yeniden kontrol grubu seviyesine ($P<0.01$) artırdığı tespit edilmiştir. SOD aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *mmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi.

Tablo 4. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki SOD enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	SOD aktivitesi (mmol/dakika/mg doku)
Askorbik asit	6	100	123.8±0.23**
Askorbik asit	6	200	125.3±0.46**
Askorbik asit	6	400	127.6±0.74**
RAN	6	25	116.8±0.27**
OMEP	6	30	117.5±0.84**
FAM	6	20	120.4±0.23**
LAN	6	30	118.0±0.07**
IND	6	25	91.4±0.57**
Sağlıklı	6	-	122.0±0.47

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve **p<0.01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 9. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki SOD aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

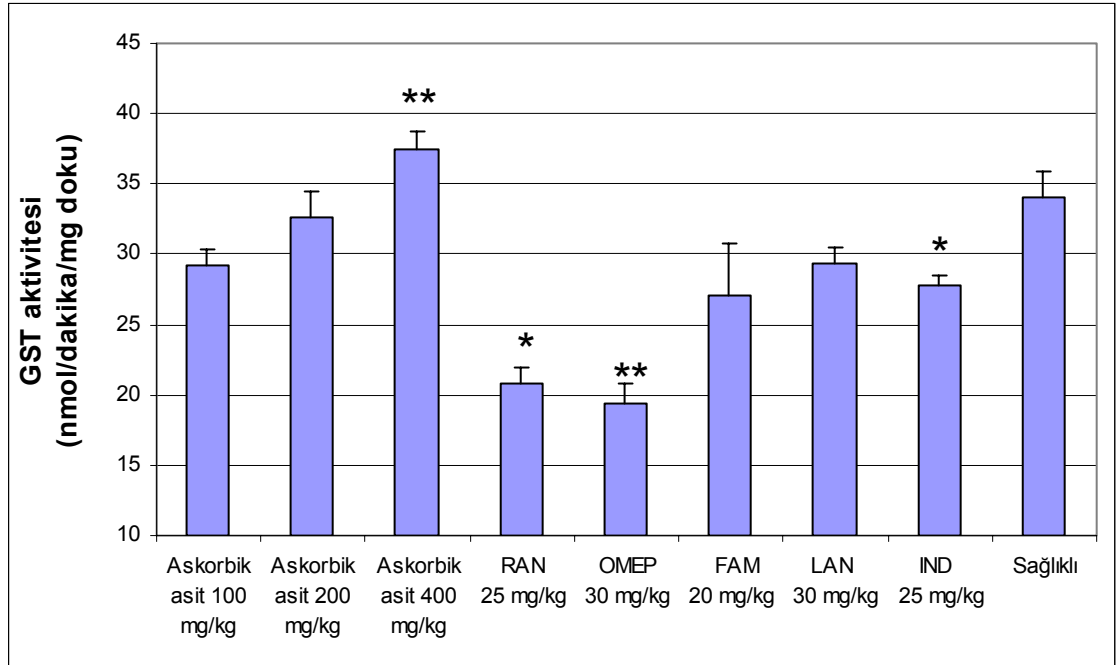
Tablo 4 ve Şekil 9'dan da görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen SOD aktivitesinde ki inhibisyon ($P<0.01$) uygulanan askorbik asit'in (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM ve LAN tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol seviyesine yaklaştırmıştır ($P<0.01$). Bu bulgular askorbik asit'in, RAN, FAM, OMEP VE LAN'un SOD aktivitesi üzerine aktive edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.3. GST aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkileri: Distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GST aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 10'da gösterilmiştir. Tablo 5'den görüldüğü üzere GST aktiviteleri kontrol grubunda 34.0 ± 1.83 , IND grubu midelerinde 27.8 ± 0.70 , RAN grubunda 20.8 ± 1.18 , OMEP grubunda 19.4 ± 1.37 , FAM grubunda 27.1 ± 3.61 , LAN grubunda 29.4 ± 1.02 ve IND ile birlikte uygulanan Askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 29.2 ± 1.21 , 32.6 ± 1.82 ve 37.5 ± 1.21 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND, RAN'nin ($P<0.05$) ve OMEP'in ($P<0.01$) önemli oranda GST aktivitesini azalttığı, IND ile birlikte uygulanan 400 mg/kg dozdaki Askorbik asit'in kontrol seviyesine getirdiği ($P<0.01$) söylenebilir. Diğer yandan Askorbik asit'in IND ile birlikte uygulandığında 100 ve 200 mg/kg dozları, FAM, LAN'un GST aktivitesini önemli oranlarda etkilemediği ($P>0.05$) belirlendi. GST aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *nmol/dakika /mg doku* olarak tarif edildi.

Tablo 5. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GST aktivitesi (nmol/dakika/mg doku)
Askorbik asit	6	100	29.2±1.21
Askorbik asit	6	200	32.6±1.82
Askorbik asit	6	400	37.5±1.21**
RAN	6	25	20.8±1.18*
OMEP	6	30	19.4±1.37*
FAM	6	20	27.1±3.61
LAN	6	30	29.4±1.02
IND	6	25	27.8±0.70*
Sağlıklı	6	-	34.0±1.83

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 10. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GST aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

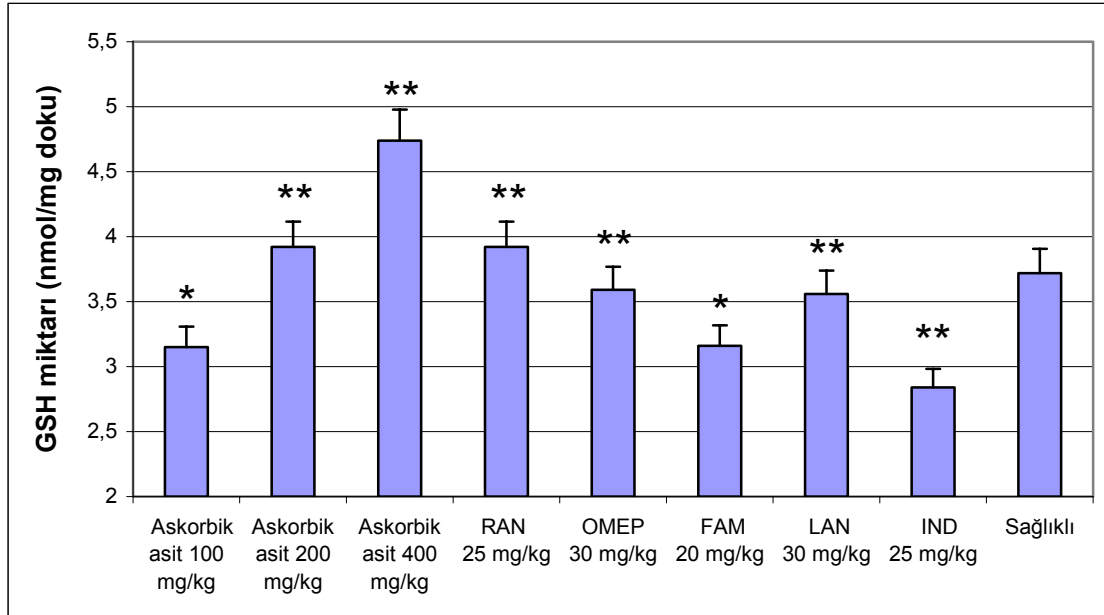
Tablo 5 ve Şekil 10'dan da görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GST aktivitesinde ki inhibisyon ($P<0.05$) IND ile birlikte uygulanan 400 mg/kg Askorbik asit tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($P<0.01$). Bu bulgular askorbik asit'in IND ile birlikte uygulandığında GST aktivitesini artırıcı etkisinin olduğunu göstermektedir.

4.3.4. GSH aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkileri: Distile su içerisinde çözülerek uygulanan Askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GSH miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 11'de gösterilmiştir. Tablo 6'dan görüldüğü üzere GSH miktarları kontrol grubunda 3.72 ± 0.02 , IND grubu midelerinde 2.84 ± 0.02 , RAN grubunda 3.92 ± 0.03 , OMEP grubunda 3.59 ± 0.07 , FAM grubunda 3.16 ± 0.15 , LAN grubunda 3.56 ± 0.04 ve Askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 3.15 ± 0.04 , 3.92 ± 0.05 ve 4.74 ± 0.06 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin önemli oranda ($P<0.01$) azalttığı GSH miktarını, IND ile birlikte uygulanan Askorbik asit 100 mg/kg ve FAM ($P<0.05$), Askorbik asit 200 ve 400 mg/kg, OMEP, LAN ve RAN'ın kontrol seviyesine yükselttiği ($P<0.01$) gösterilmektedir. Numunelerin GSH miktarları, *nmol/mg doku* olarak tarif edildi.

Tablo 6. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutatyon (GSH) düzeyi üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GSH miktarı (nmol/mg doku)
Askorbik asit	6	100	3.15±0.04*
Askorbik asit	6	200	3.92±0.05**
Askorbik asit	6	400	4.74±0.06**
RAN	6	25	3.92±0.03**
OMEP	6	30	3.59±0.07**
FAM	6	20	3.16±0.15*
LAN	6	30	3.56±0.04**
IND	6	25	2.84±0.02**
Sağlıklı	6	-	3.72±0.02

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 11. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GSH aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

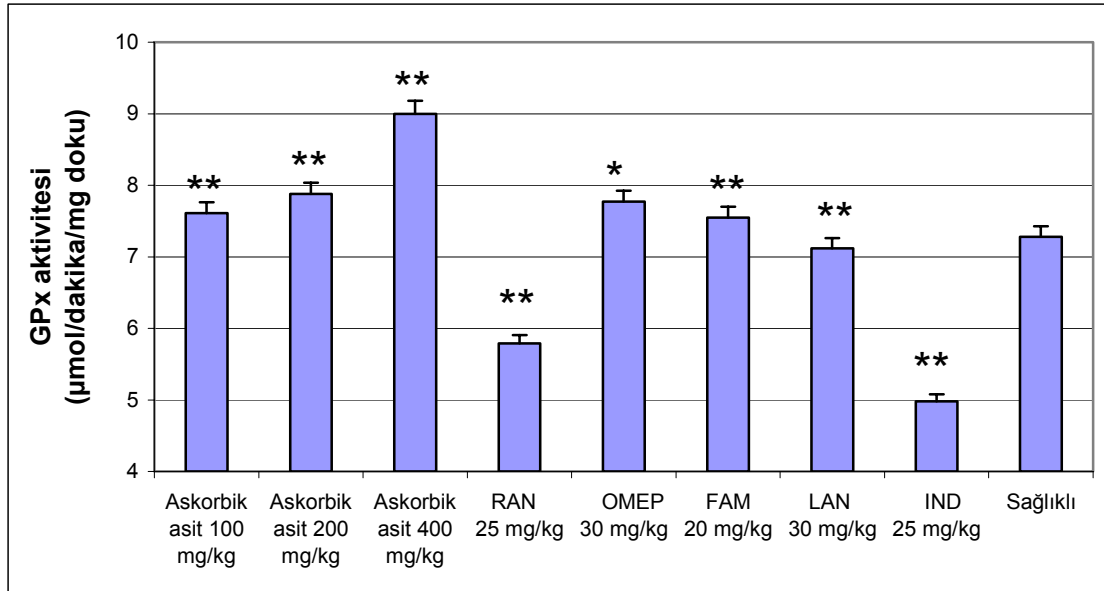
Tablo 6 ve Şekil 11’den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GSH miktarındaki azalma ($P<0.01$) IND ile birlikte uygulanan Askorbik asit 100 mg/kg ve FAM ($P<0.05$), Askorbik asit 200 ve 400 mg/kg, OMEP, LAN ve RAN tarafından ($P<0.01$) kontrol seviyesine getirilmiştir. Bu bulgular Askorbik asit, OMEP, LAN, FAM ve RAN’nin IND ile birlikte uygulandıklarında GSH miktarını artırdığını göstermektedir.

4.2.5. GPx aktivitesi üzerine askorbik asit’in etkileri: Distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GPx aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 12’de gösterilmiştir. Tablo 7’den görüldüğü üzere GPx aktiviteleri kontrol grubunda 7.28 ± 0.05 , IND grubu midelerinde 4.98 ± 0.0 , RAN grubunda 5.79 ± 0.09 , OMEP grubunda 7.77 ± 0.05 , FAM grubunda 7.55 ± 0.0 , LAN grubunda 7.12 ± 0.05 ve IND ile birlikte uygulanan Askorbik asit’in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 7.61 ± 0.05 , 7.88 ± 0.09 ve 9.00 ± 0.09 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND’nin önemli oranda ($P<0.05$) azalttığı GPx aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan FAM, RAN, OMEP, LAN ve Askorbik asit’in yeniden artırdığı ($P<0.01$) söylenebilir. GPx aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol/dakika/mg}$ doku olarak tarif edildi.

Tablo 7. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GPx aktivitesi ($\mu\text{mol/dakika/mg doku}$)
Askorbik asit	6	100	7.61 $\pm$ 0.05**
Askorbik asit	6	200	7.88 $\pm$ 0.09**
Askorbik asit	6	400	9.00 $\pm$ 0.09**
RAN	6	25	5.79 $\pm$ 0.09**
OMEP	6	30	7.77 $\pm$ 0.05**
FAM	6	20	7.55 $\pm$ 0.0**
LAN	6	30	7.12 $\pm$ 0.05**
IND	6	25	4.98 $\pm$ 0.0**
Sağlıklı	6	-	7.28 $\pm$ 0.05

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve **p<0.01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 12. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GPx aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

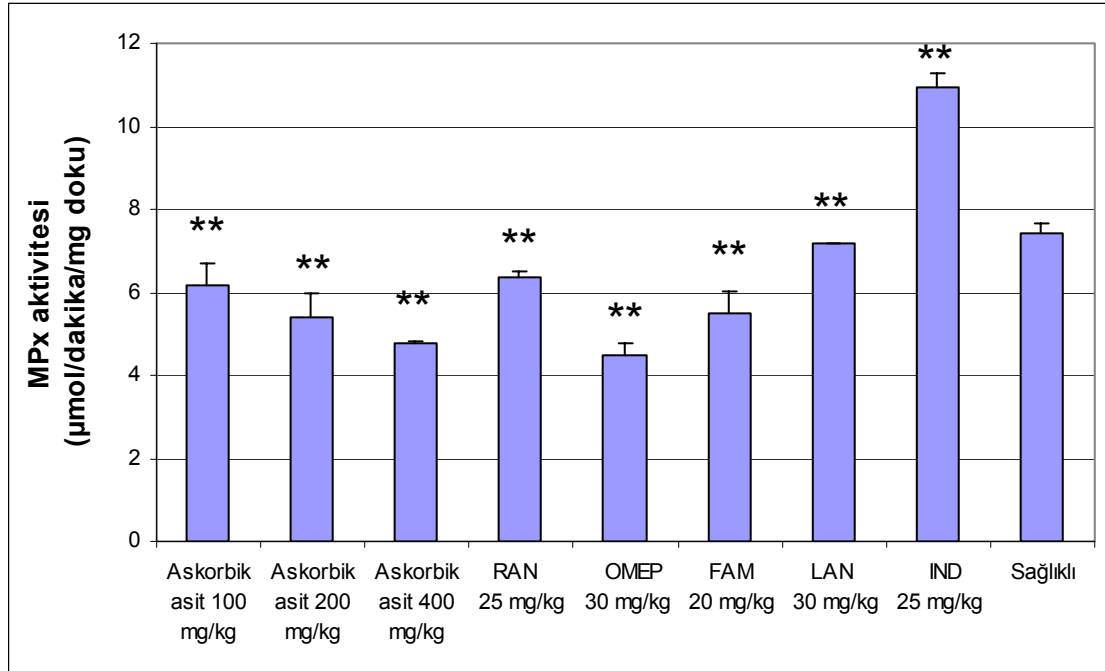
Tablo 7 ve Şekil 12’den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GPx aktivitesinde ki inhibisyon ($P<0.01$) IND ile birlikte uygulanan askorbik asitin tüm dozlarında net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($P<0.01$). Bu bulgular askorbik asit, RAN, OMEP, FAM, LAN’un IND ile birlikte uygulandığında GPx aktivitesini artırıcı etkisinin olduğunu göstermektedir ($P<0.01$).

4.2.6. MPx aktivitesi üzerine askorbik asit’in etkileri: Distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg) RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MPx miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 8 ve Şekil 13’de gösterilmiştir. Tablo 8’den görüldüğü üzere MPx aktivitesi kontrol grubunda 7.44 ± 0.22 , IND grubu midelerinde 10.95 ± 0.34 , RAN grubunda 6.37 ± 0.14 , OMEP grubunda 4.48 ± 0.27 , FAM grubunda 5.50 ± 0.54 , LAN grubunda 7.18 ± 0.0 ve IND ile birlikte uygulanan askorbik asit’in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 6.16 ± 0.54 , 5.40 ± 0.57 ve 4.79 ± 0.05 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND’nin önemli oranda ($P<0.01$) artırdığı MPx aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan FAM, RAN, OMEP, LAN ve Askorbik asit’in 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda MPx aktivitesini azalttığını ($P<0.01$) göstermektedir. Numunelerin MPx aktiviteleri $\mu\text{mol/dakika/mg doku}$ olarak tarif edildi.

Tablo 8. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki miyeloperoksidaz (MPx) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	MPx aktivitesi ($\mu\text{mol/dakika/mg doku}$)
Askorbik asit	6	100	6.16 $\pm$ 0.54**
Askorbik asit	6	200	5.40 $\pm$ 0.57**
Askorbik asit	6	400	4.79 $\pm$ 0.05**
RAN	6	25	6.37 $\pm$ 0.14**
OMEP	6	30	4.48 $\pm$ 0.27**
FAM	6	20	5.50 $\pm$ 0.54**
LAN	6	30	7.18 $\pm$ 0.0**
IND	6	25	10.95 $\pm$ 0.34**
Sağlıklı	6	-	7.44 $\pm$ 0.22

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve **p<0.01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 13. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki MPx aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

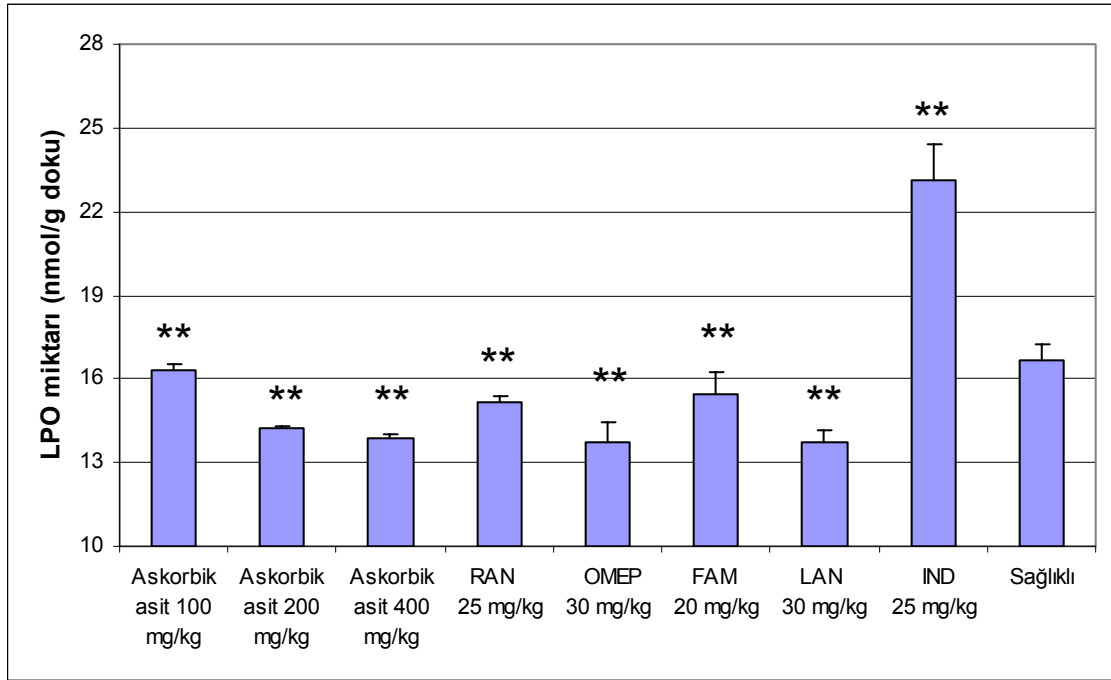
Tablo 8 ve Şekil 13'den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen MPx miktarındaki artışın ($P<0.01$) IND ile birlikte uygulanan Askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarının, RAN, OMEP, FAM, LAN tarafından net bir şekilde ortadan kaldırıldığı ve kontrol grubundaki seviyeye getirildiği görülmektedir ($P<0.01$). Bu bulgular askorbik asit, RAN, OMEP, FAM, LAN'ın IND ile birlikte uygulandıklarında MPx miktarını azalttığını göstermektedir.

4.2.7. LPO miktarı üzerine askorbik asit'in etkileri: Distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MDA miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 9 ve Şekil 14'de gösterilmiştir. Tablo 9'dan görüldüğü üzere LPO'nun göstergesi olan MDA miktarları kontrol grubunda 16.66 ± 0.56 , IND grubu midelerinde 23.14 ± 1.29 , IND ile birlikte uygulanan RAN grubunda 15.19 ± 0.21 , OMEP grubunda 13.72 ± 0.73 , FAM grubunda 15.43 ± 0.80 , LAN grubunda 13.72 ± 0.42 ve Askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 16.29 ± 0.21 , 14.21 ± 0.12 ve 13.84 ± 0.21 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin önemli oranda ($P<0.01$) artırdığı LPO miktarını, IND ile birlikte uygulanan FAM, RAN, OMEP, LAN ve askorbik asit'in kontrol seviyesine azalttığı ($P<0.01$) göstermektedir. Numunelerin LPO miktarları, *nmol MDA/g doku* olarak tarif edilmiştir.

Tablo 9. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki lipit peroksidasyon (LPO) düzeyi üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	LPO miktarı (nmol/g doku)
Askorbik asit	6	100	16.29±0.21**
Askorbik asit	6	200	14.21±0.12**
Askorbik asit	6	400	13.84±0.21**
RAN	6	25	15.19±0.21**
OMEP	6	30	13.72±0.73**
FAM	6	20	15.43±0.80**
LAN	6	30	13.72±0.42**
IND	6	25	23.14±1.29**
Sağlıklı	6	-	16.66±0.56

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 14. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki LPO aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

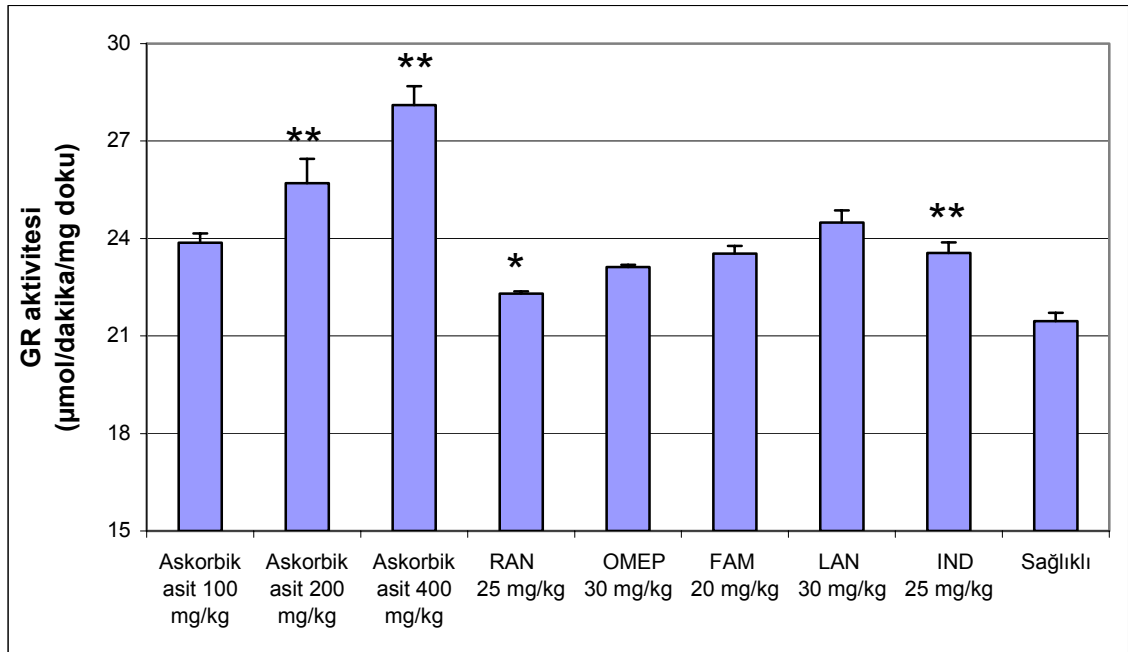
Tablo 9 ve Şekil 14'den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen LPO miktarındaki artış ($P<0.01$) IND ile birlikte uygulanan Askorbik asit tarafından net bir şekilde ortadan kaldırılmış ve kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($P<0.01$). Bu bulgular askorbik asit, RAN, OMEP, FAM, LAN'un IND ile birlikte uygulandıklarında LPO miktarını azalttığını göstermektedir.

4.2.8. GR miktarı üzerine askorbik asit'in etkileri: Distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GR miktarlarını gösteren sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 15'de gösterilmiştir. Tablo 10'dan görüldüğü üzere GR miktarları kontrol grubunda 21.46 ± 0.25 , IND grubu midelerinde 23.55 ± 0.33 , RAN grubunda 22.30 ± 0.07 , OMEP grubunda 23.12 ± 0.07 , FAM grubunda 23.53 ± 0.24 , LAN grubunda 24.49 ± 0.38 ve IND ile birlikte uygulanan askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 23.87 ± 0.29 , 25.70 ± 0.75 ve 28.11 ± 0.58 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bize IND'nin önemli oranda ($P<0.01$) artırdığı GR miktarını, IND ile birlikte uygulanan askorbik asit'in 200 ve 400 mg/kg dozlarının da artırdığı ($P<0.01$) göstermektedir. Numunelerin GR miktarları, $\mu\text{mol/dakika/mg doku}$ olarak tarif edildi.

Tablo 10. Askorbik asit, ranitidine (RAN), omeprazol (OMEP), famotidin (FAM) ve lansoprazol (LAN)'ın indometazin (IND) tarafından gastrik hasar oluşturulan rat midelerinde ki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Muameleler	N	Doz mg/kg vücut ağı.	GR aktivitesi ($\mu\text{mol/dakika/mg doku}$)
Askorbik asit	6	100	23.87 $\pm$ 0.29
Askorbik asit	6	200	25.70 $\pm$ 0.75**
Askorbik asit	6	400	28.11 $\pm$ 0.58**
RAN	6	25	22.30 $\pm$ 0.07*
OMEP	6	30	23.12 $\pm$ 0.07
FAM	6	20	23.53 $\pm$ 0.24
LAN	6	30	24.49 $\pm$ 0.38
IND	6	25	23.55 $\pm$ 0.33**
Sağlıklı	6	-	21.46 $\pm$ 0.25

Askorbik asit üç; RAN, OMEP, FAM ve LAN ise tek doz olarak verilmiş, IND grubu sağlıklı grup ile diğer gruplar ise IND grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 6 rat'taki (N) ölçümün ortalaması [$\pm$ standart hata (SE)] olarak gösterilmiş ve **p<0.01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



Şekil 15. IND (25 mg/kg), askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN (25 mg/kg), OMEP (30 mg/kg), FAM (20 mg/kg), LAN (30 mg/kg), IND (25 mg/kg) ve kontrol gruplarından alınan mide örneklerindeki GR aktivitelerinin karşılaştırılmasını gösteren diyagram.

Tablo 10 ve Şekil 15’den de görülebileceği üzere kontrol grubuna göre IND ile muamele sonrası meydana gelen GR miktarındaki artış ($P<0.01$) IND ile birlikte uygulanan askorbik asit’in 200 ve 400 mg/kg dozları tarafından daha da artırılmış ($P<0.01$), RAN tarafından kontrol grubundaki seviyeye getirilmiştir ($P<0.05$). Bu bulgular askorbik asit’in IND ile birlikte uygulandıklarında GR miktarını artırdığını, RAN’nin IND ile birlikte uygulandığında GR miktarını azalttığını göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Askorbik asit suda çözünebilen antioksidan vitamin olup günümüzden yaklaşık 80 yıl önce keşfedilmiştir. Günümüze kadar molekül yapısı dâhil olmak üzere birçok yönden incelenmiş olan askorbik asit'in canlının metabolizmasına olan etkileri tam olarak ortaya konmamış olup halen araştırmalar sürmektedir^{180,181}. Canlının metabolizması ya da birçok dış etken tarafından oluşturulan serbest radikallerin çeşitli hastalıklara ve metabolizma bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Askorbik asit'in en önemli özelliği yapısında bulundurduğu elektronunu kolaylıkla radikal özellik gösteren atoma vererek radikalın yıkıcı etkisini ortadan kaldırması olarak bilinmektedir. Özellikle canlılarda meydana gelen kronik kalp hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, viral hastalıklar, hipertansiyon, periodontal hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşmasında plazma askorbik asit seviyesi arasında bağlantı tespit edilmiştir. Ayrıca iç ve dış kaynaklar nedeni ile oluşan serbest radikallerin etkisi ile ticari gelir elde edilen hayvanlarda verim kayıplarının meydana geldiği bilinmektedir. Hayvanlarda meydana gelen bu verim kayıplarının önlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda kanatlı yemlerine askorbik asit ilave edilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır^{182,183}. Ancak askorbik asit'in antiülserojen etkisinin incelendiği çalışmalar olsa da oluşan antiülserojenik etki sürecinin mekanizmaları hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu açıdan bakıldığında mevcut araştırmanın bu konuda bir boşluğu dolduracağı inancını taşımaktayız. Bu amaçla saf olarak piyasadan aldığımız askorbik asit'in değişik dozlarda gastroprotektif etkisi ve antioksidan sistem üzerine olan etkisi araştırıldı. Ayrıca, enzim aktivitelerinin gastroprotektif etkisini araştırmak için gastrik hasarlı dokularda SOD, GPx, MPx, GR, CAT ve GST enzim aktiviteleri ile GSH ve LPO miktarları ölçüldü.

Araştırmamızda indometazin (IND) ile muamele edilen rat midelerinde meydana gelen ülserli doku hasarı (Tablo 2, Şekil 7) askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda IND'e göre sırasıyla %30.6, 43.4 ($P<0.01$) ve 69.4 ($P<0.005$) azalttığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda ülser alanı oluşmazken RAN'ın IND ile oluşturulan ülseri %66.6 oranında ($P<0.005$) azalttığı, OMEP'un IND ile oluşturulan ülseri %82 oranında ($P<0.005$) azalttığı, FAM'ın IND ile oluşturulan ülseri %86.6 oranında ($P<0.005$) azalttığı, LAN'ın IND ile oluşturulan ülseri %92.9 oranında ($P<0.005$) azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 7). Askorbik asit uygulanan dozlar arasında en etkili doz 400 mg/kg olarak uygulanan doz olup RAN ile mukayese edildiğinde ülser önleyici etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. IND'nin gastrik hasar oluşturmalarının sebepleri arasında; mide dokusundaki sitoprotektif PG'lerin sentezini inhibe etmesi¹⁸⁴, LPO'yu artırması^{185,186}, doku glukoz seviyesini azaltması¹⁸⁷ MPx aktivitesini ve NOS aktivitesini artırması¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ sayılabilir. IND, etanol ve diğer ajanlar ile oluşturulan mukozal hasarların reaktif oksijen molekülleri ile ilişkili olduğu da literatürde kaydedilmiştir¹⁹¹. Literatürde rapor edilmiş çok sayıda araştırmada IND gibi antienflamatuvar ilaçların hem prooksidan hem de lipit peroksit oluşturuucu etkilerinin olduğu ve bu tür ilaçların mukozal hücrelerin antioksidan sistemlerini süratle bloke ederek ROS oluşumuna ve bu ROS oluşumunun da LPO'ya neden olabileceği öne sürülmüştür^{39,192}. Oksidatif hasarlar nedeni ile kontrol edilemeyen LPO bir süre sonra proteinlerde oksidasyona ve sonunda da hücre ölümüne yol açabilmektedir.

Organizmalar ROS'ların toksisitesine karşı hem enzimatik hem de enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptirler^{193,194}. ROS'lara karşı (özellikle de $[O_2^{\cdot-}]$ süperoksit anyonuna karşı) savunmada önemli süpürücü enzimlerden biri de SOD'dir.

SOD'ler (sitoplazmik Cu / Zn SOD, Mitokondrial Mn-SOD), $O_2^{\cdot-}$ anyonunun H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizlerken CAT ve GPx ise H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşümünü katalizler¹⁹⁵.

IND ile ülser oluşturulmuş dokularda bazı antioksidan enzim aktiviteleri (SOD GST ve GPx)'nin azaldığı konusunda pekçok literatür kaydına rastlanmıştır¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

Araştırmamızda IND ile muamele edilen rat midelerinde belirlenen SOD aktivitesi (Tablo 4, Şekil 9) kontrol grubuna göre önemli oranda azalmıştır ($P<0.01$). IND ile muamele edilen ratlarda askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda uygulanması ile SOD aktivitesi önemli oranda artarak kontrol grubu seviyesine gelmiştir ($P<0.01$). Benzer şekilde RAN, OMEP, LAN, FAM'in de SOD aktivitesini kontrol grubu seviyesine çıkardığı tespit edilmiştir ($P<0.01$).

Diklofenak sodyum, meloksikam ve ketoprofenil gibi çeşitli NSAID'ler ve IND ile muamele edilen rat mide dokularında SOD aktivitesinin azaldığına ilişkin bulgularımız daha önce yapılmış olan çok sayıda çalışma^{196,199-201} ile uyum içerisindedir. Fakat IND'nin hangi mekanizma ile SOD aktivitesini inhibe ettiği henüz kesin olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Antioksidanların inhibisyonu ROS birikimine yol açar. ROS'ların üretildiği yerde SOD'yi de içine alan antioksidanların varlığı, IND ile uyarılan patojenezin kontrol edilmesinde koruyucu bir faktör olarak davranır¹⁹⁹. Araştırmamızda IND etkisi ile azalan SOD aktivitesinin, askorbik asit'in tüm dozları, FAM, OMEP, LAN ve RAN tarafından yeniden artırıldığı ve bunun da oksidatif hasarı kısmen engelleyerek gastrik hasarın giderilmesinde rol oynadığı düşünülebilir. Cu, Zn ve Mn kompleksleri ile yapılan çalışmalarda SOD aktivitesi ile PG sentezi arasında bir ilişkiye işaret edilmekte ve IND ile oluşturulan ülser modelinin olası mekanizmalarından birisi olarak kabul edilmektedir^{197,202,203}. Bu araştırmalar ışığında ele alındığında mevcut araştırma

çerçevesinde elde ettiğimiz bulgular PG seviyeleri üzerine de askorbik asit'in etkili olduğu izlenimini vermektedir.

IND ile muamele sonucu PG konsantrasyonu azalsa da Mn ve Cu komplekslerinin gastrik korumadaki katkıları önemlidir. Bunun yanı sıra Cu ve Mn kompleksleri tarafından sağlanan gastrik korumaya sadece PG'ler değil serbest radikal süpürücüler gibi diğer faktörler de katkıda bulunurlar¹⁹⁷.

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^{197,204}.

SOD inhibitörü olan dietilditiyokarbamat (DDC) verilen IND ile uyarılmış gastrik hasarlı rat dokusunda SOD aktivitesinin azaldığı, bunun sebebinin ise mukozal asidifikasyonun yol açtığı bikarbonat salgılanmasındaki artışın DDC tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir²⁰⁵. DDC'nin bikarbonat salgılanması üzerindeki inhibisyon etkisi SOD ilavesiyle tersine döndürülebilir²⁰⁶. Bu bilgilerden yola çıkarak SOD'nin bikarbonat salgılanması prosesinde de rol aldığı söylenilebilir.

Bütün bu verilerden yola çıkarak RAN, OMEP, FAM, LAN ve askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarının gastroprotektif etki göstermesinde, SOD aktivitesini artırmasının önemli bir paya sahip olduğunu düşünmekteyiz (Şekil 9).

Araştırmamızda kontrol ve muamele gruplarında tespit edilen CAT aktiviteleri Tablo 3 ve Şekil 8'de sunulmuştur. IND tarafından önemli oranda artırılan CAT aktivitesi askorbik asitin 200 ve 400 mg/kg dozları, RAN, FAM, LAN tarafından önemli oranda azaltıldığı görülmüştür (şekil 8). Mevcut bulgular OMEP'in CAT

aktivitesi üzerine etkisiz olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda askorbik asit'in mevcut gastroprotektif etkisinin CAT aktivitesi ile ilişkili olduğu öne sürülebilir.

Yine araştırmamızda distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GR aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 15'de gösterilmiştir. Tablo 10'dan görüldüğü üzere GR miktarları kontrol grubunda 21.46 ± 0.25 , IND grubu midelerinde 23.55 ± 0.33 , RAN grubunda 22.30 ± 0.07 , OMEP grubunda 23.12 ± 0.07 , FAM grubunda 23.53 ± 0.24 , LAN grubunda 24.49 ± 0.38 ve IND ile birlikte uygulanan askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 23.87 ± 0.29 , 25.70 ± 0.75 ve 28.11 ± 0.58 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bize IND'nin önemli oranda ($P < 0.01$) artırdığı GR miktarını, IND ile birlikte uygulanan askorbik asit'in 200 ve 400 mg/kg dozlarının daha da artırdığını ($P < 0.01$) göstermektedir.

Diğer yandan GPx aktivitesi ile ilgili bulgularımız Tablo 7 ve Şekil 12'de sunulmuştur. IND ile muamele edilen rat midelerinde kontrol grubuna göre oldukça önemli oranda inhibisyon meydana geldiğini ($P < 0.01$) göstermektedir. IND ile birlikte uygulanan askorbik asit'in doz artışına bağlı olarak GPx aktivitesini artırmış ve kontrol seviyesine getirmiştir. İlaveten IND ile birlikte uygulanan FAM, OMEP, RAN ve LAN'da GPx aktivitesini artırmıştır ($P < 0.01$). Artan GPx ve GR aktivitelerinin ortamda bulunan GSH miktarı ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

Mide dokusunda indometazin vasıtasıyla CAT ve GR aktivitesinin artırıldığı literatürlerde belirtilmiştir^{196,199,207}. Bizim bulgularımızda da IND tarafından CAT ve GR aktivitesinin artırıldığı tespit edilmiştir.

GPx aktivitesinin IND tarafından azaltıldığı da literatürde kayıtlıdır^{198,199,176}. Bu açıdan bakıldığında bulgularımız literatürle uyum içerisindedir. IND ile muamele edilen dokularda CAT aktivitesi artarken GPx aktivitesinin azalması her iki enzimin H_2O_2 'yi kullanmakta yarışıyor olmalarından kaynaklanıyor olabilir²⁰⁹. CAT ve GPx enzimleri H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürerek zayıf radikalik etkisini ortadan kaldırır. Çünkü H_2O_2 ortaklanmamış bir elektron içermediği için kendi başına güçlü bir radikal değildir^{136,210}. Bununla beraber, hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, ROS içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. H_2O_2 , Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturabilir¹⁰¹. Bu yüzden H_2O_2 'nin suya dönüştürülmesi zorunludur. Gastrik hasara uğramış olan dokularda CAT aktivitesinin artması ikinci planda gastrik korumaya yardımcı olması açısından da oldukça önemlidir.

Gastrik mukozal dokuların içerisindeki nötrofil salınımı MPx enzimi ile kontrol altında tutulmaya çalışılır. MPx deneysel olarak oluşturulmuş çeşitli gastrik yaralarda nötrofil salınımının bir göstergesi olarak kullanılır^{211,212}. Gastrik mukozal dokuların içerisindeki nötrofil salınımı çeşitli gastrik lezyonların patolojisinde tehlikeli bir oluşumdur^{213,214}. Son zamanlarda yapılan çalışmalar mide dokusunda oluşan gastrik mukozal hasarların MPx aktivitesini artırdığını göstermektedir^{214,215}.

Araştırmamızda distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen MPx aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 8 ve Şekil 13'de gösterilmiştir. Tablo 8'den görüldüğü üzere kontrol grubunda ki MPx aktivitesi 7.44 ± 0.22 , IND grubu midelerinde 10.95 ± 0.34 , RAN grubunda 6.37 ± 0.14 , OMEP grubunda 4.48 ± 0.27 , FAM grubunda 5.50 ± 0.54 , LAN grubunda 7.18 ± 0.0 ve IND ile

birlikte uygulanan askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 6.16 ± 0.54 , 5.40 ± 0.57 ve 4.79 ± 0.05 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize IND'nin önemli oranda ($P < 0.01$) artırdığı MPx aktivitesini, IND ile birlikte uygulanan FAM, RAN, OMEP, LAN ve askorbik asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarında MPx aktivitesini azalttığını ($P < 0.01$) göstermektedir. Bu sonuçlar askorbik asit'in MPx aktivitesi üzerinde önemli oranda etkin olduğunu göstermektedir.

Şekil 11 ve Tablo 6'dan görülebileceği gibi GSH miktarı IND tarafından önemli oranda azaltılmıştır ($P < 0.01$). IND ile birlikte uygulanan askorbik asit'in bütün dozlarında GSH miktarını artırmış 200 ve 400 mg/kg dozda ise daha da artırarak kontrol seviyesine getirmiştir ($P < 0.01$). RAN, OMEP ve LAN GSH miktarını kontrol düzeyine artırırken ($P < 0.01$), FAM kısmi olarak artırmıştır ($P < 0.01$). Bu bulgular IND tarafından meydana getirilen gastrik hasarın temel sebeplerinden birisinin gastrik GSH düzeyinin azaltılması olduğunu göstermektedir. Bulgularımız literatürlerdeki bulgular ile tam bir uyum içerisindedir^{197,198,216}.

Araştırmamızda distile su içerisinde çözülerek uygulanan askorbik asit (100, 200 ve 400 mg/kg), RAN, OMEP, FAM, LAN, IND ve kontrol gruplarının mide dokularında belirlenen GST aktivitelerini gösteren sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 10'da gösterilmiştir. Tablo 5'den görüldüğü üzere kontrol grubunda ki GST aktivitesi 34.0 ± 1.83 olup, IND ile muamele edilen grupta 27.8 ± 0.70 'lük seviyeye düştüğü, RAN grubunda 20.8 ± 1.18 , OMEP grubunda 19.4 ± 1.37 , FAM grubunda 27.1 ± 3.61 , LAN grubunda 29.4 ± 1.02 olarak aktivitelerinde azalış tesbit edilmiştir. asit'in 100, 200 ve 400 mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 29.2 ± 1.21 , 37.5 ± 1.21 ve 37.5 ± 1.21 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre IND, RAN'nin ($P < 0.05$) ve OMEP'in ($P < 0.01$) önemli oranda GST aktivitesini azalttığı, IND ile birlikte uygulanan

400 mg/kg dozdaki Askorbik asit'in kontrol seviyesine getirdiği ($P<0.01$) söylenebilir. Diğer yandan Askorbik asit'in IND ile birlikte uygulandığında 100 ve 200 mg/kg dozları, FAM, LAN'un GST aktivitesini önemli oranlarda etkilemediği ($P>0.05$) belirlendi. Diğer yandan dikkat çekici olarak 400 mg/kg'lık doz IND tarafından inhibe edilen GST aktivitesini kontrol seviyesinin üzerine kadar artırmıştır. Bu sonuçlar askorbik asit'in GST aktivitesi üzerinde önemli oranda etkin olduğunu göstermektedir.

Çeşitli kimyasal ajanların çoğu GSH ve GSH-bağlı enzimlerin konsantrasyonunu artırarak etki gösterirler²¹⁷⁻²¹⁹. Diğer yandan bazı kemopreventif ajanların çeşitli dokularda GSH ve GSH-bağlı enzimleri uyardığı da belirlenmiştir²²⁰. Özellikle GP_x ve GST gibi faz II enzimlerinin uyarıcıları potansiyel kemopreventif ajanlar olarak düşünülmektedir²²¹. Çeşitli dokulardaki GSH ve GSH-bağlı enzimler (GP_x, GST ve GGT) antioksidan ve detoksifikasyon özelliklerinden dolayı kemoprevensiyon biomarkırları olarak dikkate alınırlar^{222,223}.

Bu açıdan bakıldığında, GST aktivitesinde meydana getirdiği artış nedeniyle askorbik asite, potansiyel bir kemopreventif ajan gözüyle bakılabilir.

IND ile oluşturulan gastrik hasarlı dokularda LPO miktarının arttığı çok sayıda literatürde kayıtlıdır^{23,29,209,224,225}. Bizim bulgularımızda da IND ile muamele sonrası LPO miktarı önemli oranda artmıştır ($P<0.01$). IND ile birlikte uygulanan askorbik asit'in bütün dozlarda önemli oranda LPO miktarını azalttığı ($P<0.01$) belirlenmiştir (Tablo 9, Şekil 14). Benzer şekilde RAN, FAM, LAN ve OMEP'ün de önemli oranda LPO miktarını azalttığı ($P<0.01$) gözlenmiştir.

IND vasıtasıyla oluşturulan gastrik hasarın en önemli sebebi olarak prostaglandin sentezinin engellenmesi gösterilmektedir^{197,226-228}. 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 edilmemelidir²²⁵. 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 eder²²⁹.

IND, H₂O₂ varlığında LPO'yu uyaracak şekilde aksiyon göstererek gastrik hasar oluşturabilir. Bu bilgiler indometazin ile rat midelerinde gastrik hasar oluşumunun mekanizmasının COX enzimleri inhibisyonunun yanı sıra LPO yoluyla da olabileceğinin göz ardı edilmemesi gerektiğini doğrulamaktadır. Bu nedenle indometazinin LPO'ya yönelmemesi için ortamdaki H₂O₂'in harcanması gerekir. H₂O₂, CAT ve GPx enzimlerinin substratı olduğu için CAT ve GPx aktivitesinde meydana gelen artış daha fazla H₂O₂'nin harcanması anlamına gelecek ve ortamda harcanacak H₂O₂ olmadığı için indometazin LPO'ya yönelmeyecektir. Bu bağlamda askorbik asit'in SOD enzimi üzerinde gösterdiği modülatör etkisi, gastrik hasar önleyici mekanizma hakkında bize yol göstermektedir. Diğer yandan özellikle LPO ve GSH miktarları üzerine askorbik asit'in pozitif etkileri kayda değerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada,

Askorbik asit'in IND ile oluşturulan gastrik hasarı önemli oranda önlediği belirlendi. Bulgular, Askorbik asit'in CAT, MPx, GR, GPx, GST, SOD aktivitesi, GSH

ve LPO miktarları üzerine etki ederek dokuların lehine olacak şekilde modölatör etkiye sahip olmasının gastroprotektif etkisi ile ilişkili olduğu şeklinde değerlendirildi. Bu çalışmada Askorbik asit'in diğer ülser modellerinde gastrik hasar önleyici etkisi araştırılmamıştır. Askorbik asit'in diğer ülser modellerinde denenerek gastrik hasarları engelleyici ya da antiülserojenik etkisi hakkında daha detaylı bilgilere ulaşılabilir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen bulguların "IND ile oluşturulan gastrik hasarlarda 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 askorbik asit'in gastroprotektif çalışmalarda değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

6.KAYNAKLAR

1. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 2002; 519-766-778.
2. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PD, Hawkey CJ. Mechanisms of gastric and duodenal damage and protection. Hepatogastroenterol. 1992; 39: 31-36.
3. 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.
4. 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: 325-330.
5. Wallace JL, Granger DN. Pathogenesis of NSAID gastropathy: are neutrophils the culprits. Trends in Pharmacol. Sci. 1992; 13: 129-131.
6. Banerjee S, Hawksby C, Dahill S, Beattie D, Mc Coll KEI. Effects of *H. pylori* and its eradication on gastric juice ascorbic acid. Gut. 1994; 335: 317–322.
7. Davis GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvalo N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS. *Helicobacter pylorus* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. Gut. 1994; 32: 179–185.
8. Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, Reiter RJ, Swarnakar S. Hydrogen peroxide-mediated down regulation of matrix metalloprotease-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. Free Rad. Biol. Med. 2006; 41: 911–925.

9. Whittle BJR. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterol.* 1981; 80: 94-98.
10. Ito S, Lacy ER. Morphology of rat gastric mucosal damage, defense 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. *Am. J. Physiol.* 1992; 263 : G155–160.
13. Lanza LL, Walker AM, Bortnichak EA, Dreyer NA. Peptic ulcer and gastrointestinal hemorrhage associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use in patients younger than 65 years. *Arc. Int. Med.* 1995; 155: 1371–1377.
14. Taha AS, Sturrock RD, Russel RI. Mucosal erosions in long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug users: predisposition to ulceration and relation to *Helicobacter pylori*. 1995; *Gut.* 36, 334–336.
15. Isenberg JI, Mc Quaid KR, Laine L, Walsh JH. Acid peptic disorders. In: Yamada, T. (Ed.), *Text book of gastroenterology*, 2nd ed. JB Lippincott, Philadelphia, PA. 1995; 1347–1430.
16. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress induced gastric ulceration. *Free Rad. Biol. Med.* 1997; 23: 8-18.
17. Takuji M, Sato H, Hirose F, Doteuchi M., Effects of antioxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci.* 1987; 41: 755–763.

18. Hung CR, Neu SL, Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. *J. Nutr.* 1997; 127: 630–6.
19. Tarnasky PR, Livingston EH, Jacobs KM, Zimmerman BJ, Guth PH, Garrick TR. Role of oxyradicals in cold water immersion restraint induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 1990; 35: 173–7
20. Hye Kyung J, Kyung Eun L, Sang Hui C, Sun Young Y. *Helicobacter Pylori* infection reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J. Gastroenterol. and Hepatol.* 2001; 16: 1336–1340.
21. Itoth 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. *Mol. and Cell. Biochem.* 1993; 125: 115–125.
23. Hetil O. Mechanism of free radicals in gastrointestinal and liver diseases. *J. Clin. Biol.* 1993; 134: 675– 683.
24. 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.
25. Lutnicki K, Wrobel J, Ledwozyw A, Trebas-Pietras E. The effect of ethyl alcohol peroxidation processes and activity of antioxidant enzymes in rat's gastric mucosa. *Arc. Vet. Pol.* 1992; 32: 117–123.
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. Sanchez S, Martin 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.* 2002; 47 / 6: 1389-1398.
29. Vander 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, Linuma 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: 732-7.
31. Ukawa H, Yamakuni H, Kato S, Takeuchi K. Effects of cyclooxygenase- 2 selective and nitric-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs on mucosal ulcerogenic and healing responses of the stomach. *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43: 2003–11.
32. 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.
33. 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.
34. 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.

35. 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.
36. Tanaka J, Yuda Y. Lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rat. *Biol. Pharm. Bull.* 1996. 19: 716-20.
37. 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.
38. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 1997; 82: 291-295.
39. Matersson JA, Mehta T, Krauss AN, Auld PA, Meister A. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects of lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991. 89: 5093–5097.
40. 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 Rad. Biol. Med.* 1997. 23: 243–250.
41. Hirashi H, Terano A, Ota S *et al.* Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. *Gastroenterol.* 1994. 106: 1199–207.
42. 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.
43. Fornai M, Natale G, Colucci R, Tuccori M, Carazzina G, Antonioli L, Baldi S, Lubrano V, Abramo A, Blandizzi C, Del Taca M. Mechanisms of protection by

pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2005; 372: 79–87.

44. Barros MP, Sousa JPB, Bastos JK, Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 10:1016-1022.

45. Berenguer B, Sanchez LM, Quilez A, Lopez-Barreiro M, Haro O, Galvez J, Martin MJ. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 103: 194–200.

46. Brzozowski T, Kwiecien S, Konturek P, Konturek SJ, Ptak A, Mitis-Musiol M, Duda A, Bielanski W, Hahn EG. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med. Sci. Monit.* 2001; 7: 592-599.

47. O'Connor HJ, Schorah CJ, Habibzedah N, Axon ATR, Cockel R. Vitamin C in the human stomach: relation to gastric pH, gastro duodenal disease, and possible sources. *Gut.* 1989; 30: 436-442.

48. Halliwell BJ, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press. 1989; 280-370.

49. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62: 1315-1321.

50. Levine M, Dhariwal KR, Welch RW, Wang Y, Park JB. Determination of optimal ascorbic acid requirements in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62: 1347-56.

51. Rucker RB, Steinberg F. Vitamin C. *Encyclopedia of Biol. Chem.* 2004; 4: 367-371.

52. 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.

53. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *J. Nutr.* 2003; 2: 1-10.
54. Tuncer ŞD. Vitaminler: Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Ankara, Pozitif yayıncılık 2006; 117-118.
55. Fox PF, McSweeney PLH. Dairy Chemistry and Biochemistry. London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Yhomson Science 1998; 289-291.
56. İmİK H, Fidancı UR, Sel T. Ankara Keçisi oğlaklarında C ve E vitaminlerinin metabolik strese karşı etkisi. *Vet. Bil. Derg.* 1999; 15: 47-53.
57. 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.
58. Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border Membrane Vesicles. *J. Nutr.* 2000; 130: 63–69.
59. Rose RC, Choi JL. Intestinal absorption and metabolism of ascorbic acid in rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: 1238-41.
60. Olson JA, Hodges RE. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin C in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987; 45: 693-703.
61. Hughes DA. Dietary antioxidants and human immune function. *British Nutr. Founda.* 2000; 25: 35-41.
62. İmİK H, Aytaç M, Coşkun B, Fidancı H. Strese maruz bırakılan Ankara Keçisi oğlaklarında E ve C vitaminlerinin büyüme ve immünite üzerine etkileri. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* 2000; 24: 51-58.
63. 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.

64. 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.
65. Perdue SL, Thaxton JP. and Brake J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *J. Applied Physiol.* 1985; 58: 1511-1516.
66. 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.
67. 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 Biology & Medicine* 2006; 40: 1397–1408
68. Vatn S, Sjaastad OV, Ulvund MJ. Histamine in lambs with abomasal bloat, hemorrhage and ulcers. *J. Vet. Med.* 2000; 47: 251–255.
69. Sullivan M. and Yool DA. Gastric disease in the dog and cat. *The Vet. J.* 1998; 156: 91-106.
70. Halpern SL. Quick reference to clinical nutrition a guide for physicians. *America* 1979; 175-176.
71. 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.
72. Brendan JRW. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500: 427–439.

73. Villegas I, La Casa C, La Lastra CA, Motilva V, Herrerias JM, Martin MJ. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response. *Life Sci.* 2004; 74: 873–884.
74. 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 Rad. Biol. Med.* 2006; 40: 1397–1408.
75. 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.
76. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.* 2007; 59: 257-268.
77. Burke A, Smyth E, Fitz Gerald GA. In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Laurence L. Brunton, Ed.; Mc Graw-Hill Companies. New-York. 2006; 11. Baskı: 671 -717.
78. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am. J. Med.* 1999; 106: 37-42.
79. 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.
80. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2001; 15: 801-820.
81. Laine L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *J Pain Symptom Manage.* 2003. 25: 32-40.

82. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Feryal Matbaacılık Sanayi ve Tic Ltd Şti. 1997; 3. Cilt, 7.Baskı: 2818-2856.
83. 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.
84. Schmassmann A. Mechanisms of ülcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am. J. Med. 1998; 104: 43–51.
85. Dünder Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon, AKÜ. Yayın. 2000; 1-35.
86. Halliwell B. and Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 1984; 219: 1-14.
87. Weis SJ, LoBuglio AF. Biology of disease: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. Lab. Invest. 1982; 47: 5-18.
88. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. Seminars in Fetal & Neonatal Med. 2007; 1-9.
89. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoat K. and Xin W. Nutritional aspects of free radicals. Pro. Nutr. Soc. 1987; 46: 1-12.
90. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları. 1995; 1-80.
91. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. J Free Rad. Biol. Med. 1985; 1: 3-25.
92. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem. 1995; 41/12: 1819-1828.

93. 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.
94. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions . Mol. Biotechnol. 2007; 37:2-4.
95. Auroma O. Free radicals, antioxidants and international nutrition review. Asia Pacific J. Clin. Nutr. 1999; 8: 53-63.
96. Halliwell B. Tell me about radicals, doctor: a review. J. Royal Society of Med. 1989; 82: 747-752.
97. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90: 7915-7922.
98. 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.
99. Aslan R, Dündar Y. Bir fizyolojik eleman ve radikal olarak azot oksit. Hay. Araş. Derg. 1998; 8: 34-38.
100. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. Med. Sci. Monit. 1998; 4: 1089-1095.
101. 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.

102. 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.
103. 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.
104. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426.
105. Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Biochem. and Biophys.* 1978; 191: 351-357.
106. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Office J. Turk. Nephrol. Assoc.* 1997; 3-4: 92-95.
107. 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.
108. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free Radicals: The Pros and Cons of Antioxidants. *J. Nutr.* 2004; 134: 3143–3163.
109. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 4985–4994.
110. 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.
111. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England J. Med.* 1985; 312: 159-163.

112. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 -dioxygenase reaction. *J. Biol. Chem.* 1971; 25: 7825.
113. 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.
114. Ersoy A, Dilek K. Hemodiyaliz Hastalarında Eritrosit Membran Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidatif Homeostazis Değişiklikleri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg.* 1999;1:1-4.
115. Jana AK, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by ultrasound: Mechanism and implications. *J. Biosci.* 1990; 15: 211–215.
116. Li JM, Shah AM. ROS Generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 221–226.
117. Comporti M. Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 1985; 53: 599-623.
118. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letter.* 1991; 281: 9-19.
119. 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.
120. Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 8220-8226.
121. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Ann. Emerg Med.* 1986; 15: 1075-83.

122. 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.
123. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res*. 1999; 424: 83–95.
124. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr*. 1993; 57: 715-25.
125. Long CA, Bislskl HJ. Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species. *J. Phys. Chem*. 1980; 84: 555-557.
126. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik öemi. *Cerrah Paşa Tıp Derg*. 2004; 35: 140-149.
127. 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.
128. 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.
129. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicol*. 2002; 181-182: 219-222.
130. Epe B, Ballmaier D, AdamW, 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.
131. 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.

132. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroğlu M, Lunec J. Oxidative DNA Damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB J.* 2003; 17: 1195-1214.
133. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA Damage. *Carcinogenesis.* 2000; 21:361-370.
134. Knaapen AM, Güngör N, Schins RPF, Borm PJA, Schooten FJV. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis.* 2006; 21: 225–236.
135. Knaapen AM, Schins RPF, Polat D, Becker A, Borm PJA. Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells. *Mol. and Cellular Biochem.* 2002; 234/235: 143–151.
136. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J. Biol. chem.* 1969; 244: 6049-6055.
137. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64: 97-112.
138. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VGJ, Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Rad. Biol. Med.* 2006; 41: 1338–1350.
139. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: 1374-1377.
140. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extra cellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 280: 1-8.
141. Leclere V, Chotteau-Lelievre A, Gancel F, Imbert M, Blondeau R. Occurrence of two superoxide dismutases in *Aeromonas hydrophila*: molecular cloning and differential expression of the *sodA* and *sodB* genes. *Microbiol.* 2001; 147: 3105–3111.

142. Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 416-420.
143. Amorim AM, Gasques MDG, Andreus J, Scharf M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2002; 74: 433-436.
144. Kırkman HN, Gaetani GF. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984; 81: 4343-4347.
145. Kırkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 13908–13914.
146. Ścibior D, Cieczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* (online). 2006; 60: 170-180.
147. Palia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70: 158-69.
148. Pamukçu T, Sel T, Gül Y. Blood Serum concentrations of selenium and glutathione peroxidase activity in Akkaraman Sheep. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.* 2001; 25: 731-734.
149. Pioruńska-Stolzmann M, Batko J, Majewski W. Lipid profile, lipase and glutathione peroxidase activities in the serum of patients with atherosclerosis. *Med. Sci. Monit.* 1999; 5: 900-903.
150. Tsai AC. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in the liver of cholesterol-fed Rats. *J. Nutr.* 1975; 105: 946-951.
151. Van Haaften RIM, Haenen GRMM, Evelo CTA, Bast A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metabolism Rev.* 2003; 35: 215–253.

152. Thomas JP, Maiorinog M, Ursinis F, Girotti AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.* 1990; 65: 454-461.
153. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 27: 951–965.
154. Cecil BP. Glutathione S-transferases:Gene structure, regulation and biological function *Annu.Rev.Biochem.* 1989; 58: 743-64.
155. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence *Lancet.* 1994; 344: 721-724.
156. Stryer L. *Biochemistry Third Edition*, 1988; 437-439.
157. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*, Dikmen N, Özgünen T, Harper'ın *Biyokimyası*, İstanbul Barış kitabevi, 1998; 127-799.
158. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ. *Biyokimya*, Erzurum, Aktif yayınevi 2000; 348-470.
159. Siems WG, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism, *Clin Nephrol*, 2000; 53: 9-17.
160. Montgomery R, Conway TW, Specter AA. *Biochemistry*, Türkçe: Atlan N., *Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım*, Ankara, Palme Yayıncılık, 2000; 84-450.
161. Champe PC, Harvey RA. *Lippincott's Illustrated Review*, Türkçe: Tokulligil A, Dirican M, Ulukaya E. *Lippincott's Illustrated Reviews serisinden Biyokimya*, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1997, 300-350.
162. Odabaşoğlu F. Antioksidan vitaminler, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde verilen konferans kitapçığı, Erzurum, 8 Mart 1999.
163. Tariq M. Gastric anti-ulcer and cytoprotective effect of vitamin E in rats. *Res. Common Chem. Pathol. Pharmacol.* 1988; 60: 87-96.

164. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and carotenoids. *J. Am. Diet. Assoc.* 1996; 96: 693-702.
165. Bulucu D. Mide ülserlerinde melatonin antioksidan etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 1998.
166. Guidobono F, Ticozzi PC, Sibilio BF. and et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 581-586.
167. Alarcón de la Lastra C, Nieto A, Martín MJ, Cabré JF, Herrerías M, Motilva V. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rat: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm. Res.* 2002; 51: 051–057.
168. 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.
169. Aebi H. Catalase. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
170. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976; 71: 952-958.
171. Sun Y, Larry WO, Ying LA. simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34/3: 497-500.
172. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985; 113: 484-490.
173. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 1982; 78: 206-209.

174. Romay C, Ledon E, Gonzalez R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm. Res.* 1998; 47: 334-338.
175. Habig WH, Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. *Methods. Enzymol.* 1981; 77: 398-405.
176. Sedlak J, Lindsay RHL. Estimation of total, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968; 25: 192-205.
177. Church DF, Prior WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *EHP.* 1985; 64: 111-126.
178. Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. *Biochem. J.* 1991; 277: 133-138.
179. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358.
180. Szent-Gyorgyi A. CLXXIII. Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem.* 1928; 8: 1387-1409.
181. Zümreoglu-Karan B. The coordination chemistry of vitamin C: An overview. *Coordination Chem. Rev.* 2006; 250: 2295–2307.
182. Gross WB. Effects of ascorbic acid on stress and disease in chickens. *Avian Dis.* 1992; 36: 688-692.
183. Kurl S., Tuomainen TP., Laukkanen JA., Nyysönen K., Laka T., Sivenius J, Salonen JT. Plasma Vitamin C Modifies the Association Between Hypertension and Risk of Stroke. *Stroke.* 2002; 33: 1568-1573.

184. 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.
185. 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.
186. Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 1969; 4: 265-267.
187. Filaretova L, Tanaka A, Miyazowa T, Kato S, Takeuchi K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *Am. J. Physiol.* 2002; 283: 1082-1090.
188. Whittle BJR, Laszlo F, Evans SM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthesis and micro vascular injury in rat jejunum provoked by indomethacin. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 116: 2286-2290.
189. 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.
190. 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 Rad. Biol. Med.* 2007; 42: 510–518.
191. Eliot SN, Wallace JL. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can. J. Gastroenterol.* 1998; 12: 559-568.

192. 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. *Dig.* 1991; 49: 175-184.
193. Verspaget HW, Mulder TPJ, vander Sluys Veer A, Pena AS. and Lamers CBHW. Reactive oxygen metabolites and colitis; a disturbed balance between damage and protection. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991; 26: 44-51.
194. Smith SM, Kvietys PR. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Crit. Care Med.* 1988; 16: 892-898.
195. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993; 49: 481-493.
196. Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 1969; 4: 265-267.
197. 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.
198. 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: 2783-2790.
199. Basivireddy J, Jacob M, Ramamoorthy P, Pulimood AB, Balasubramanian KA. Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65: 683-695.

200. 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.
201. Halıcı M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakır A, Aslan A, Bayir Y. Effects Of Water Extract Of *Usnea Longissima* On Antioxidant Enzymes Activity and mucosal damage caused by İndomethacin In Rats. *Phytomed.* 2005; 12: 656-662
202. Franco L, Velo GP. A copper-complex reduced gastric damage caused by acetyl salicylic acid and ethanol. *Prostag. Other Lipid Mediat.* 1996; 51: 331-338.
203. 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.
204. 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.
205. Takeuchi K, Takehara K, Ohuchi T. Diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor, reduces indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Dig.* 1996; 57: 201-209.
206. Takeuchi K, Nishiwaki H, Niida H, Ueshima K, Okabe S. Duodenal ulcers induced by diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor in the rat: role of antioxidative system in teh pathogenesis. *Jpn J Pharmacol.* 1991; 57: 299-310.
207. 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 synthesize. *Free Rad. Biol. Med.* 2002; 32: 650-662.
208. 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.

209. 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.). *Bul. Pure and Appl. Sci.* 2001; 20: 79-88.

210. Hemler ME, Cook HW, Lands WE. Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 193: 340-345.

211. 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. *Dig.* 1997; 58: 340–351.

212. 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. Common.* 1997; 236: 275–279.

213. 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.

214. 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.

215. 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.

216. Gamiyangsa Y, Shin H.M. Anti-oxidative herbs and indomethacin-induced rat gastric mucosal lesions. *Am. J. Chin. Med.* 2001; 29: 101.
217. 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.
218. Stadler RH, Turesky RJ, Muller O, Markovic J, and Leong Morgenthaler PM. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res.* 1994; 308: 177-190.
219. Prestera T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak C, and Talalay P. The electrophilic counter attack responses: protection against neoplasia and toxicity. *Adv. Enzyme. Regul.* 1993; 33: 281-296.
220. Van Lieshout EMM, Peters WHM, and Jansen JBMJ. Effect of oltipraz, α -tocopherol, β -carotene and phenyl isothiocyanate on rat esophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1439-1445.
221. Aruna K. and Sivaramakrishnan VM. Plant products as protective agents against cancer. *Ind. J. Exp. Biol.* 1990; 28: 1008-1011.
222. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione S-transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 1988; 202: 343-361.
223. Hayes JD. and Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family; regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995; 30: 445-600.
224. 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.

225. Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. Lipid peroxidation induced by indomethacin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: involvement of indomethacin radicals. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 63: 2069-2074.

226. 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.

227. 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.

228. Robert A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterol.* 1975; 69: 1045-1047.

229. Harvison Pj, Egan RW, Gale PH, Christian GD, Hill BS, Nelson SD. Acetaminophen and analogs as cosubstrates and inhibitors of prostaglandin H syntheses. *Chem. Biol. Interact.* 1988; 64: 251-266.