MACLURA POMİFERA BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN POMİFERİN MADDESİNİN RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN GASTRİK HASAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İlyas BOZKURT

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mesut Bünyami HALICI

Yüksek Lisans Tezi – 2015

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MACLURA POMİFERA BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN POMİFERİN MADDESİNİN RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN GASTRİK HASAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İlyas Bozkurt

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mesut Bünyami HALICI

ERZURUM
2015

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MACLURA POMİFERA BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN POMİFERİN MADDESİNİN RATLARDA İNDOMETAZİN İLE OLUŞTURULAN GASTRİK HASAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İlyas BOZKURT

Tez Savunma Tarihi : 14 07 2015

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mesut Bünyami HALICI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ (Erzurum Teknik Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Özgür KAYNAR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Esra DİLEK (Erzincan Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **V**
ÖZET ..... **VI**
ABSTRACT ..... **VII**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VIII**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **X**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Mide Anatomisi 3
2.2. Midenin Yapısı 3
2.3. Midenin Fonksiyonları 4
2.4. Midenin Fizyolojisi 4
2.4.1. Mide Salgısı 4
2.4.2. Mide Salgıları ve Fonksiyonları 5
2.4.3. Mide Sekresyonunun Kontrolü 6
2.5. Ülser 7
2.5.1. Epidemiyolojisi 7
2.5.2. Etiyoloji 8
2.5.3. Non-Steroid Antiinflamatuar İlaçlar ve Hasar Oluşum Mekanizması 10
2.6. Midenin Ülser Savunması ve Mekanizması 11
2.7. Antioksidan Savunma Sistemi 13
2.7.1. Antioksidanlar 13
2.7.2. Serbest Radikal Kaynakları: 18
2.7.3. Serbest Radikallerin Etkileri 22
2.7.4. Antioksidan Savunma Sistemleri 26
2.8. Ülser ve Oksidatif Stres İlişkisi 36
2.9. *Maclura pomifera* 37
2.9.1. *Maclura pomifera'*nın Kimyasal Bileşeni 39
2.10. Pomiferin 39
3. MATERYAL VE METOT **41**
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 41
3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar 41
3.3. Deney Materyalinin Temini ve Etken Maddenin İzolasyonu 41
3.4. Deney Hayvanlarının Temini 43

3.5. Ratlarda İndometazin Uygulaması ile Deneysel Ülser Oluşturulması....43
3.5.1.Ülser Modeli 43
3.6. Mide Dokusunun Makroskopik İncelenmesi 45
3.7. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi 45
3.7.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması: 46
3.7.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları 46
3.7.3. Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Ölçümü: 49
3.7.4. Total Glutatyon (GSH) Miktarı Ölçümü:....50
3.7.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü:....51
3.7.6. Katalaz (KAT) Aktivitesinin Ölçümü:....52
3.8.İstatistiksel Analizler....53
4.BULGULAR....54
4.1. Makroskobik Analiz....54
4.2. Biyokimyasal Analiz....56
4.2.1. LPO Seviyesi 56
4.2.2. SOD Aktivitesi....57
4.2.3. GSH Seviyesi 58
4.2.4. KAT Aktivitesi....60
5.TARTIŞMA 62
6.SONUÇ VE ÖNERİLER....74
KAYNAKLAR 75
EKLER....101
EK-1. ÖZGEÇMİŞ 101
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU 102

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam boyunca yanımda olan, sınırsız desteklerini sunan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Mesut Bünyami HALICI hocama ve eş danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Esra DİLEK hocama en derin saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince yanımda olan ve öğrendiklerim konusunda büyük emeğe sahip, hem tez çalışmamda hem de bu çalışmayı başarıyla sonuca ulaştırmamda yardımlarını esirgemeyen Veteriner Biyokimya A.B.D' nın değerli hocalarından olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Serkan EROL' a, çalışmada kullandığım pomiferin maddesini saflaştırma ve tanımlamada büyük emeği olan Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR' a (Kilis 7 Aralık Üniversitesi), tez kapsamında deney hayvanlarının temini ve deneyin gerçekleştirilmesinde büyük emekleri olan Sayın ATADEM yönetimi ve değerli çalışanlarına, çalışmanın gerçekleşebilmesi için maddi desteklerini esirgemeyen, bu çalışmayı 213S114 nolu projeyle destekleyen TÜBİTAK' a, ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü ve çalışanlarına ve hayatım boyunca gerek aldığım kararlar gerekse eğitimim boyunca her zaman beni destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

İlyas BOZKURT

ÖZET

***Maclura pomifera* Bitkisinden İzole Edilen Pomiferin Maddesinin Ratlarda İndometazin ile Oluşturulan Gastrik Hasar Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Amaç: Daha önceki çalışmalarda *Maclura pomifera* bitkisinin su ekstresinin gastrik hasar üzerine etkili olduğu bildirilmiş, bu çalışmada ise bu etkinliğe sahip olduğu düşünülen pomiferin maddesi saflaştırılarak, ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine antiülser etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Metot: Çalışma için gerekli olan pomiferin *Maclura pomifera* bitkisinden İTK yöntemi ile saflaştırılarak, NMR yöntemi ile yapısı aydınlatıldı. Çalışma için, toplam 36 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat temin edilerek, 6'şarlı 6 gruba ayrıldı. REF grubuna 25 mg/kg ranitidin (Ulcuran® 25 mg/ml flakon), PMF-100 grubuna 100 mg/kg, PMF-200 grubuna 200 mg/kg, PMF-300 grubuna 300 mg/kg pomiferin ve sağlıklı grup hariç tüm gruplara 25 mg/kg indometazin uygulandı. Ratlar, uygulamadan 6 saat sonra sakrifiye edilerek, midelerinde milimetrik kağıt yardımıyla ülser alanı tespitleri yapıldı. Biyokimyasal olarak, mide dokularında LPO ve GSH seviyeleri ile SOD ve KAT aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular: Sağlıklı grupla karşılaştırıldığında; kontrol grubunda, ülser alanı, LPO seviyesi ve KAT aktivitesi önemli oranda artarken ($p<0.05$), SOD aktivitesi ile GSH seviyelerinin aynı oranda azaldığı görüldü ($p<0.05$). Artan ülser alanı, LPO seviyesi ve KAT aktivitesinin REF ve PMF gruplarında belirgin bir şekilde doza bağlı olarak düştüğü gözlemlendi ($p<0.05$), SOD aktivesi ve GSH seviyesinin rejenere olduğu bulundu ($p<0.05$).

Sonuç: *Maclura pomifera* bitkisinden saflaştırılan pomiferin maddesi indometazin ile indüklenen gastrik hasar üzerine etkili olduğu tespit edilirken, bu etkinin antioksidan sistem üzerinde oluşturduğu pozitif değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan sistem, indometazin, *Maclura pomifera*, pomiferin, ülser.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Pomiferin Substance Isolated from *Maclura pomifera* Plant on Indomethacin-Induced Gastric Damage in Rats

Aim: Previously, water extract of *Maclura pomifera* plant has been found effective on gastric damage. In this study, Pomiferin substance with possible curative activity was purified and its antiulcer effects were investigated on gastric damage induced by indomethacin in rats.

Material and Method: Pomiferin substance needed was purified from *Maclura pomifera* plant by TLC method and its structure was elucidated by NMR methods. For the study, a total of 36 Sprague Dawley male rats were purchased and they were divided into 6 groups (n=6 each). The 25 mg/kg indomethacin was administered orally to all groups, except healthy ones, and 25 mg/kg ranitidine (Ulcuran® 25 mg/ml vial) to REF group, 100 mg/kg pomiferin to PMF-100 group, 200 mg/kg pomiferin to PMF-200 group and 300 mg/kg pomiferin to PMF-300 group. Rats were sacrificed after 6th hours of administrations and ulcerative fields were identified in stomach via graph papers. Biochemically, LPO and GSH levels as well as SOD and CAT activities were measured in stomach tissues.

Results: Comparing with healthy group, in control group, it was observed that while ulcerative area, LPO levels and CAT activity increased significantly ($p<0.05$), SOD and GSH levels decreased simultaneously ($p<0.05$). It was observed that in REF group and PMF groups dose-dependently dropped the increased areas of ulcer, LPO levels and CAT activity ($p<0.05$), It was found that GSH levels as well as SOD activities significantly regenerated ($p<0.05$).

Conclusion: It was found that pomiferin purified from *Maclura pomifera* plant was effective on gastric injury induced by indomethacin. This effect was thought to be caused by positive changes in the antioxidant system.

Key Words: Antioxidant system, indomethacin, *Maclura pomifera*, pomiferin, ulcer.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP : Adenin Difosfat

ANOVA : One-Way Analysis of Variance

ATP : Adenozin 3'-trifosfat

BSA : Bovine Serum Albumin

CA : Karbonik Anhidraz

dk : Dakika

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DTNB : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik Asit)

EDTA : Etilendiamintetraasetik Asit

ETS : Elektron Taşıma Sistemi

EÜ : Enzim Ünite

FAD : Flavin Adenin Dinükleotid

GPO : Glutatyon Peroksidaz

GR : Glutatyon Redüktaz

GSH : Glutatyon

GSSH : Okside Glutatyon

GST : Glutatyon S-transferaz

HETE : Hidroksieikozatetraenoik Asit

HNE : 4-hidroksinonenal

HPETE : Hidroperoksieikozatetraenoik Asit

IND : İndometazin

İTK : İnce Tabak Kromatografisi

KAT : Katalaz

LPO : Lipid Peroksidasyonu

LT : Lökotrien

MDA : Malondialdehit

MP : *Maclura pomifera*

MPO : Miyelo Peroksidaz

µM : Mikro Molar

NAD^+ **:** Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NBT **:** Nitro Blue Tetrazolium

nm : Nano Metre

NMR **:** Nükleer Manyetik Rezonans

NSAİİ **:** Non-steroid Antiinflamatuar

PCO **:** Protein Karbonil

PG **:** Prostaglandin

PMF **:** Pomiferin

PPI **:** Proton Pompa İnhibitörü

REF **:** Referans

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

SDS **:** Sodyum Dodesil Sülfat

SOD **:** Süperoksit Dismutaz

TBA **:** Tiyobarbütirik Asit

UV **:** Ultra Viyole

XD **:** Ksantin Dehidrogenaz

XO **:** Ksantin Oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. Midenin anatomik görünümü 3
Şekil 2.2. Glutatyon'un molekül yapısı 33
Şekil 2.3. *Maclura pomifera* (Osage Orange) 38
Şekil 3.1. MDA miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik 49
Şekil 3.2. GSH miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik.....51
Şekil 4.1. Mide ülser alanlarını gösteren grafik 54
Şekil 4.2. Sağlıklı (A) ve Kontrol (B) gruplarına ait resimler.....55
Şekil 4.3. REF (C) ve PMF-100 (D) gruplarına ait resimler.....55
Şekil 4.4. PMF-200 (E) ve PMF-300 (F) gruplarına ait resimler.....55
Şekil 4.5. Mide dokusu LPO seviyelerini gösteren grafik.....57
Şekil 4.6. Mide dokusu SOD aktivitelerini gösteren grafik 58
Şekil 4.7. Mide dokusu GSH seviyelerini gösteren grafik 59
Şekil 4.8. Mide dokusu KAT aktivitelerini gösteren grafik 60

1. GİRİŞ

Günümüzde bilim ve teknolojinin ilerlemesiyle beraber birçok bilimsel çalışma hız kazanmıştır. Bu çalışmalar, hem insanların yeni şeyler öğrenmesine hem de daha iyi yaşam şartlarına kavuşmasına öncülük eder. Ayrıca bilinmeyen olguların bulmasında da önemli bir yere sahiptir. Bu doğrultuda genellikle bilimsel çalışmalar toplumda tedavisi mümkün olmayan birçok hastalığa çare olabilmesi için bitkisel tedavi yöntemlerine yönelmiştir. Bunlardan en yaygın olanı da mide ve duodenumda yayılan multifaktöriyel bir hastalık olan ülser hastalığıdır.

Ülser, genellikle mide mukozasında harabiyet oluşturan *Helicobacter pylori* ya da non-steroid antiinflamatuar ilaçlar tarafından kanama merkezi olabilen yara olarak ifade edilebilir.[1, 2] Sadece mide değil aynı zamanda tüm gastrointestinal sistemi etkileyecek şekilde hasar oluşturan bir hastalıktır.[3]

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ülserin patogenezi üzerine dokuda meydana gelen oksidatif stresin büyük önemi olduğu ve süperoksit, peroksit gibi çeşitli radikal türlerinin bu oluşumda görev aldığı gösterilmiştir.[4-7]

Günümüzde ülser tedavisi için geliştirilen birçok ilaç (anti asit, H_2 reseptör antogonisti, proton pompa inhibitörü) hastalığın seyrini düşürse de bu ilaçların kullanımı ülser için tam bir tedavi oluşturmamaktadır. Hatta sahip oldukları bazı yan etkiler ile ülserden daha tehlikeli sonuçlara sebebiyet vermektedirler.[8-11]

İnsanlığın en eski hastalıklarından biri olan ülser, eski zamanlardan beri halk tarafından yaygın bir şekilde bitkisel tedavi yöntemleri ile iyileştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda bilimsel araştırmalar alternatif tıbba doğru yönelmiş ve bazı çalışmalara konu olmuştur.[12]

Ülser gibi birçok hastalığı tedavi etmek için kullanılan bitkilerin içerdiği çeşitli moleküller izole edilerek etkileri belirlenmeye çalışılmış, antioksidan, antiinflamatuar, antibakteriyel, antiseptik vs. gibi birçok özelliği gösterilerek bu hastalıklar üzerine etkileri tespit edilmiştir.[3, 13, 14]

Bu doğrultuda yapılan bu çalışmada su ekstresinin antiülser etkisi[15] tespit edilmiş olan *Maclura pomifera* bitkisinden pomiferin maddesi saflaştırılarak, ratlarda indometazin ile oluşturulan ülser modeli üzerine etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

1.1. Mide Anatomisi

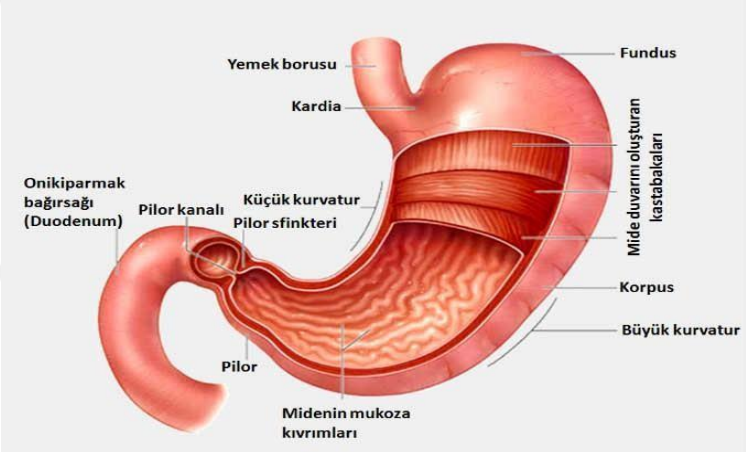
Mide, diyafram ile bağırsaklar arasında, karın boşluğunun üst kısmında yer alan sindirim sisteminin en geniş organıdır. Mide anatomik olarak dört bölüme sahip bir organdır.[16] Bu dört bölüm;

-Kardiyak bölümü

-Fundus bölümü

-Mide gövdesi (Korpus)

-Antrium ve Piloris bölümüdür.



Şekil 2.1. Midenin anatomik görünümü[17]

1.2. Midenin Yapısı

Mide fibromüsküler yapıda olup organın iç yüzü epitelle örtülüdür. Bu yapı salgı veya absorbsiyon görevlerine göre farklılıklar gösterir.[18] Mide histolojik yapısında başlıca yer alan tabakalar (dıştan içe doğru);

- Seroza: Midenin dış yüzüdür.
- Longitidunal kas tabakası
- Sirküler (dairesel) kas tabakası

- Submukoza: Sinirleri, lenfatikleri ve organı besleyen kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusudur.
- Mukoza: Derin olmayan katlanmaları (plikalar) içerir. Mide boşaldıkça bu katlanmalar derinleşir. Ayrıca, bu kıvrımlı tabakada tubuler tarzda bezler (gll.gastricae) bulunur. Bu bezler HCl (hidroklorik asit), sindirim enzimleri, intrinsik faktör ve mukus gibi ekzokrin salgı yaparlar.[18, 19]

Mide bezlerinde

- Esas (Zimojen) hücreler: pepsinojen
- Pariyetal (Okzintik) hücreler: HCl ve intrinsik faktör,
- Boyun mukus hücreleri: mukus,
- Enteroendokrin hücreler; serotonin, enteroglukagon ve histamin salgılarlar.[18]

şeklinde dört tip hücre bulunur.

1.3. Midenin Fonksiyonları

Midenin başlıca üç fonksiyonu vardır:

1. Yutulan besinleri depo etmek
2. Besin maddelerinin sindirimini sağlayan mide sıvısı ile karışmasını sağlamak
3. Besin maddelerinin sindirimini ve emilimin yapılabilmesi için uygun şekilde bağırsaklara iletmektir.[18]

1.4. Midenin Fizyolojisi

1.4.1. Mide Salgısı

Mide salgısı midenin mukoza tabakası basit tübüler bezlerden meydana gelen bir işlevdir. Mide mukozasında temelde 5 farklı hücre bulunur. Bunlar;

1) Mukus salgılayan tek katlı kolumner epitel hücreleri

2) Parietal hücreler

3) Esas (zimojen) hücreler

4) Boyun hücreleri ve

5) Anjentafin hücrelerdir.

Mukoza hücreleri rejenere olabilen bir yapıya sahip olup sürekli yenilenmektedir.[20, 21]

1.4.2. Mide Salgıları ve Fonksiyonları

a) Mukus Salınması

Yüzey ve boyun mukus hücreleri tarafından salgılanan mukus (müsin), mide asidine karşı koruyucu özellikte olup, midenin tüm yüzeyini sarar. Mukus, yüksek moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Bazı proteolitik enzimler ve etanol, metanol gibi çeşitli kimyasal ajanlar bu yapıyı parçalayabilirler.[22]

b) İntrinsik Faktör Salınması

İntrinsik faktör, pariyetal hücreler tarafından üretilen bir glikoproteindir. Vitamin B_{12}'nin ince bağırsaklardan emilimini sağlamada görev yapar. Eksik salgılanması veya otoimmünite sonucu işlevini yitirmesi anemiye yol açar.[23]

c) Mide Asidi (HCl) Salgılanması

Mide asidinin salgısı pariyetal hücrelerde gerçekleşir. Üretilmesinde yüksek derecede enerjiye ihtiyaç duyar. Ortalama bir litre mide sıvısı için 1200 cal enerji harcanır. Üretimi için karbondioksit (CO_2) gereklidir ve hücre içi ya da kandan difüzyon yoluyla sağlanır. Hücre içinde CO_2, karbonik anhidraz (CA) enzim aktivitesiyle su ile birleştirilerek karbonik asit (H_2CO_3) meydana getirilir. Ayrıca, hücre içinde suyun ayrışmasından dolayı hidrojen iyonu (H^+) ve hidroksil (OH^-) iyonu meydana gelir. Hidrojen iyonu salgı kanallarına gelirken, hidroksil ile karbonik asit birleşerek su ve

bikarbonat meydana getirir. Meydana gelen bikarbonat iyonu kandaki klor (Cl^-) iyonu ile aktif transport yoluyla yer değiştirir ve salgı kanalına taşınır. Hücrelerde oluşan bu hidroklorik asit (HCl) mide lümenine salınır ve çeşitli görevleri bulunmaktadır. Bu görevlerden en başta geleni inaktif pepsinojenin aktif pepsine dönüştürülmesidir. Buna ilaveten pepsin enziminin aktivitesi için gerekli olan pH'yı sağlar.[18, 20]

1.4.3. Mide Sekresyonunun Kontrolü

Mide salgısı, mide boş olduğunda da devam eder. Ancak, çok az miktarda olup, az miktarda HCl ve pepsinojen içerir. Bu aşamaya bazal sekresyon adı verilir. Asıl önemli düzeyde salgılama sindirim sırasında gerçekleşir.[20]

Mide asidi ve pepsinojen ile gastrin, histamin, somatostatin ve prostaglandin gibi salgılar, sinirsel ve hormonal olarak iki yolla kontrol edilir. Bu olaylar 3 fazda düzenlenir. Sinirsel kontrol ile salgılamanın meydana gelişi hızlı olur fakat kısa süre devam eder. Besini görmek, koklamak gibi duyusal uyarımlar vagus siniri aracılığı ile mide sekresyonunu arttırır. Vagus siniri, asetilkolin salgılayarak bu etkiyi gerçekleştirir.[24] Bu fazlar:

1- Sefalik faz: Besin alımı gerçekleşmeden meydana gelir.

2- Gastrik faz: Besin alımı gerçekleştiğinde mide bezleri iki yoldan uyarılır.

a) Besin alımı sonucu midenin genişlemesi gastrin hormonunun salgılanmasına neden olur. Salgılanan gastrin, kana geçerek fundus ve korpus bölgelerinde bulunan bezlere ulaşır ve salgıya neden olur.

b) Besinin içerdiği bazı maddelerin (kısmen sindirilmiş proteinler, etil alkol, kafein vs. gibi) salgılanmasına neden olurlar.[24]

3- İntestinal faz: Duodenuma ulaşan besinlerin sindirimi ve emilmesi az miktarda intestinal kaynaklı gastrin salgılanmasına neden olur. Parçalanan protein rezidüleri bu intestinal gastrinin daha fazla miktarda kana geçmesine ve mideye

ulaşması sonucu sekresyonunun artmasına neden olur. Fakat duodenuma gelen asitli kimüs, buradan sekretin ve kolesistokinin hormonlarının salgılanmasını sağlar. Bu hormonlar kan yoluyla mideye ulaşması sonucunda sekresyonu inhibe ederler. Buna rağmen bazı durumlarda sekretin azalan pepsin miktarını da arttırabilir.[25]

Mide sıvısı pH' sı 2'nin altına indiğinde, gastrin salgı meknizmasını inhibe olur. Bu etki pH' nın çok fazla düşerek antrum mukozasından "somatostatin" hormonunun salgılanmasına sebep olur.[25]

1.5. Ülser

Ülser; mide ve duodenumda meydana gelen multifaktöriyel-kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığı meydana getiren faktörler, asit salınımı ve koruyucu mukoza bariyerindeki bozukluklara ek olarak genetik yatkınlık (irsiyet), stres, kortizon türü ilaçlar, aspirin ve indometazin (İND) gibi NSAİİ (Non steroid antienflamatuvar ilaçlar)' ler, *Helicobacter pylori*, Herpes Simplex virüsü (Tip I / HSV–1) ile sigara ve alkol kullanımıdır.[26]

1.5.1. Epidemiyolojisi

Tüm dünyada yaygın bir şekilde görülen, iş gücü ve maddi kayıplara sebep olan ülser, tarihi çok eski olmasının yanısıra önemli hastalıkların başında gelir.

Günümüzde tarihi kalıntılarda yapılan kazılar sonucu bulunan mumyalar incelendiğinde, bu mumyaların ölümlerine neden olduğu düşünülen ülser bulgularına rastlanmıştır.[27] İlk görüldüğü zamanlarda pek çok ölüme neden olmuş hastalıklardan biri olan ülser, şuan tedavi edilebilir bir hastalık olsa da, insan sağlığı açısından önemli bir yer tutmaktadır.[12]

İnsanlarda çok fazla rastlanılan hastalıklardan biri olan ülser, her yaşta görülebilir. Nispeten düşük sayılabilecek mortaliteye sahip olmasına rağmen çoğu

zaman ömür boyu ilaç kullanımını gerektirebilir.[12] Bu sebeple hastalığın insanlara hem maddi hem de manevi yükü fazladır. ABD'de yılda 500.000 yeni vaka gözlenirken, nüks 4-4.5 milyon civarındadır.[22] Bu değerler göz önüne alındığında, ülkemizde sadece bir yılda 120 bin yeni bir vaka ve yaklaşık 1 milyona kişide tekrarlayabileceği hesaplanabilir. Yapılan istatistiksel analizlere göre bir kişinin bir yıl içinde ülsere yakalanma riski % 1.8 olarak belirtilmiştir.[28] Yine, hayat boyu ülser hastalığının meydana gelme olasılığı erkekler için yaklaşık % 14, kadınlar için ise % 11 olduğu bildirilmiştir.[29]

Mide hasarının oluşmasının birçok nedeni olmakla beraber yağ, karbohidrat ve protein içeren besin maddelerinin alınması ve çevresel stres yapıcı ajanların etkisinin de rolünün olduğu düşünülmektedir.[30] Aynı zamanda beslenmenin ve parazitik faktörlerin gastrik hasar oluşumunda etkili oldukları gözlenmektedir.[31]

1.5.2. Etiyoloji

a) Yaş:

Genellikle mide ülseri yaşlılarda, duodenum ülseri ise gençlerde daha sık gözlenir. Ülkemizde görülen mide ülserinin insidansı 30 ile 60 yaş arasında artarken, duodenum ülserlerinin insidansı 20-50 yaşları arasında artmaktadır.[32]

b) Sosyoekonomik etkenler:

Sosyoekonomik düzeyler, şehir ve sosyal hayat dikkate alındığında kırsal kesimde, kendi işinde yalnız çalışan, çiftlik ve köy gibi düşük yaşam standartlarında yaşayan insanlarda mide ülserleri, yüksek yaşam standartları olan kalabalık şehirde yaşayan insanlarda ise duodenum ülserleri, daha sık görülmektedir.[33]

c) Diyet:

Geçmişten günümüze, süt ve süt ürünleri ülser sağaltımında kullanılmasına rağmen, içerdikleri yüksek oranda kalsiyum nedeniyle mide asit salgısını arttırdığı belirtilmiştir.[33]

d) Alkol:

Mide mukozası % 10 ve altındaki konsantrasyonda alkol içeriklerini tolere edebilirken, % 20'nin üstündeki konsantrasyonlarda hasar ve onarım mekanizmalara devreye girmektedir.[34]

e) Stres ve Psikolojik faktörler:

Ülser ve sinir sistemi ilişkisi birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Ayrıca, beyin ile bağırsak arasındaki nöral ilişki ve bunlara stresin etkisi araştırılmıştır.[35, 36] Deney hayvanları üzerinde yapılan stres çalışmalarının ülsere neden olduğu bildirilmiştir.[37]

f) İlaçlar:

Ülser oluşumunda en önemli faktörlerden biri kuşkusuz ilaçlardır. Geçtiğimiz 30 yılda antiinflamatuarların gelişmesiyle kullanımı yaygınlaşmış, bunun sonucu olarak yan etkilerinin görülme sıklığı da artmıştır. ABD'de bu nedenle yıllık yatan hasta sayısı 200.000 ile 400.000 gibi rakamlara ulaşmıştır.[38] İlaç teknolojisinin gelişimiyle yan etkilerinin azaldığı düşünülse de endoskopik muayenelerde düzenli NSAİİ alan kişilerin % 30 ile 50'sinde ülser tespit edildiği bildirilmiştir.[39, 40] Asetilsalisilik asit (Aspirin) kullanan kişilerin mide ülseri prevalansı % 20 ve duodenal ülser prevalansı % 5 olduğu bildirilmiştir.[41] Hastaneye gastrointestinal kanama ile başvuran kişilerin yaklaşık % 50'si, sıklıkla aspirin ya da NSAİİ kullandıklarını belirtmişlerdir.[33]

g) Sigara:

Yapılan çalışmalara göre, duodenal ülseri bulunan hastalardan sigara içenlerde iyileşmenin, içmeyenlere göre daha uzun sürdüğü ve nüks görülme oranının arttığı bildirilmiştir.[33]

h) Ek hastalıklar:

Zollinger-Ellison Sendromu, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), Siroz, Kronik böbrek yetmezliği gibi hastalıklar mide ve duodenum ülserlerinin meydana gelme olasılığını artırdığı belirtilmiştir.[33, 42, 43]

1.5.3. Non-Steroid Antiinflamatuar İlaçlar ve Hasar Oluşum Mekanizması

Mide ülseri, sıklıkla asit salgılamayan antrium mukozasında meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra pepsin, safra asitleri, hipertonik üre, sodyum hidroksit, HCl, etanol, NSAİİ' lar gibi farklı etkiler göstererek ülsere neden olan ajanlar mide mukoza savunmasının bozulmasında rol alarak ülser oluşumuna sebebiyet vermektedir.[18, 44]

Bu ajanlardan en fazla ülsere sebep olan NSAİİ, etkilerini hem lokal hem de sistemik olarak gösterdiğinden gerek ülser oluşumunda gerekse yan etkilerin meydana gelmesinde daha çok sistemik yol etkilidir.[45]

NSAİİ' lerin mide mukozasındaki etkileri hem direkt hem de siklooksijenaz inhibisyonu ile olmaktadır. Üretiminde siklooksijenaz enziminin görev aldığı, mide mukozasında bulunan prostaglandinler (PG), histamin tarafından düzenlenen mide salgısını inhibe ederler.[46] Aynı zamanda mukozada, mukus ve bikarbonat yapımı ile mukoza kan akımını arttırırlar. Bundan dolayı PG E_2, Prostasiklin (PGI_2), ve PG F_2-α mide mukozası savunmasında önemli rol oynarlar. Birçok çalışmada PG'lerin alkol,

stres, aspirin ve indometazinin (IND) zararlı etkilerinden mukozayı koruduğu ve ülser meydana gelen durumlarda PG sentezinin inhibe olduğu gösterilmiştir.[47]

Siklooksijenaz enziminin inhibe edilmesi koruyucu PG'lerin miktarının düşmesine ve araşidonik asit metobolizmasının lipoksijenaz yoluna kaymasına sebep olur. PG'ler ve lökotrienler (LT), araşidonik asit metabolizması ürünleri olmalarına rağmen mide mukozası üzerine ters etki gösterirler.[48] Bu olayın meydana gelmesi ile Hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE), Hidroksieikozatetraenoik asit (HETE) ve LT'lerin üretiminde artış meydana gelir ve bunlar mide mukozasını olumsuz etkiler. İnflamatuvar ajanlardan olan LT'lerin, mukozal hasarı artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle lipooksijenaz enziminin inhibisyonu ile LT üretiminin azalmasını ve mide mukozasının korunmasını sağlayabilmektedir.[49, 50]

Etanol, mide mukozasında LT miktarını artırmaktadır. Buna bağlı olarak LTC4 ve LTD4 sentezinin inhibisyonu, mide mukozasında etanol gibi ülserojenler tarafından meydana getirilen hasarı engelleyebilmektedir. Ayrıca NSAİİ'lerin sebep olduğu mide ülserleri, LT antagonistleri ve lipoksijenaz inhibitörleri kullanılarak azaltılabilmektedir.[50] NSAİİ hem PG sentezini inhibe ederler hem de mukoza kan akışında, aktif iyon transportunda ve mukoza permeabilitesinde değişiklik meydana getirerek hasar oluştururlar. Bu etkiler mide mukoza savunmasının açıklanmasıyla daha iyi anlaşılabilir.[51]

1.6. Midenin Ülser Savunması ve Mekanizması

Mukus tabakası ile mide epitel hücreleri tarafından salgılanan bikarbonat, mukus tabakasının üzerinde mide asidini nötralize edecek şekilde sarar. Ayrıca mide mukoza hücreleri tarafından üretilen PG'ler de mukoza savunmasını oluşturan önemli bir faktördür.[18]

Mide mukoza savunması;

1) Preepitelyal
2) Epitelyal
3) Postepitelyal olmak üzere üç kategoride sınıflandırılır.[40, 52, 53]

1- Preepitelyal mekanizma: Bikarbonat ve mukus salgılayarak mide mukozasını sarar ve korunmasını sağlar. Bikarbonat, epitelyum hücrelerinden salgılanır. Indometazin (IND) ve asetilsalisilik asit gibi NSAİİ'ler mide mukus salgısını inhibe ederler.[54]

Kolinerjik ajanlar, PG ve lümen içi asit miktarıyla ilgili olarak bikarbonat salgı düzeyi artarken, histamin ve gastrin ile salınım etkilenmez. Bu doğrultuda mide mukozasındaki NSAİİ' ler bikarbonat salınımını da azaltır.[55, 56]

2- Epitelyal mekanizma: IND, mide mukozasında bazal ve düzenlenmiş mide sıvısı salgısını artırdığından hasar meydana getirir.[56] NSAİİ'lerin büyük kısmı mukoza bariyerini oluşturan hücrelerin membran permeabilitesini değiştirirler ve mukozada hasar meydana gelmesine neden olurlar. PG'ler ve bunların çeşitli analogları mukozanın negatif elektrik potansiyelini arttırdığından H^+ geri difüzyonunu azaltırlar.[40, 52, 53, 57]

3- Postepitelyal mekanizma: Mukozaya gelen kan akışındaki azalma hücrelerin işleyişinde önemli enerji kaynağı olan ATP miktarında azalmaya sebep olur. Mukoza hücrelerinin kapiller damarları arasında H^+ iyonu alış-verişi kolaylıkla gerçekleşir. Fakat IND gibi NSAİİ'ler, mukoza kan damarlarında daralmaya neden olduğundan kan akışını engeller ve iyon transportunu yavaşlatır.[55, 58] Bu nedenle mide mukozasında meydana gelen hasar önlenemediği gibi gelişim sıklığı da artmaktadır.[55]

1.7. Antioksidan Savunma Sistemi

1.7.1. Antioksidanlar

Serbest radikaller, orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom ya da moleküllerdir.[59] Atomların orbital bölgelerinde en çok iki tane ve birbirlerine zıt bir konumda elektronlar bulunmaktadır. Geçiş metalleri olarak bilinen demir, bakır, mangan gibi atomlar yörüngelerinde birer elektron bulundurmalarına rağmen, radikal özellik göstermezler. Ancak bazı atom grupları (nitrit dioksit, nitrik oksit) bir orbitalinde tek bir elektron taşıdıkları için radikal özellik gösterebilirler.[3] Serbest radikaller üç yolla meydana gelir.[60]

1) Homolitik bağın ayrılması ve bir elektronun bir molekülden diğerine transfer edilmesi sonucu oluşan serbest radikallerdir. En yaygın görülen serbest radikal oluşumu homolitik bağın ayrılmasıdır.

$$X : Y \rightarrow \cdot X + Y\cdot$$

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

$$X : Y \rightarrow X:^{-} + Y^{+}$$

3) Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu da serbest radikaller oluşur.

$$A + e^{-} \rightarrow A\cdot^{-}$$

Canlılarda radikal sağlayan en büyük kaynak oksijendir. Bunun sebebi, oksijen atomunun orbitallerinde eşleşmemiş bir elektron çiftinin bulunmasıdır. Sahip olduğu bu özellik ile oksijen, diğer serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girebilirken, radikal

olmayanlarla daha zor reaksiyona girebilirler. Aerobik (oksijenli) solunum yapan canlılar, oksijenin bu özelliklerinden dolayı serbest radikallerin en fazla meydana geldiği canlılardır. Bu nedenle enerji üretiminde oksijen kullanımı nedeniyle serbest radikallerin etkilerine en çok maruz kalan aerobik canlılardır.[61]

Serbest radikal çeşitleri:

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$): Süperoksit radikali, moleküler oksijenden bir elektron koparak indirgenmesiyle meydana gelir.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$$

Neredeyse tüm aerobik hücrelerde bulunan süperoksit radikali eozinofil, makrofaj, monosit, ve nötrofil gibi immün sistem hücreleri tarafından üretilerek de radikal oluşumu artabilmektedir.[61]

Süperoksit radikalleri hasar oluşumunda düşük oranda görev alsa da meydana getirdikleri asıl hasar hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksil (HO_2^-) radikallerinin oluşumunda görev almasıyla gerçekleşir. Süperoksit radikalleri, bu iyonların ve geçiş metallerinin indirgeyicisi olarak görev alır.[62]

İki adet süperoksit radikali ile hidrojen peroksit meydana gelir.

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$HO_2^{\cdot} + O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Peroksi nitrit, süperoksit radikali ile nitrik oksit radikalinin birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlamaları sonucu meydana gelir.[63]

$$O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^-$$ (peroksinitrit)

Hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$), süperoksit radikali ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan oluşturmaktadır.[64]

$$O_2^{\cdot -} + HOCl \rightarrow {\cdot}OH + Cl^- + O_2$$

Hem indirgeyici hem de yükseltgeyici özellik gösteren süperoksit anyonu, adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamin gibi çeşitli yapılardaki metabolitleri oksitler. Nitrobluetetrazolium ile sitokrom c'yi indirgerken, ferrisitokrom c bir elektron kaybederek okside olur. Oksidan olarak ise epinefrinin oksidayonunda bir elektron alırak H_2O_2 indirgenir.[65] Ayrıca geçiş metalleri otooksidasyona uğrayarak da süperoksit radikali oluşabilmektedir.

$$Fe^{+2} + O_2 \rightarrow Fe^{+3} + O_2^{\cdot -}$$

$$Cu^{+} + O_2 \rightarrow Cu^{+2} + O_2^{\cdot -}$$

Yukarıdaki redoks reaksiyonları geri dönüşümlü olup serbest radikal oluşumunu hızlandıran önemli reaksiyonlardır.[65]

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Moleküler oksijen asidik bir ortamda iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron kazanması ile hidrojen peroksit meydana gelir.[66]

$$O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Hidrojen peroksitin biyolojik sistemlerdeki asıl kaynağı, süper oksit radikali oluşturan kaynak bir reaksiyonda üretilen radikalin dismutasyon reaksiyonudur. Bunlara ek olarak, ürat oksidaz, glukoz oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler, oksijene 2 elektron kazandırarak H_2O_2 oluştururlar.

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Kendi başına bulunan hidrojen peroksit zayıf bir oksidan özellik gösterir. Çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir. Oluşan H_2O_2, uygun koşullarda hücreler tarafından kofaktör olarak selenyumu kullanan glutatyon peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından yok edilebilir. Serbest bir radikal olmayan H_2O_2, serbest

radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Bunun nedeni, Fe ve Cu gibi geçiş metalleri bulunduğu ortamda süperoksit radikalleri ile reaksiyon verirler ve hem reaktif, hem de en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturarak kolayca yıkılırlar.[66]

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow OH + OH^- + O_2$$

Yukarıda anlatılan bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak tanımlanır. Haber-Weiss reksiyonu, katalizörlü veya katalizörsüz olarak iki şekilde oluşabilir. Fakat katalizör yokluğunda çok uzun sürede gerçekleşir. Bu reaksiyon sırasıyla, ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenmesi ve sonrasında ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonuyla hidrojen peroksitten ·OH ve OH^- üretilmesi şeklinde gerçekleşir.[23, 67] Reaksiyon aşağıdaki şekildedir.

$$Fe^{+3} + O_2^{\cdot -} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \cdot OH + OH^-$$

Hidroksil radikali (·OH): Hidroksil radikalleri, suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılması ve fenton reaksiyonu sonucu oluşan güçlü bir radikal türüdür. Özellikle organik moleküllere affinitesi olan, etkili oluduğu bölgede büyük hasar oluşturan, enerjisi yüksek bir oksidandır.[68]

$$H_2O \rightarrow \cdot OH + H\cdot + e^- \rightarrow H_2O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \cdot OH + OH^-$$

Hidroksil radikali birçok biyolojik molekülden hidrojen atomu koparabilir, bunlara tiyoller de dahildir.

$$R\text{-}SH + \cdot OH \rightarrow RS\cdot + H_2O$$

Hidroksil radikalinin en iyi bilinen hasarı lipid peroksidasyonu (LPO) meydana getirmesidir. Bu olay, membrana yakın bir yerde meydana gelen hidroksil radikallerinin membran fosfolipid zincirlerine saldırmasıdır. Hidroksil radikalinin doymamış çift zincir içeren yağ asitlerine daha ilgili olduğu bilinmektedir.[69, 70]

Singlet Oksijen ($^1O_2$): Eşleşmemiş elektrona sahip olmayan singlet oksijen, bir serbest radikal değildir. Fakat orbitalinde içerdiği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer ROS ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen, fotokimyasal reaksiyonlar içinde oldukça önemli bir yer tutar.[71, 72]

Nitrik oksit (NO) ve azot dioksit (NO_2): Eşlenmemiş elektrona sahip olan nitrik oksit ve azot dioksit birer radikaldirler. Oksijen ile nitrik oksidin reaksiyona girmesi sonucu azot dioksit meydana gelir ve oluşan bu bileşik çok zehirli ve güçlü bir oksidandır. Araşidonik asit metabolizması oksijen redüksiyonu sırasında NO_2'ye maruz kalması konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Düşük miktarda NO_2'nin bu metabolizmayı büyük oranda artırdığı belirtilmiştir.[60, 66, 73]

Nitrik oksit, L-arginin amino asidi ile *in vivo* şeklinde üretilmektedir. NO kokusuz, renksiz ve az indirgenebilen oksidan bir gazdır. Nitrik oksidin sahip olduğu eşlenmemiş elektronlar süperoksit, tiyol grupları ve azot dioksit ile seri reaksiyonlar meydana getirmektedirler. Bu radikallerin diğer radikaller ile birlikte diabetes mellitus, septik şok, kalp bozuklukları, Alzheimer hastalığı ve gastrik hasar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.[60, 66, 74]

$$2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2 \text{ ya da } NO + O_2 \rightarrow NO_2$$

$$O_2^{\cdot -} + NO \rightarrow ONOO^- \text{ (peroksinitrit)}$$

$$ONOO^- + H^+ \rightarrow \cdot OH + NO_2$$

Diğer Serbest Radikaller:

Serbest oksijen radikallerinin kaynağını oluşturduğu karbon merkezli radikaller ($R^{\cdot}$), peroksil radikalleri ($ROO^{\cdot}$), alkoksil radikalleri ($RO^{\cdot}$), tiyol radikalleri ($RS^{\cdot}$) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelebilir. Polidoymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun bir radikaldir. Tiyol radikalleri de tekrar oksijenle reaksiyona girerek sülfenil ($RSO^{\cdot}$) veya tiyol peroksil ($RSO_2^{\cdot}$) vb. gibi radikalleri meydana getirebilirler.[72]

1.7.2. Serbest Radikal Kaynakları:

Serbest radikaller canlıda normal yaşam koşullarında metabolizma işleyişi sırasında oluşabildiği gibi çeşitli çevresel faktörler ile de oluşabilmektedir. Bunlardan en önemlileri stres ve hastalıklardır. Bu nedenle serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır.[3]

Eksojen radikal kaynakları:

- İlaç oksidasyonları
- Radyasyon
- Güneş ışığı, UV-ışınları
- Sigara dumanı, egsoz gazları
- Kükürtdioksit
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliğine sebep olan fotokimyasal maddeler, hiperoksit, pestisitler, solventler, anastezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotikler.
- Stres: Stresin katekolamin düzeyini artırmasına ilave olarak artan katekolamin oksidasyon reaksiyonları ile serbest radikal oluşumu gözlenir.[75-77]

Endojen radikal kaynakları:

a. Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Normal ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiyopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon reaksiyonları ile serbest radikalleri oluştururlar.[76, 78]

b. Enzimler ve proteinler: Çoğu enzimin aktivitesi sırasında serbest radikaller meydana gelir. Ksantin oksidaz (XO), aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, serbest radikal meydana gelmesinde rol oynarlar.[75]

Ksantin oksidaz aktivitesini, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)-bağımlı dehidrogenaz olarak gösterir ve serbest radikal üretimi gerçekleştirmez. Fakat *in vivo* olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. XO enzimi, oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürata oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir.[79, 80]

$$\text{Hipoksantin} + 2O_2 \rightarrow \text{Ksantin} + 2O_2^{\cdot -} + 2H^+$$

$$\text{Ksantin} + 2O_2 \rightarrow \text{Ürat} + 2O_2^{\cdot -} + 2H^+$$

Yukarıdaki tepkimelerle oluşan süperoksit radikallerinin ortaya çıkardığı en büyük hasar vasküler sistemdedir. Bunlara ek olarak yapılan çalışmalarda XO enziminin bağırsak, akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda da hasara neden olduğu bildirilmiştir.[81, 82]

Ksantin oksidaz, normalde NAD^+ bağımlı dehidrogenaz olarak görev yapar ve herhangi bir serbest radikal meydana getirmez. Fakat iskeminin akut fazı sonrasında hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası oluşturma eğilimine girer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış proteaz enzimlerinin miktarının artması durumunda bile devam eder.[60]

$$\text{Ksantin} + H_2O + NAD^+ \rightarrow \text{ürik asit} + NADH + H^+$$

$$\text{Ksantin} + H_2O + 2\ O_2 \rightarrow \text{Ürik asit} + 2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+$$

XD

$Ca^{++}\downarrow$

XO

$$\text{Hipoksantin} \rightarrow O_2^{\cdot -} + H_2O_2 + \text{Ürat}$$
$$\uparrow$$
$$O_2$$

Bu süreçte hücre, ksantin dehidrogenazın (XD) XO'a dönüşümüne olanak sağlar. Hücre içi bu süreç sonunda süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) radikalinin üretimi gerçekleşir. Meydana gelen süperoksit radikalleri hızlı bir şekilde hidrojen peroksite dönüşür. Hidrojen peroksit, güçlü bir radikal olmasa da Fe^{+2} varlığında fenton reaksiyonu oluşturarak güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur.[60, 83]

Aldehit oksidaz, yapı itibariyle XO'a benzer ve substratlarının çoğunu da aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler.[84]

c. Mitokondriyal elektron taşınması: Hücrenin doğal yaşam sürecinde serbest radikallerin ana kaynaklarından biri Elektron Taşıma Sistemi'nden (ETS) sızan elektronlardır. Mitokondriyal ETS'de meydana gelen sızıntı iki yerden kaynaklanır. Birinci olarak, nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen (NADH)-dehidrogenaz basamağında, ikinci olarak da ubikinon basamağında koenzim Q'ya elektron sızması görülmektedir. ETS'nin son basamağında elektronların O_2'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi, oksijenin % 97-99'unu harcayarak suya indirger. Fakat O_2'nin % 1-3'ü, elektron transport zincirinde meydana gelen sızıntıdan ortaya çıkan elektronlarla birleşerek süperoksit radikalinin üretimini gerçekleştirir. Bu şekilde NAD^+ bağlı substratlar, süksinat, adenozin difosfat (ADP) ve oksijen gibi endojen

faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretimine etki eder.[70]

d. Endoplazmik retikulum ve nüklear membran elektron transport sistemleri: Endoplazmik retikulum ve nüklear membranda ise serbest radikal üretimimembrana bağlı sitokromların oksidasyonu sonucunda meydana gelir. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve b_5, doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları ise okside ederler.[85]

e. Peroksizomlar: Peroksizom hücre içinde çok önemli bir hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu organeldeki D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açil-CoA oksidaz gibi oksidazlar $O_2^{\cdot-}$ üretmeden, aşırı seviyede H_2O_2 üretimine sebep olurlar. Fakat katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir.[75]

f. Plazma membranı: Hücreyi saran plazma membranı serbest radikalüretimi için çok önemli bir yer arz etmektedir. Hücre dışında üretilen serbestradikallerin, diğer hücre elemanlarına ulaşmasından önce plazma membranını geçmesi gerekir. Bugeçiş sırasında membranda toksik reaksiyonların oluşmasına da neden olabilirler. Membran yapısını oluşturan fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler ve membran proteinleri serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Bu etkilenme sonucu meydana gelen LPO veya yapısal proteinlerin oksidasyonu ile membran permabilitesinde bozulmalar meydana gelmektedir.[86]

Hidrojen peroksit, hücre membranlarını kolay geçebilen güçlü oksidandır. Bu sebeple proteinlerin ve lipidlerin hidrofobik kısımlarını daha iyi parçalayabileceği ve toksik etkisinin daha fazla olacağı tahmin edilmektedir. Serbest radikallerin

nonfagositik hücre membranlarında NADPH-oksidaz aracılığı ile üretiminin serbest radikal oluşumunun önemli bir kaynağı olarak görülmektedir.[87]

Mikrozomlar tarafından serbest radikal üretimi, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi plazma membranıyla bağlantılı enzimler ve bu enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asit metabolizması ile ilişkili pek çok yeni keşif, önemli biyolojik ürünlerin meydana gelmesinden dolayı ilginçtir. Bu ürünler prostaglandinleri, tromboksanları, lökotrienleri ve anaflaksinin slow-reakting substratını (SRS-A) içerir.[48]

Serbest radikal üretimini bazı toksik maddeler artırabilir. Bu maddeler dört gruba ayrılır.[75, 88]

1) Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.

2) Toksin bir serbest radikale metabolize olabilir. Örneğin karbontetraklorür (CCl_4) toksik bir maddedir ve karaciğerde sitokrom P–450 tarafından triklorometil (CCl_3) serbest radikaline dönüştürülür. Bu radikalin oksijenle reaksiyona girmesi neticesinde meydana gelen peroksil radikali güçlü LPO başlatıcısıdır.

3) Toksinin metabolizması sonucunda serbest oksijen radikali oluşur. 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.

1.7.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, önemli etkilerini canlı hücreler için hayati olan DNA, yağlar ve proteinlere saldırarak gösterirler. Bunun bir sonucu olarak meydana gelen yapısal ve

metabolik değişiklikler, çeşitli hasarların ve hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır.[89, 90]

Membran lipidleri üzerine etkileri: Serbest radikaller membranlar üzerindeki çoğu bileşiği ve molekülü etkilese de, bu radikallerin en göze çarpan etkileri yağ asitleri üzerine etki ederek LPO'nun başlatılması olarak da bilinir. LPO, çoklu doymamış yağ asitlerinin radikallerle oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde tekerrür eden, çok sayıda biyolojik yapıdaki hasarlara sebep olan reaksiyon sürecidir. Membranlarda yıkıcı etkiye sahip olan LPO, genellikle meydana gelen hidroksil radikalinin membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla ortaya çıkar. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.[75, 91, 92]

Membran ya da çoklu doymamış yağ asitlerinin içerdiği metilen grubundan (-CH_2) bir hidrojen (H·) atomunun çıkartılmasıyla lipid peroksidasyonu başlatan ilk hareket gerçekleşir. Böylece tek elektron içeren H·'nin uzaklaştırması sonucu karbon merkezli ·CH- lipid radikali meydana gelir. Meydana gelen lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Lipid peroksil radikali, lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu bir dizi değişikliğe uğrayarak molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapılarının meydana gelmesi ile oluşur. Daha sonra lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H· parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Bu da zincirleme reaksiyonların başlamasına neden olur.[66, 76]

Membranlarda biriken lipid hidroperoksitler, membran fonksiyonlarında çeşitli hasarlar meydana getirir. Ayrıca lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizörlüğünde

yıkılması sonucu çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en çok bilinenleri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir.

MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Meydana gelen bu bileşikler ya hücresel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden difüze olup hasarlı hücrenin diğer bölümlerine yayılırlar. Lipid radikalleri hidrofobik yapıdadır ve bu nedenle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. Bu şekilde iyon transportunu da etkileyebilirler.[69, 88, 93, 94]

Lipid peroksidasyonu reaksiyonu iki şekilde sonuçlanır. Bu reaksiyon ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder.[66]

Lipid peroksidasyonu sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar kısaca:

-Membran üzerindeki yağ asiti miktarında azalma meydana gelir.

-LPO sırasında oluşan lipid hidroperoksitleri biyomembranlar üzerinde yerleşmiş halde bulunan bazı enzimleri inhibe eder.

-Tiyol gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerinderi protein-lipid ilişkisini bozar.

-Membranın yapı taşlarından olan lipidlerin akışkanlığını bozar.

-LPO sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli yapısal moleküllerde bozulmalara neden olurlar.[95]

Proteinler üzerine etkileri: Proteinler, lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin etkilenme derecelerini ihtiva ettikleri aminoasit bileşimi belirler. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden aminoasitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein v.s.) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Karbon merkezli radikaller, sülfür radikalleri ve proteinlerin radikallerinin reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Bu karbon merkezli radikallerden protein karbonillerin (PCO) ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülebilir. Serbest radikaller proteinlerde parçalanma ve çapraz bağlanmalar ile proteinlerin birbirleri arasında birleşimlerini meydana getirebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal fonksiyonlarında bozukluklar ve enzim aktivitelerinde aksaklılar meydana gelir.[75, 96]

Proteinlerin çok farklı şekillerde modifikasyona uğramasına bağlı olarak, protein oksidasyonu sadece bir evrensel belirteçten oluşmuyor. Çeşitli oksidatif protein modifikasyonları, oksidasyona uğrayan amino asit miktarı yanısıra oluşturulan ürünler bakımından da iyi derecede spesifiktir. Bununla birlikte bazı oksidatif protein modifikasyonlarınca da yaygın özelliktedir ve fazla sayıda amino asitte değişikliğe sebebiyet vererek, aşırı miktarda ürün oluşumunu gerçekleştirebilir. Spesifik modifikasyonlara tirozinin ditirozine dönüşümü, geniş çaplı modifikasyonlara ise arginin, lizin ile tirozin amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenalle reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler bunlara örnektir.[97, 98]

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 sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca LPO sonucu oluşan MDA'nın nadirde olsa DNA'da

mutasyona neden olduğu, beslenme ve yaşam şekli gibi faktörlerle bir araya gelerek kanser ve genetik bazı hastalıklara yol açtığı düşünülmektedir.[99, 100]

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolay bir şekilde reaksiyona girerek çeşitli değişimlerin meydana gelmesine neden olur. DNA'nın yakınında oluşan hidroksil radikali mutasyonlara sebep olabilir. DNA hasarı, hidroksil radikalinin nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarması veya çift bağlara katma tepkimeleri meydana getirmesi ile oluşur. Hidroksil radikalinin singlet oksijeni nükleik asitlerle daha az tepkimeye girme yeteneğine sahiptir. Süperoksit anyonu ise kuvvetli bir oksitleyicidir ve yüksek elektron yoğunluğuna sahip guanin gibi moleküllerle daha kolay reaksiyona girer.[101, 102]

Aktive olmuş nötrofiller tarafından meydana getirilen H_2O_2, hücre membranından rahatlıkla geçerek hücre çekirdeğine ulaşıp DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Reaktif oksijen türleri tarafından meydana getirilen DNA'nın oksidatif hasarı sonucunda karsinogenez ve çeşitli hastalıklar görülebilir.[99, 100, 103, 104]

1.7.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlıyı meydana getiren hücreler, serbest radikallerin ortaya çıkardıkları zararları önlemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranında işleyen birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu işleyen mekanizmalar farklı şekilde etki meydana getirebildikleri gibi gerek radikal üretimini engellemek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır.[3] Canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme antioksidan savunma sistemi ya da 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 sınıflandırılabilmektedir.[105]

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:[105, 106]

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]

1) Endojen (Doğal) antioksidanlar:

a) Primer antioksidanlar (Enzimler):

Süperoksit dismutaz (SOD): Bu enzim, süperoksit radikalinin H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzim olarak görev yapar. SOD'nin aktivitesi yaşlanmaya paralel olarak artar. Bu enzim neredeyse bütün canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn

ihtiva eden Cu-ZnSOD, ekstraselüler 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 katalizleyebilirler.[83, 107, 108]

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bu enzim, ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda insan eritrositlerinde de tespit 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 radikalin etkisini ortadan kaldıran SOD'ın canlılarda önemli roller üstlendiği ve yaşamsal etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.[109]

İlk kez 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından Cu-Zn SOD tanımlanmıştır.[104] Hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan Cu-Zn SOD enziminin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32.000 Daltondur. Birbirinin aynı olan iki alt üniteden meydana gelir. Her alt ünitede bir Cu atomu ve bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfhidril grubu ve bir asetillenmiş terminal amino grubu bulunduğu tespit edilmiştir.[78, 109]

Süperoksit dismutazın bir diğer çeşidi olan Mn-SOD; prokaryotik hücrelerde molekül ağırlığı 40.000 dalton olan, birbirinin aynı iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan enzimdir. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, ancak 80.000 dalton molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotlara ait dismutazların pek çok ortak özelliği vardır ve primer yapıları da birbirine çok benzerdir. Ancak aynı tepkimeyi

katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur.[110]

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler ise periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD (Fe-SOD) bulundurur.[111]

Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerektiği ve hatta iki enzimin bir kompleks haline getirilip fenton reaksiyonu sonucu oluşan radikallerin giderilmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir.[112]

Katalaz (KAT): 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 H_2O_2'i moleküler oksijen ve suya katalizlemektir.[113, 114]

$$2H_2O_2 \xrightarrow{KAT} 2H_2O + O_2$$

Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda bulunmaktadır. KAT'ın indirgeyici aktivitesinin hedefi H_2O_2 ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllerdir. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır.[75, 115, 116]

Glutatyon peroksidaz (GPO): Bu enzimin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır.[117] Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85.000 dalton'dur. Birbirinin aynı dört subüniteden oluşan tetramerik

bir enzimdir. Her subunit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir.[75, 118, 119] Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında, % 25-40'ı ise mitokondride gerçekleşir. GPO, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur.[120, 121] GPO, aşağıdaki reaksiyonları katalizler.[118, 122]

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPO} GSSG + 2H_2O$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPO} GSSG + ROH + H_2O$$

Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPO) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGPO, hücre membranını LPO'ya karşı korunmasını sağlar.[123, 124]

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{PLGPO} GSSG + 2H_2O$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{PLGPO} GSSG + ROH + H_2O$$

$$PLOOH + 2GSH \xrightarrow{PLGPO} GSSG + PLOH + H_2O$$

Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon (GSSG), aşağıda anlatılan glutatyon redüktazın (GR) katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutatyon (GSH)'a dönüşür. GPO'nun, hücredeki dağılımı, GR'ye bağımlıdır. Her iki enzim de en yüksek miktarda sitozolde bulunur.[123]

Glutatyon S-transferaz (GST): "Selenyuma bağlı olmayan GPO" olarak

adlandırılır. GST'ler, sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere GSH'ı aktaran proteinlerdir. *E.coli*'den insana kadar çok çeşitli türlerden GST saflaştırılabilirken en çok rat karaciğerinden saflaştırılmıştır.[125]

Glutatyon S-transferazlar antioksidan aktivitelerinin yanında çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahip GST'lerin tüm canlı hücrelerde bulunması hayati önem taşıdıklarının bir göstergesidir. Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak, yabancı maddeleri GSH'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir ve daha ileri bir ürüne metabolize olabilirler. GSH'dan glutamat ve glisinin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür.[126]

$$RX + GSH \xrightarrow{GST} HX + GSR$$

Glutatyon S-transferazlar başta araşidonik ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere LPO'ya karşı gösterdikleri Se-bağımsız GPO aktivitesi ile koruyucu mekanizma oluştururlar.[126]

$$GSSG + ROH + H_2O \xrightarrow{GST} ROOH + 2GSH$$

Glutatyon redüktaz (GR): GR, 50.000 dalton'luk alt birimlere sahip bir dimerdir. Görevi yükseltgenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirmektir. Bu indirgenme işlemi sırasında NADPH'dan gelen elektronlar GSSG'nin disülfid bağına direkt olarak transfer edilemezler. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan flavin adenin difosfat (FAD)'a transfer edilirler. Daha sonra, alt

birimlerdeki 2 sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle GSSG'a aktarılmış olurlar.[127]

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 $NADP^+$'ın izoalloksozin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde geniş ölçüde aralarında bağlanırlar. GSSG için bağlayıcı alanın bir alt biriminin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği belirtmek gerekir.[128]

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu ise GR'nin GSSG'yi GSH'a çevrimi için gereken NADPH'ı sağlar.[129]

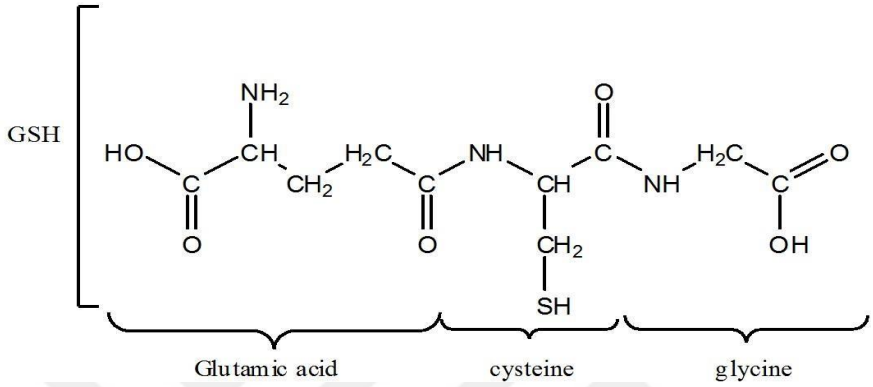
Miyelo peroksidaz (MPO): Nötrofil granüllerde bol miktarda bulunan MPO enzimi H_2O_2'den hipoklorik asit (HOCl) oluşturmak üzere etki eder. Asidik pH oluşumuna bağlı olarak MPO aktivitesi artmakta ve membranı kolayca geçen H_2O_2 bakteriye toksik etki yapmakta ya da hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikaline dönüşmektedir. Bu tepkimede HOCl yer almaktadır. H_2O_2 ile MPO Cl^- iyonlarını kullanarak H_2O_2'i HOCl'e dönüştürmektedir. Çok reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir.[130]

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \xrightarrow{MPO} HOCl + H_2O$$

$$HOCl + O_2^{\cdot -} \xrightarrow{MPO} O_2 + OH^{\cdot} + Cl^-$$

b) Sekonder antioksidanlar:

Glutatyon (GSH): GSH, birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir (Şekil 2.2). GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır.[131]



Şekil 2.2. Glutatyon'un molekül yapısı[132]

$$\text{L-Glutamat + L-Sistein + ATP} \xrightarrow[+P_i \text{ sentetaz}]{\gamma\text{-Glutamilsistein}} \gamma\text{-Glutamil sistein + ADP}$$

$$\gamma\text{-Glutamil sistein + Glisin +ATP} \xrightarrow[\text{sentetaz}]{\text{Glutatyon}} \text{GSH + ADP + } P_i$$

Glutatyon, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutatyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPO enzimi katalizörlüğünde H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki sergiler ve H_2O_2'yi alyuvarlardan uzaklaştırır. H_2O_2 birikmesi, hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azaltabildiğinden bu tepkime çok önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda hemoglobinin

methemoglobine otooksidasyonu ile süperoksit oluşurken, diğer dokularda sitokrom P 450 redüktaz ve XO gibi enzimlerle oluşur.[129, 131, 133]

Glutatyon, H_2O_2'yi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. Peptid bağından dolayı GSH'ı düşük enerjili bileşikler arasında kabul edebiliriz. GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfit-sülfhidril değişimi tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan H_2O_2'i uzaklaştıran enzim GPO'a substratlık yaparak proteinlerin sülfhidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda H_2O_2 birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'a indirgenerek GSH miktarı düzenlenir.[134]

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. Örneğin GPO ve KAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden askorbik asit, α-tokoferol ve β-karoten gibi diyetle alınan antioksidanlarla ilgilidir.[135]

Birçok enzimin şayet sistein tiyol grubu (–SH) oksitlenecek olursa inaktive ya da inhibe olur. GSH, gamma-glutamilsisteinilglisin, duyarlı ve esansiyel –SH gruplarını içeren enzimlerin doğal aktivatörüdür. GSH hücrede bir koenzimden ziyade var olan amino asit öncüllerinden kolayca sentezlenen doğal bir antioksidandır. Fenilalanin ve tirozinin oksidatif yıkımında görev alan maleilasetoasetat izomeraz da dahil olmak üzere GSH çok az sayıda enzim için spesifik bir koenzimdir. GSH'un hücre içi derişimi kontrol edilerek birçok enzimin aktivitesi düzenlenebilir.[135]

Diğer sekonder antioksidanlar: Canlı vücudunda oldukça az miktarlarda bulunmasına rağmen vitaminlerin vücuttaki görevleri oldukça fazladır. Vitaminlerin bir bölümü, besinlerle aldığımız karbohidrat, 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 radikallerin etkilerini bertaraf ederek korurlar. Bunlar, uyum içerisinde çalışan bir takım gibi radikalik saldırılara karşı koyarlar. β-karoten, askorbik asit ve tokoferolün antioksidan etkileri yıllardan beri bilinmektedir. β-karoten organizmada A vitaminin parsiyel 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 vitamini üstlenmiştir.[105]

Basit yapıdaki bir şeker asidinin laktonundan ibaret olan askorbik asit, yapı itibariyle en basit vitaminlerden biridir. 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 lipidleri oksidatif hasardan korumaktır. İnce bağırsaklardan kolayca emilir ve vücudun tüm dokularına taşınarak hücre membranları etrafında depolanır. Böylece hücre membranında koruyucu bir tabaka oluşturmuş olur.[136, 137]

2) Ekzojen antioksidanlar[106]

1. Ksantin oksidaz inhibitörleri: Tungsten, allopürinol, oksipürinol, folik asit ve pterin aldehit.

2. Soya fasulyesi inhibitörleri: XD'ın proteolitik etki sonucu XO dönüşümünü inhibe ederler.

3. NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar, cetiedil ve difenilin iyodoniyum.

4. Rekombinant süperoksit dismutaz

5. Troloks-c: E vitamini analoğu.

6. Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler: GPO aktivitesini artırırlar. 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 I

11. Barbitüratlar

12. Demir şelatörleri

Gıda antioksidanları[106]:

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)

- Etoksiguin

- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)

- Propilgalat

- Sodyum benzoat

- Fe-superoksid dismutaz

1.8.Ülser ve Oksidatif Stres İlişkisi

Ülser, asrımızın önemli ve yaygın problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmakta ve mevcut tedavi yöntemleri hastaların şikayetlerini gidermeye yönelik semptomatik bir tedavi olarak kalmakta, bu nedenle ülser tedavisinde tam bir başarı

sağlanamamaktadır. Ayrıca ülser semptomları giderilmiş veya ülseri tedavi edilmiş hastaların tekrar bu hastalığa yakalanma ihtimalinin de oldukça yüksek olduğu gözlenmektedir.[138]

Ülser tedavisinde kullanılan ilaçların etiyolojiye yönelik değil semptoma yönelik olması, uzun süreli kullanımlarında sindirim bozukluklarına yol açmaları, hatta tümör gelişim sıklığını artırmaları da en önemli dezavantajları olarak göze çarpmaktadır.[139]

Ülser veya canlıda hasara sebep olan herhangi bir olay oksidatif stresin artması, devamında reaktif oksijen türlerinin (ROS) fazla miktarda üretilmesine neden olur. Bu sebeple geçmiş çalışmalarda, oksijen radikallerinin stres, etanol ya da NSAİİ'lar kullanılarak meydana getirilen akut deneysel gastrik lezyonların patogenezindeki rollerinin önemli olduğu ortaya koyulmuştur.[5, 140, 141]

Artan ROS miktarına ek olarak COX inhibisyonuyla ortaya çıkan PG eksikliği ve mide kan dolaşımı ile doku beslenmesinin bozulması, mide asiti, safra tuzları ve etanol'ün meydana getirdikleri zararı şiddetlendirmektedir. Ayrıca meydana gelen bu hasarlarda ROS'nin yıkım oluşturan etkileri, birçok canlı üzerinde incelenmiştir.[142-144]

1.9. Maclura pomifera

Moraceae 37 cinse ait 1179 tür barındıran tohumlu bitkilerin en geniş familyalarından biridir. Maclura bu ailenin en kapsamlı cinsindendir. *Maclura pomifera* (Yalancı Portakal) 36 türden biridir.[145, 146]Sistematiği aşağıdaki gibidir.

Alem : Plantae (bitkiler)

Divisio (Bölüm) : Spermatophyta (Tohumlu bitkiler)

Subdivisio

(Alt bölüm) : Gymnospermae (Açık tohumlular)

Klassis	: Magnoliopsida (Dicotyledoneae = Çift Çenekli Bitkiler)
Subklassis	: Hamamelidae
Familya	: Moraceae (Dutgiller)
Genus (cins)	: Maclura
Tür	: *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid.

Yalancı portakal (osage orange) olarak da bilinen, açık güneşli alanlarda ortaya çıkan, kuraklığa toleranslı, geniş toprak tip ve nem koşullarında yetişebilen bir ağaçtır. Bununla birlikte, 4.5'lik bir alt toprak pH sınırında, iyi drene topraklarda ve düzensiz ormanlarda bulunabilir. Bu ağaç, Nisan ve Haziran aylarında göze çarpmayan yeşil çiçekler halinde izlenir. Ekim ve Kasım aylarında kaba sarı yeşil olgun dokulu, ağır yeşil toplar halinde düşen, asitli ve sütlü, yenmeyen bir meyveye sahiptir (Şekil 2.3).[147]



Şekil 2.3. *Maclura pomifera* (Osage Orange)[148]

Maclura pomifera bitkisinden izoflavin türevi iki temel madde olan osajin ve pomiferin izole edilip yapıları aydınlatılmıştır. Taze meyvesinden elde edilen etil asetat ekstresinde % 25.7 osajin ve % 36.2 pomiferin bulunmaktadır.[149] Yapılan çalışmalarda

bu bitkiden elde edilen ekstrelerin önemli farmakolojik etkileri ve antimikrobiyal, antienflamatuar, antitümöral ve antidepresan özellikleri belirlenmiştir.[150]

1.9.1. *Maclura pomifera'*nın Kimyasal Bileşeni

Maclura pomifera tohumunda, sırasıyla: % 5.88 kül, % 32.75 yüksek protein içeriği, % 33.89 nem, % 6.72 yağ, % 20.76 karbonhidrat ve yağ içerikleri bulunmaktadır. 100 gram kuru maddede, potasyum 421.65±0.01, kalsiyum 218.56±0.06, magnezyum 185.00±0.001, demir 3.25±0.07, çinko 2.61±0.02, bakır 1.15±0.01 mg mineral içerdiği bulunmuştur.[151]

Yağın fiziko-kimyasal özellikleri:

Ham yağı, % 13.87 oleik, % 76.19 stearik, % 6.76 ve % 2.40 palmitik asit gibi yağ asitlerini içermektedir.[151] *Maclura pomifera* tohumunun yağı 100 gram tohumda mg olarak, 18.92 α-tokoferol, 10.80 γ-tokoferol, 6.02 β-tokoferol ve 6.29 δ-tokoferol içerdiği tespit edilmiş olup, zengin tokoferol içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.[151]

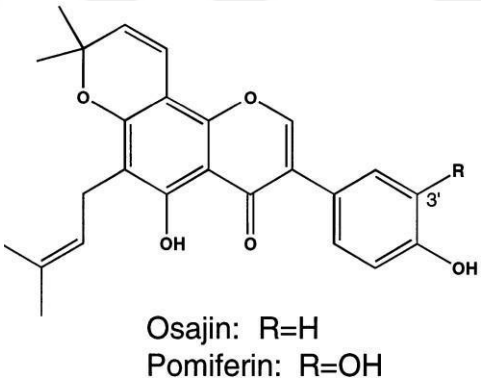
Ayrıca *Maclura pomifera* önemli besin maddelerini, insan sağlığını olumlu yönde etkileyecek esansiyel yağları ve yağda çözünen biyoaktif molekülleri içermektedir.[151] Yine bu bitkiden elde edilen deniz tuzu ve metanol ekstresinin birçok antioksidan özellikli mantar türleri ile kıyaslandığında daha etkili antioksidan özelliği olduğu belirlenmiştir.[152]

1.10. Pomiferin

Maclura pomifera bitkisinin etil asetat ekstratı % 36.2 oranında pomiferin (PMF) % 25.7 civarında osajin (OSJ) içermektedir. *Maclura pomifera* bitkisinden saflaştırılan PMF, sistematik olarak "3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-8,8-di-methyl-6-(3-methylbut-2-enyl)-4H,8H-pyrano[2,3-h]chromen-4-one" şeklinde tanımlanır. Moleküler formülü $C_{25}H_{24}O_6$'dir.[153]

Aynı bitkide yüksek miktarlarda bulunan PMF ve OSJ yapısal olarak birbirine benzerler. İki molekül arasındaki tek fark, 3 nolu karbona bağlı grubun PMF'de OH yerine osajinde H grubunun bağlı olmasıdır. *İn vitro* yapılan antioksidan potansiyel ve kapasiteyi ortaya koyma çalışmaları pomiferinin güçlü bir antioksidan olduğunu ortaya koyduğu gibi, benzer testler aynı şekilde izoflavon grubu maddelerin de antioksidan kapasitesinin olduğunu da saptamıştır. Fakat genistein ve daidzein gibi soya kaynaklı izoflavon türevi maddeler, sahip oldukları antioksidan kapasiteye rağmen *in vivo* modellerde başarısız bulunmuştur.[149, 150]

Pomiferin, tek başına sahip olduğu antioksidan kapasitesinin kesin olmamakla beraber, OSJ'den farklı olarak fazladan sahip olduğu –OH grubundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 2.4).[143]



Şekil 2.4. Osajin ve pomiferinin yapısı

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Biyokimya ölçümlerinde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company'den temin edilmiştir.

Ülser deneylerinde kullanılan ilaçlar ise;

İndometazin : (Endol® kapsül 25 mg) Deva İlaç,

Ranitidin : (Ulcuran® 25 mg/ml 1 flakon) Abfar

firmalarından temin edilmiştir.

2.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj : Hettich Universal R 320

UV-visible spektrofotometre : BIO-TEK EPOCH, GEN 5 Yazılımı ile birlikte

pH metre : OHAUS Starter 3100 pH Metre

Hassas terazi : Denver Instrument TP-303

Derin dondurucu : Sanyo MDF - 235

Manyetik karıştırıcılar : Heidolph Hei-Standard

Otomatik pipetler : Eppendorf Research Pipette set 1 ve set 2

Buzdolabı : Vestel tek kapılı buzdolabı

Distile su cihazı : GFL 2012/4

Çalkalayıcılı su banyosu : GFL 1083

Homojenizatör : Qiagen Tissuelyser LT

Vorteks : Heidolph Standard ve IKA MS-3 Digital

2.3. Deney Materyalinin Temini ve Etken Maddenin İzolasyonu

Maclura pomifera (Yalancı Portakal) Ankara Üniversitesi kampüs alanından Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU ve Dr. Murat KOÇ tarafından 15.10.2010 yılında

toplanmıştır. Örnekler yine aynı araştırmacılar tarafından incelenip uluslararası teşhis yöntemleri kullanılarak türün teşhisi doğrulanmıştır. Örneklere M.Koç 1292 kodu verilerek Bozok Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (Yozgat) saklanmıştır.

Çalışmada, *Maclura pomifera* meyvelerinden izole edilen ve kimyasal yapısı pomiferin olarak doğrulanan izoflavonoid molekül kromatografik yöntemler ile elde edilmiştir.

Çalışmada gerekli olan pomiferin kromatografik yöntemlerle Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR tarafından saflaştırılmış ve kimyasal yapısı UV-Görünür Bölge, IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, 1D ve 2D NMR spektroskopik yöntemleri ile doğrulanmıştır.

Kurutulan meyveler bir değirmen ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra etil asetat ile 5 kez oda şartlarında mesare edilerek ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminin sonunda 114 gram ekstre elde edilmiştir. Bu ekstreden 25 gram alınarak silika jel kolon kromatografisinde fraksiyonlanmış ve kromatografik çalışmaların sonucunda 5'er gram civarında MP-1 ve MP-2 kodlu iki majör madde izole edilmiştir. Kromatografik çalışmalarda kolon kromatografisi için silika jel (Kiesel gel 60, 70-230 mesh, Merck) sabit faz materyali, ince tabaka kromatografisi (İTK) için ise silika jel (Hazır plak, Kiesel gel 60 F254, 0.2 mm, Merck, 5554) kullanılmıştır. İTK'da maddelere ait lekeler UV lambasında UV254 ve UV366 nm'de belirlenmiştir. Kolon Kromatografisi için, 250 gram silika jel (70-230 mesh) kloroform-etil asetat (8:2) haraketli faz sistemi ile süspansiyon haline getirilerek ve 2,5 x 70 cm boyutundaki bir kolona doldurulmuştur. Ekstre (25 gram) yeterli miktarda kloroform-etil asetat (8:2) içerisinde sıcakta çözüldükten sonra kolona tatbik edilmiştir. Elüsyona kloroform-etil asetat (8:2) hareketli faz ile devam edilmiş ve fraksiyonlar 50 ml hacimler halinde toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlar İTK ile kloroform-etil asetat (8:2) sistemi ile kontrol edilerek

fraksiyonların saflığı belirlenmiştir. Saf maddeleri içeren fraksiyonlar ayrı konularak kendi arasında birleştirildikten sonra çözücüsü uzaklaştırılmış ve 5'er gram civarında MP-1 ve MP-2 olarak kodlanan iki madde saflaştırılmıştır. Bu maddelerin kimyasal yapıları IR, ^{1}HNMR, ^{13}C-NMR, DEPT ^{13}C-NMR, ^{1}H,^{1}H-COSY, HMQC ve HMBC spektroskopik yöntemleri ile sırasıyla osajin (MP-1) ve pomiferin (MP-2) olarak aydınlatılmıştır.

2.4. Deney Hayvanlarının Temini

Bu çalışma, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 29.08.2013 tarihli, 124 sayılı yazı ile izni ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca TÜBİTAK Birimi tarafından 213S114 nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada 200-250 gram ağırlıkta 36 adet Sprague Dawley ırkı erkek ratlar kullanılmıştır. Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuarlarından temin edilmiş ve deneyler yine burada gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar deneye alınmadan önce gruplara ayrılmış, standart şartlar altında muhafaza edilmiş ve beslenmiştir.

2.5. Ratlarda İndometazin Uygulaması ile Deneysel Ülser Oluşturulması

2.5.1. Ülser Modeli

İndometazin ile uyarılan gastrik hasarlı doku üzerine *Maclura pomifera* bitkisinden elde edilen pomiferin maddesinin etkilerini araştırmak üzere yapılan bu çalışma, Guidobono ve ark.[154] (1997) yöntemi temel alınarak gerçekleştirilmiştir.

Deney prosedürü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Her bir grupta 6 adet rat kullanılarak 6 deney grubu oluşturulmuş ve altlık malzemeleri alınarak bir gün boyunca aç bırakılmıştır. Bu gruplar;

a) Kontrol (indometazin) grubu: Ülser gelişimini kontrol etmek amacıyla sadece indometazinin 25 mg/kg dozda verildiği grup,

b) Referans grubu (REF): Ülser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ranitidinin 25 mg/kg dozda verildiği grup,

c) Sağlıklı grup: İndometazinin ülser yapıcı etkisini ve enzim aktivitesindeki değişikleri sağlıklı dokularla mukayese edebilmek için hiçbir maddenin verilmediği grup,

d) Tedavi grupları: Antiülser etkilerini incelemek üzere pomiferin verilen gruplardır.

- PMF-100: Pomiferinin 100 mg/kg dozda uygulandığı grup + IND (25 mg/kg)

- PMF-200: Pomiferinin 200 mg/kg dozda uygulandığı grup + IND (25 mg/kg)

- PMF-300: Pomiferinin 300 mg/kg dozda uygulandığı grup + IND (25 mg/kg)

2. Hayvanlar aç bırakıldıktan bir gün sonra, her bir uygulama grubunda bulunan ratlara; *Maclura pomifera* bitkisinden elde edilen pomiferin maddesi değişik dozlarda saf suda çözülerek oral yoldan steril metal bir sonda ile verilmiştir. Referans ilaç olarak belirlenen ranitidin (25 mg/kg) ise referans gruba saf suda çözülerek oral yoldan uygulanmıştır. Sağlıklı gruba ise hiçbir muamele yapılmadan, diğer hayvanlar ile aynı şartlar altında (oda, sıcaklık, nem, güneş ışığı, karanlık vb.) muhafaza edilmiştir.

3. Yukarıda belirtilen tüm maddeler belirtilen doz ve miktarlarda oral olarak verildikten 5 dakika sonra sağlıklı grup hariç tüm sıçanlara aynı şekilde oral yolla indometazin (25 mg/kg dozda) verilmiştir.

4. İndometazinin verilmesinden 6 saat sonra yüksek dozda anestezi madde (thiopental sodium 50 mg/kg) kullanılarak tüm gruplardaki hayvanlar sakrifiye edilmiş ve mideleri alınmıştır.

5. Mideler büyük kuvartur boyunca açılarak serum fizyolojik ile yıkanmış ve makroskopik olarak incelenmiştir. Daha sonra tüm sıçan gruplarına ait mide dokuları biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için -20 ºC'de buzdolabına ve % 10'luk formalin solüsyonuna alınmıştır.

6. Pomiferin maddesinin antiülser etkileri, makroskopik ve biyokimyasal analizlere dayandırılmak suretiyle belirlenmiştir. Pomiferin verilen gruplardan elde edilen sonuçlar, indometazin ve referans ilaçlarının verildiği gruplardan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

2.6. Mide Dokusunun Makroskopik İncelenmesi

Gastrik lezyonların belirlenmesi için rat mideleri makroskopik değerlendirmeye alınmış, ülser sayısı ve alanları tespit edilmiştir. Ülser alan genişlikleri milimetrik kâğıt kullanılarak bir büyüteç yardımıyla ölçülmüştür.

2.7. Mide Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi

Antiülser deneylerinden sonra üç gün içerisinde biyokimyasal incelemeler için -20ºC'de saklanan mide dokularındaki enzim aktivitelerini ölçmek üzere mide dokularından homojenatlar hazırlanmıştır. Mide dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda SOD ve KAT enzim aktiviteleri ile GSH ve LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edilmiştir. Tüm ölçümler oda sıcaklığında, en az beş paralel tekerrür olarak gerçekleştirilmiştir.

2.7.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması:

Mide dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Her bir rat grubu dokularından 0.025 g tartılmış, üzerlerine 1.5 ml tampon çözeltilerden (her parametre için farklı bir tampon sistemi) ilave edilerek 1/60 (w/v) oranında seyreltilmiştir. Bu homojenatlar daha sonra homojenizatörde 10 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar bir süzgeç kâğıdından süzüldükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4ºC'de santrifüj edilmiş ve hazırlanan bu süpernatantlarda biyokimyasal araştırmalar yapılmıştır.[155]

2.7.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Lipid Perokisdasyon Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. LPO Homojenat Tamponu (% 10 KCl): 10 g KCl alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2. LPO Ölçüm Karışımı:

a) % 8 Sodyum dodesil sülfat (SDS): 0.8 g SDS alınıp bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

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

c) % 20 Asetik asit: 13 ml %100'lük glasiyel asetik asit alınmış, üzerine 65 ml saf su eklenmiştir.

Glutatyon Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

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

1.514 g Tris-HCl 200 ml saf suda çözülmüş, pH'sı bir pH metre kullanılarak 7.4'e ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlanmıştır.

2. GSH Ölçüm Tamponu (200 mM pH 8.2, 0.2 mM EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) içeren Tris-HCI Tamponu):

6.05 g Tris-HCl ve 0.0146 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözülmüş, pH'sı bir pH metre kullanılarak 8.2'ye ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlanmıştır.

3. GSH Miktarını Ölçmek İçin Gereken Çözelti (10 mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)):

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

Süperoksit Dismutaz Aktivetisinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

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

1.7 g KH_2PO_4 ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözülmüş, pH'sı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

2. SOD Ölçüm Karışımı:

a) 0.3 mM Ksantin: 0.0018 g Ksantin alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 40 ml'ye tamamlanmıştır.

b) 0.6 mM EDTA: 0.0035 g EDTA alınmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır (2 damla 5 M NaOH ile çözünmektedir).

c) 150 μM NBT (Nitro blue tetrazolium) : 0.0024 g NBT (Nitroblue tetrazolium) alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır.

d) 0.4 M Na_2CO_3: 0.5088 g alınarak bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 12 ml'ye tamamlanmıştır.

e) 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartılmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 6 ml'ye tamamlanmıştır.

3. SOD Enziminin Aktivitesini Ölçmek İçin Gereken Çözelti (167 U/L Ksantin oksidaz):

a) Orijinal ambalajından (1 ml sinde 32 mg protein ve 0.3 U enzim ihtiva eden enzim) 34.79 µl alınmış ve üzerine 2 ml soğuk 2 M $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi eklenmiştir.

b) 2 M $(NH_4)_2SO_4$: 0.7928 g $(NH_4)_2SO_4$ alınmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 3 ml ye tamamlanmıştır. Bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlanmış ve +4^oC'de saklanarak soğuk olarak kullanılmıştır.

c) 0.8 mM $CuCl_2$: 0.0108 g $CuCl_2$ alınmış, bir miktar saf suda çözülmüş ve hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlanmıştır.

Katalaz Aktivitesini Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

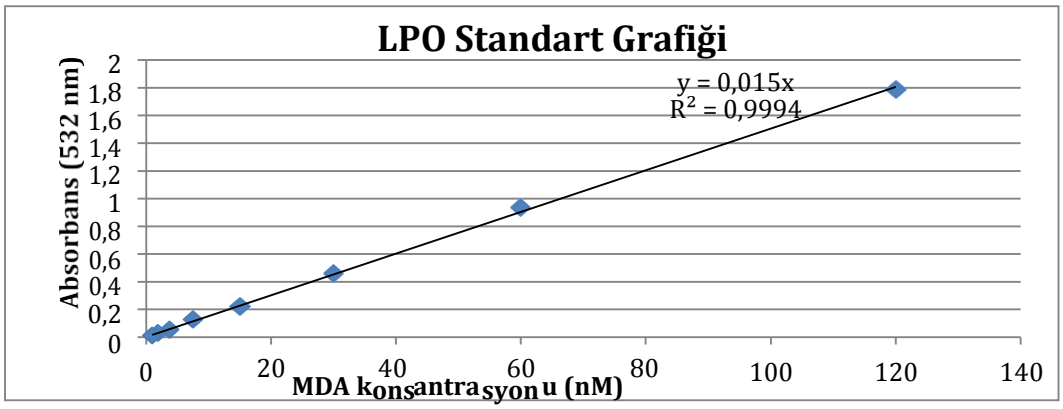
1. KAT Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, % 1 Triton X-100 içeren Fosfat Tamponu): 1.7 g KH_2PO_4 ve 2.5 ml Triton X-100 alınarak 200 ml saf suda çözülmüş, pH'sı bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlanmış ve sonra hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

2. KAT Ölçüm Karışımı (40 mM, pH 7'de H_2O_2 içeren 50 mM Fosfat Tamponu): 1020 µl H_2O_2 ve 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH'sı bir pH metre kullanılarak 7.0'a ayarlanmış ve sonra hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır.

2.7.3. Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Ölçümü:

Ölçüm prensibi: Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu LPO'nun son ürünlerinden olan MDA düzeyini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'in tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyonu temel alınmaktadır. Bir molekül MDA iki molekül TBA ile stabil kırmızı renk oluşturmak üzere reaksiyona girmektedir. LPO ölçümü, Ohkawa ve ark.[156] (1979) metoduna göre MDA'in asidik ortamda TBA ile oluşturduğu rengin 532 nm'de ölçülmesi prensibine dayanarak yapılmıştır.

Ölçüm: 0.025 g doku üzerine 1.5 ml %10 KCl ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar, 5000 g 4º C'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve bu süpernatantlar LPO miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl % 8 sodyum dodesil sülfat (SDS), 750 µl % 20 asetik asit, 750 µl % 0.08 TBA ve 150 µl distile su pipetlenerek vortekslenmiştir. Karışım 100º C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2.5 ml n-bütanol ilave edilmiş ve ölçüm alınmıştır.



Şekil 3.1. MDA miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik

Miktarın hesaplanması: Oluşan kırmızı renk miktarları 532 nm'de 96 kuyulu kuartz plate kullanılarak okunmuştur ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak

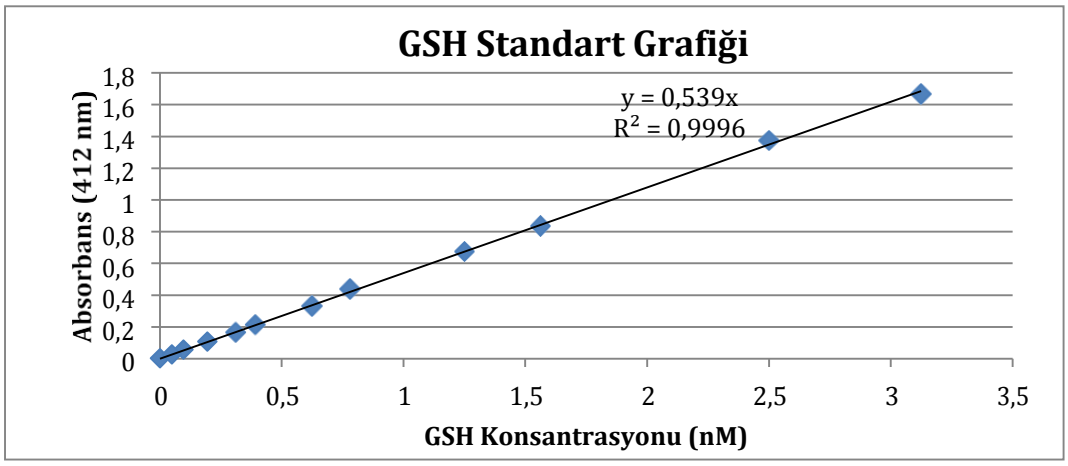
ölçümler yapılmıştır (Şekil 3.1). Numunelerin LPO miktarları, nmol MDA/g doku olarak tarif edilmiştir. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verilmiştir.

2.7.4. Total Glutatyon (GSH) Miktarı Ölçümü:

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

Ölçüm: Sedlak ve Lindsay'in[157] (1968) geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. 0.025 g doku üzerine 1.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar, 12.000 g 4ºC'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. 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 vortekslenmiştir. Karışım 37º C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve sonra ölçümleri alınmıştır.

Miktarın hesaplanması: Oluşan sarı rengin 412 nm'de absorbansları 96 kuyulu kuartz plate kullanılarak okunmuştur. Seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanıldı ve oluşturulan standart grafikten (Şekil 3.2) yararlanarak hesaplamalar yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg doku olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak belirlendi.



Şekil 3.2. GSH miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik

2.7.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü:

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

I. Ksantin $\xrightarrow{XO}$ Ürik Asit + Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$)

II. NBT $\xrightarrow{O_{2.-}}$ Formazon

III. $2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$

Ölçüm: SOD aktivitesi Sun ve ark.[158] (1988) tarafından tarif edilen yönteme göre ölçülmüştür. Mide dokuları homojenize edildikten sonra 18.000 g'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Deney tüpüne 980 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), 200 µl supernatant, 20 µl XO eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkübasyon bırakılmış ve 400 µl 0.8 mM $CuCl_2$ ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

Aktivitenin hesaplanması: Oluşan formazon miktarları 560 nm'de kuartz plate kullanılarak okunmuştur. Seyreltme katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EÜ) elde edilmiş ve SOD aktivitesi mmol/dakika/mg doku olarak tarif edilmiştir. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verilmiştir.

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

2.7.6. Katalaz (KAT) Aktivitesinin Ölçümü:

Ölçüm Prensibi: Aktivite, ölçüm ortamındaki H_2O_2'nin KAT vasıtasıyla suya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Ölçüm: KAT'ın aktivitesi Aebi'nin[159] (1984) belirttiği metoda göre ölçülmüştür. 0.025 g doku alınmış, üzerine 1.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Oluşan homojenat 10.000 g'de 4^o C'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar katalaz aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Kuartz plate içerisine H_2O_2 çözeltisinden 100 µl konularak numune çözeltisinden 200 µl ilave edildiği anda kronometre çalıştırılmıştır. Kuartz plate, okuyucuda 240 nm dalga boyunda 15 saniye aralıkla 3 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedilmiştir.

Aktivitenin hesaplanması: Ölçümler, lineer olarak absorbans azalması olan aralıkta dakika başına absorbans azalması olarak hesaplanmıştır. Işık yolu (b)= 10mm, azalma katsayısı ($\varepsilon_{H_2O_2}$), 0.00394 (mmol-1 x mm-1) alınarak A = ε.b.c formülünden 240 nm'de, dakikada 1 mmol H_2O_2'in harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplanmıştır. Formülde seyreltme faktörleri dikkate alınmış, 25 mg doku için mmol/min= 60/25 x A/0.00394 şeklinde oluşturulan formülde bütün aktiviteler yerine konularak absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. KAT aktivitesi, µmol/dakika/mg doku olarak tarif edilmiştir. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapılmıştır.

2.8. İstatistiksel Analizler

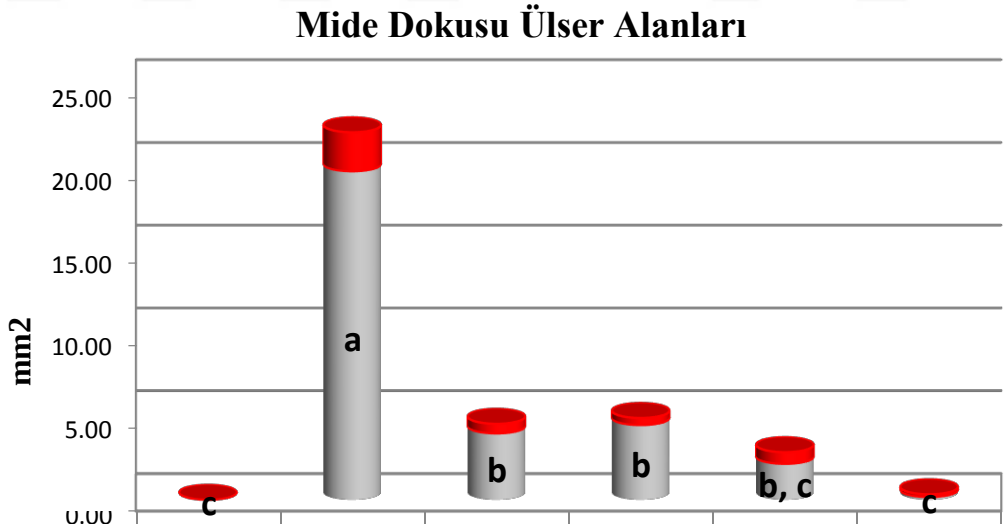
İstatistiksel analizler IBM SPSS 20.0 yazılım programı kullanılarak yapılmıştır.[160] Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of Variance (ANOVA)" testi ile belirlenmiş ve $p<0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Makroskobik Analiz

Bu çalışmada *Maclura pomifera* bitkisinden etil asetatta izole edilen pomiferin maddesinin (100, 200 ve 300 mg/kg) dozlarının ve ranitidinin (referans ilaç olarak) 25 mg/kg dozunun indometazin (IND) ile oluşturulan deneysel ülser modeli üzerine antiülser etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda aynı harflerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak farksız ve/veya anlamsız ($p>0.05$) kabul edilirken, farklı harflerle gösterilen ortalama değerler ise istatistiksel olarak farklı ve/veya anlamlı ($p<0.05$) değerlendirilmiştir.

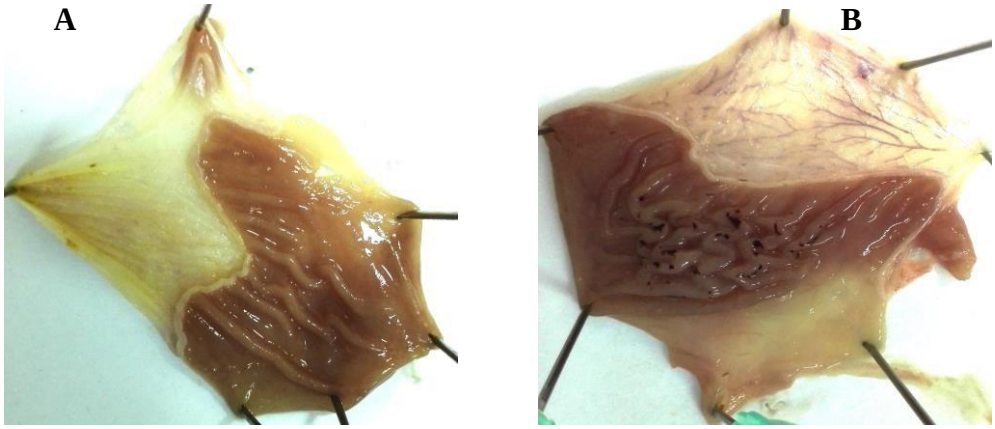
Deneysel ülser modelinde meydana gelen hasarın miktarı ve kapladığı alan makroskobik olarak ölçülebilmektedir. Oluşan ülser alanlarının yoğunluğu uygulanan tedavinin etkinliğini değerlendirmede önemli bir kıstastır.



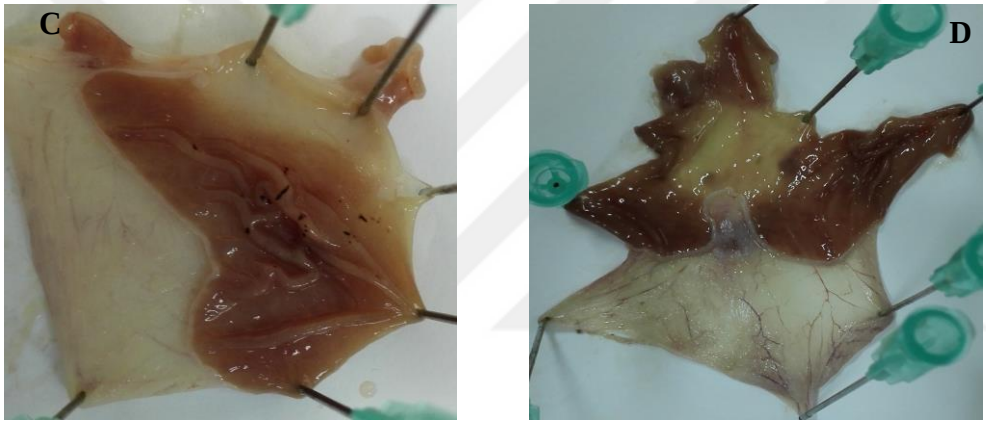
	Sağlıklı	Kontrol	Referans	100mg/kg PMF	200mg/kg PMF	300mg/kg PMF
± SE	0.00	2.36	0.58	0.43	0.70	0.17
ortalama	0.00	19.83	4.00	4.50	2.17	0.17

Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

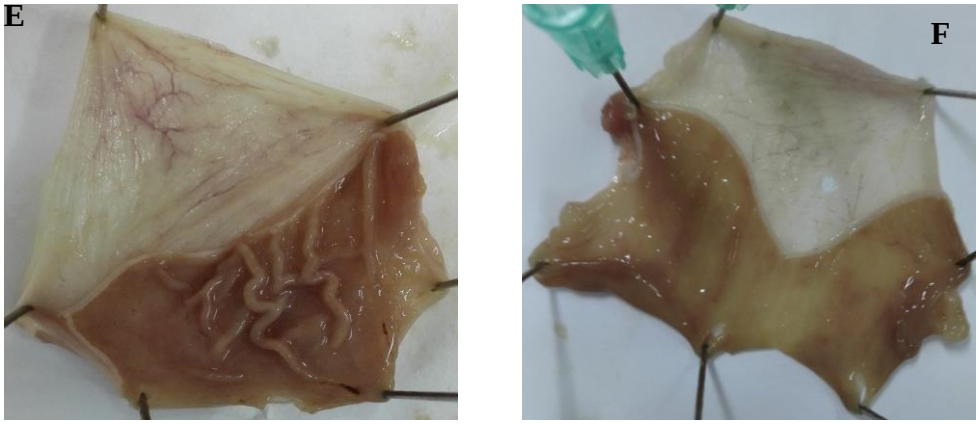
Şekil 4.1. Mide ülser alanlarını gösteren grafik



Şekil 4.2. Sağlıklı (A) ve Kontrol (B) gruplarına ait resimler



Şekil 4.3. REF (C) ve PMF-100 (D) gruplarına ait resimler



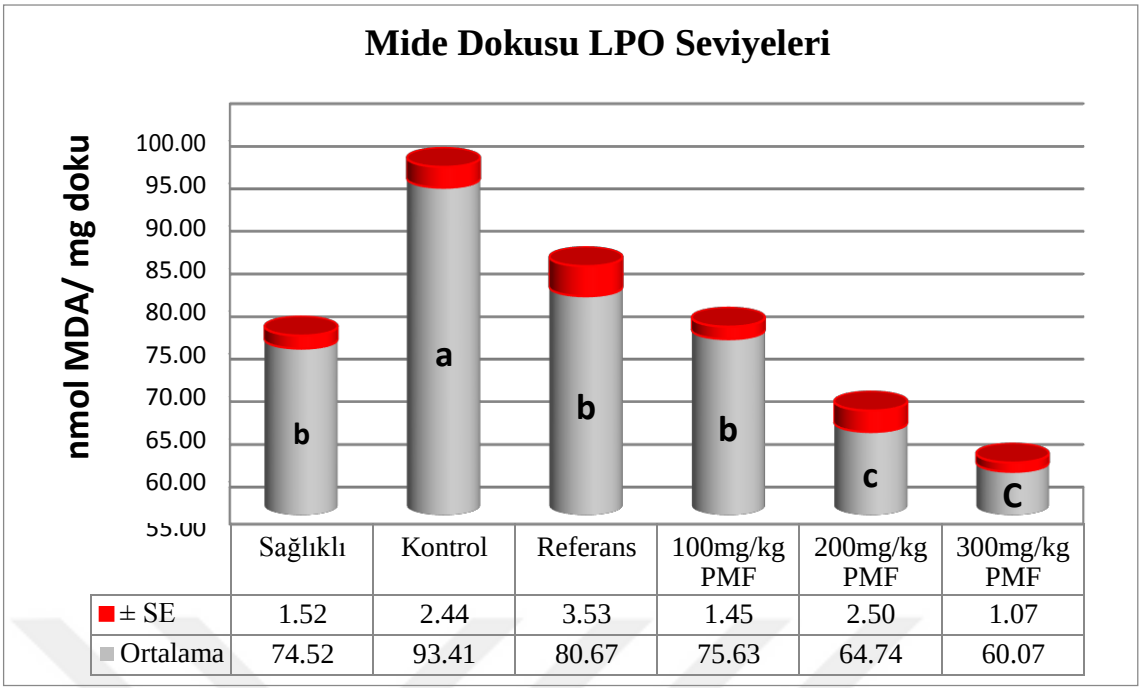
Şekil 4.4. PMF-200 (E) ve PMF-300 (F) gruplarına ait resimler

Deney sonunda ratlardan alınan mide dokuları yüzeyinde yapılan ülser alanı ölçümlerini gösteren Şekil 4.1 incelendiğinde IND' nin uygulandığı kontrol grubunda önemli oranda ülser alanı meydana geldiği gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Referans tedavi grubu olarak belirlenen REF grubu, IND grubu ile kıyaslandığında referans ilacın ve pomiferinin tüm dozlarının ülser alanını anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). PMF-100 grubu, REF grubu ile benzer şekilde etki ederek ülser alanını azaltmış olup, bu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.1 ve Şekil 4.3). Ayrıca PMF-200 grubu ülser alanını azalttığı gözlemlenirken, REF ve PMF-100 ile aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). PMF-300 grubu diğer gruplar ile kıyaslandığında; PMF-200 ile aralarında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), REF ve PMF-100 grupları ile aralarında anlamlı fark olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı zamanda PMF-300 ve PMF-200 grupları ile sağlıklı mide dokuları arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.1 ve 4.4). Bu sonuçlar dikkate alınarak yapılan makroskobik değerlendirmede PMF'in anti ülser etkisi net bir şekilde ortaya konulmuştur.

3.2. Biyokimyasal Analiz

3.2.1. LPO Seviyesi

Lipid peroksidasyonu (LPO) düzeyi, canlı doku ve hücrelerinde oksidatif hasarı göstermekte ve bu alanda en önemli parametre olarak kabul edilmektedir. LPO düzeyinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem oksidatif hasar sonucu dokularda oluşan MDA miktarının belirlenmesidir. Mevcut çalışmada da mide dokusunda meydana gelen hasarın tespit edilmesi için MDA seviyesi ölçülmüştür.



	Sağlıklı	Kontrol	Referans	100mg/kg PMF	200mg/kg PMF	300mg/kg PMF
± SE	1.52	2.44	3.53	1.45	2.50	1.07
Ortalama	74.52	93.41	80.67	75.63	64.74	60.07

Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

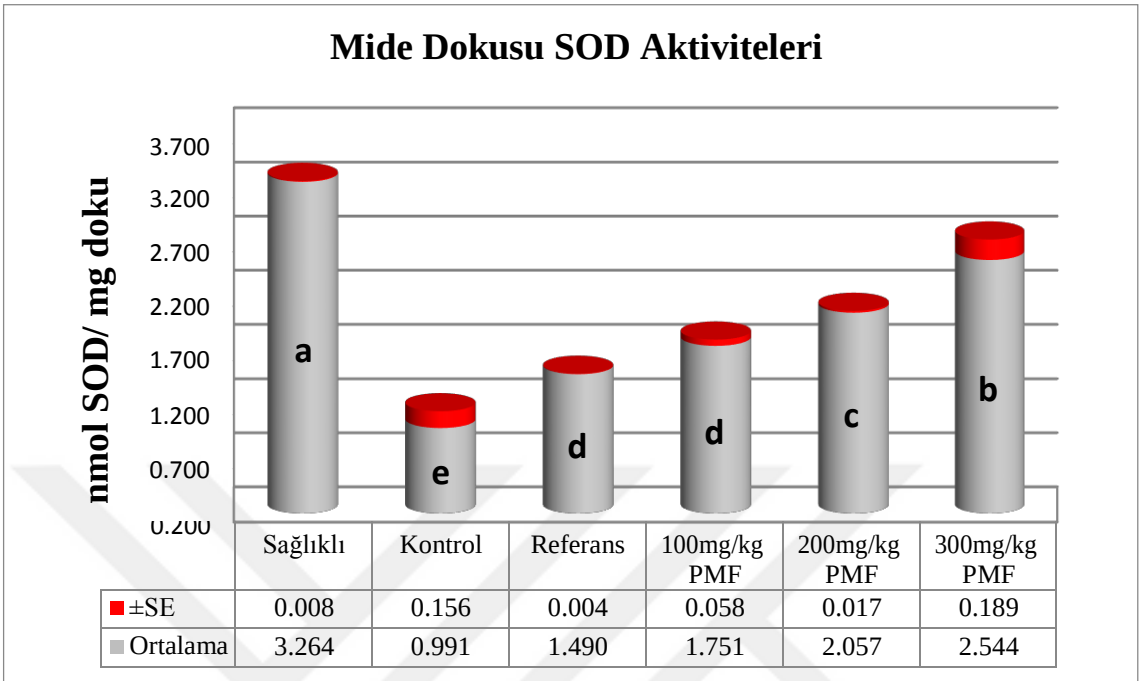
Şekil 4.5. Mide dokusu LPO seviyelerini gösteren grafik

Mide dokularında yapılan LPO ölçümlerini gösteren Şekil 4.5 incelendiğinde, ülser alanı sonuçlarına paralel olarak kontrol (IND) grubunda LPO seviyesinin önemli oranda arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Referans (REF) ve tedavi (PMF) gruplarında bu seviyenin büyük oranda azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). REF grubunun LPO seviyesi ile PMF-100 grubu LPO seviyesindeki azalma benzer olmakla birlikte ($p>0.05$), pomiferinin 200 ve 300 mg/kg dozlarının lipid peroksidasyonunu azaltmada bu uygulamalardan daha etkili olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Elde edilen bulgular ışığında pomiferin maddesinin doza bağlı olarak LPO seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir.

3.2.2. SOD Aktivitesi

Enzimatik antioksidan savunma sisteminin ilk basamağında SOD enzimi görev almaktadır. Hasara yol açan serbest radikallerin hem oluşmasına sebep olan hem de bizzat kendisi yıkıcı etkiye sahip olan süperoksit radikalinin yok edilmesinde SOD

önemli bir enzimdir. Bu enzimin aktivitesi, doku ve hücrelerde antioksidan savunma sisteminin durumu ve mekanizması hakkında da bilgi vermektedir.



	Sağlıklı	Kontrol	Referans	100mg/kg PMF	200mg/kg PMF	300mg/kg PMF
±SE	0.008	0.156	0.004	0.058	0.017	0.189
Ortalama	3.264	0.991	1.490	1.751	2.057	2.544

Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

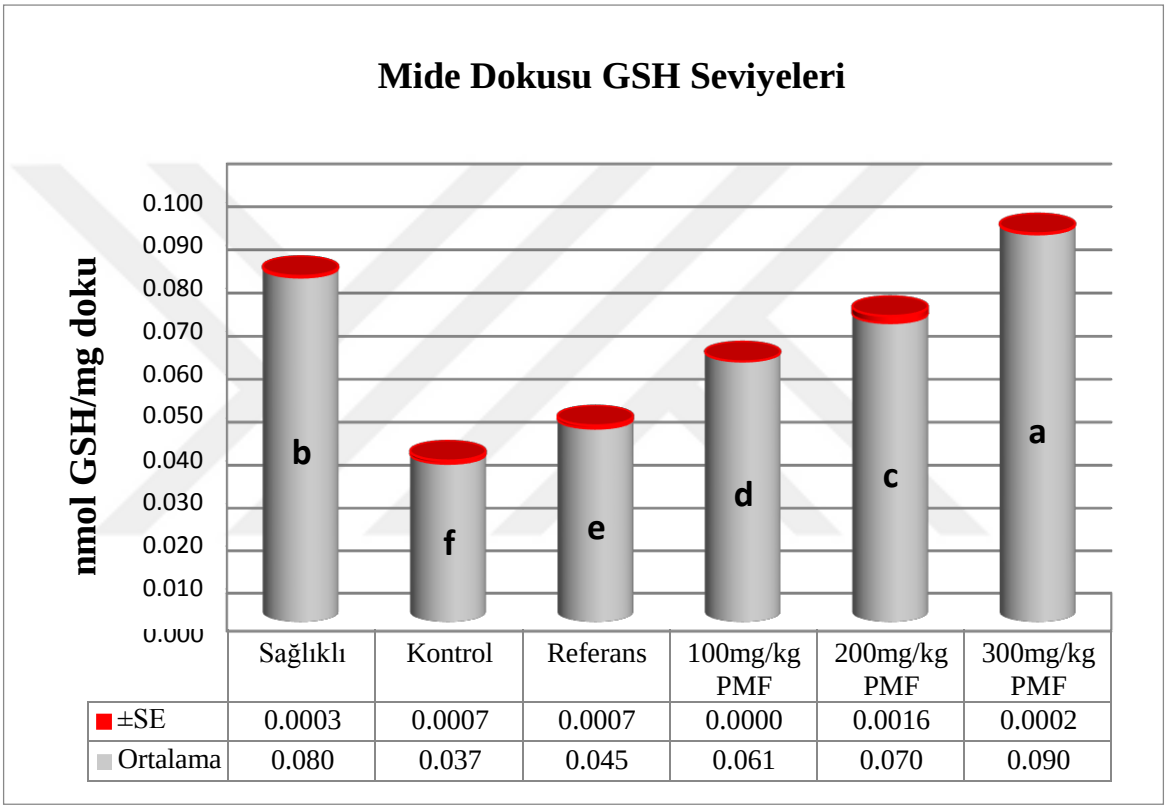
Şekil 4.6. Mide dokusu SOD aktivitelerini gösteren grafik

Mide dokusu SOD aktivitesi ölçümlerini gösteren Şekil 4.6 incelendiğinde IND uygulamasının SOD aktivitesini önemli seviyede düşürdüğü gözlemlenmiştir ($p<0.05$). LPO seviyeleri ve ülser alanlarıyla ilişkili olarak her iki parametredeki artış, benzer oranda SOD aktivitesindeki düşüşlerle paralellik göstermektedir. REF ve PMF-100 grupları benzer şekilde bulunmuş olup ($p>0.05$), PMF-200 ve PMF-300 gruplarının enzim aktivitesindeki artışlar REF grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). En yüksek SOD aktivitesi ise sağlıklı grupta gözlenmiştir.

3.2.3. GSH Seviyesi

Hücre ve doku sağlığı açısından tehlikeli olan peroksit radikali gibi radikallerin savunmasında rol alan GPO ve GST gibi GSH bağımlı enzimlerin aktivitesi için GSH

vazgeçilmez bir ajandır. GSH yokluğunda bu enzimlerin çalışması mümkün değildir. GSH adı geçen enzimlerin etkilerinin düzenlenmesinin yanı sıra; bu enzimlerden bağımsız bir şekilde hem C ve E vitaminlerinin rejenerasyonunda rol oynaması hem de direk antioksidan etki göstermesi sebebiyle antioksidan savunma sisteminin belki de en önemli lojistik noktasını oluşturmaktadır. Bu açıdan GSH miktarının ölçülmesi antioksidan mekanizma ve düzeyi açısından oldukça önemlidir.



	Sağlıklı	Kontrol	Referans	100mg/kg PMF	200mg/kg PMF	300mg/kg PMF
±SE	0.0003	0.0007	0.0007	0.0000	0.0016	0.0002
Ortalama	0.080	0.037	0.045	0.061	0.070	0.090

Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

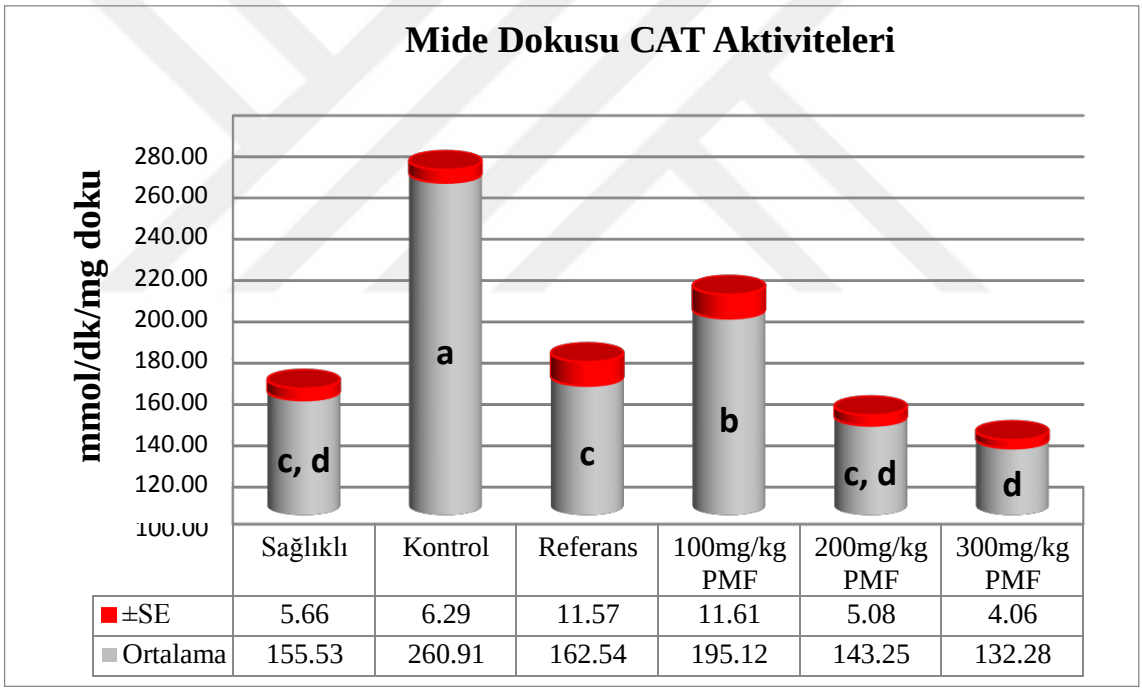
Şekil 4.7. Mide dokusu GSH seviyelerini gösteren grafik

Mide dokusu GSH seviyelerini gösteren Şekil 4.7 incelendiğinde kontrol grubunda GSH seviyesinin önemli oranda düştüğü tespit edilmiştir ($p<0.05$). SOD aktivitesine paralel seyreden GSH seviyeleri, yine benzer şekilde LPO seviyesi ve ülser alanları değerlerine ters bir seyirde olduğu görülmüştür. GSH düzeyi REF, PMF-100 ve PMF-200 gruplarında kontrol grubuna göre belirgin düzeyde arttığı gözlenmiş ve

birbiri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca PMF-300 grubunda ise GSH düzeyi sağlıklı gruptaki GSH düzeyinden daha yüksek bir değer olarak ölçülmüştür ($p<0.05$).

3.2.4. KAT Aktivitesi

Katalaz enzimi, canlının sahip olduğu antioksidan mekanizmada GSH' dan farklı bir mekanizmayla, enzimatik yolla peroksit radikallerinin etkisizleştirilmesinde görev alan önemli bir enzimdir. Katalaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi antioksidan mekanizmanın hangi yönde işlediğinin ortaya koyulmasında ve de antioksidan savunma gücünün belirlenmesinde önemli bir rol oynar.



	Sağlıklı	Kontrol	Referans	100mg/kg PMF	200mg/kg PMF	300mg/kg PMF
±SE	5.66	6.29	11.57	11.61	5.08	4.06
Ortalama	155.53	260.91	162.54	195.12	143.25	132.28

Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şekil 4.8. Mide dokusu KAT aktivitelerini gösteren grafik

Mide dokusu KAT aktivitesi ölçümlerini gösteren Şekil 4.8 incelendiğinde, IND uygulamasının KAT aktivitesini önemli oranda aktive ettiği görülmektedir ($p<0.05$). PMF-100 grubundaki katalaz enzim aktivitesi sağlıklı gruptan belirgin şekilde yüksek

değerde ölçülmüştür ($p<0.05$). Ancak PMF-200 ve PMF-300 grupları ile sağlıklı grup arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). REF grubunun katalaz aktivitesi PMF-100 grubundaki katalaz aktivitesinden düşük, PMF-300 grubundakinden yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı zamanda REF grubunun KAT aktivitesi sağlıklı ve PMF-200 gruplarındaki enzim aktivitesi arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Bunun dışında ülser alanı, LPO ve GSH seviyeleri ile SOD aktivitesinde de gözlenen PMF'in 200 ve 300 mg/kg dozlardaki etkileri, KAT aktivitesinde de benzer şekilde önemli farklar meydana getirmişlerdir ($p<0.05$).

4. TARTIŞMA

Tedavi amacıyla kullanılan bitkiler ilk voroluşumuzdan bu yana hayatımızda önemli bir yere sahiptir. Bitkileri bu kadar önemli kılan modern tıbbın gelişiminden önce insanların, doğadaki çoğu bitkiyi şifa olarak görmesiyle birlikte bu bitkileri kendilerini tedavi etmek amacıyla kullanmalarından ileri gelir. Diğer önemli sebeplerden birisi de bu bitkilerden izole edilen metabolitlerden doğal ilaç elde edilmesi ve bu sayede günümüz eczacılığın gelişiminde önemli rol oynamasıdır. Örneğin söğüt kabuğundan elde edilen salisilik asit, *Digitalis* ve salisil aldehit türlerinden izole edilen ve kalp rahatsızlığında kullanılan digitoksin, digoksin türevi doğal bileşikler bunlara örnek olarak gösterilebilir. Günümüz hastalıklarından en yaygın olanlar arasında gösterilen kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yaklaşık %70'ini bitkilerden elde edilen doğal ilaçlar oluşturmaktadır.[161]

Modern tıbbın gelişimiyle birlikte bitkilerin sahip olduğu iyileştirici etkisini meydana getiren etkenler üzerine ileri düzeyde çalışmalar yapılmış ve birçok faydalı buluş ortaya konmuştur. Günümüzde kullanılan sentetik ürünlere karşı elde edilen bu bitkisel kaynaklı maddeler, uygulama kolaylığı, azalan tedavi süresi, güvenli doz aralığının geniş olması, minimum yan etki, üretim ve elde etme maliyeti yönünden de üstünlükleri ortaya konulmuş ve insan hayatına kazandırılmıştır.[162]

Günümüz dünyasının en önemli hastalıkları arasında gösterilen ülser tedavisinde de bitkiler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bundan dolayı halk tıbbında değişik hastalıkların tedavisinde kullanılan ve daha önce yapılan çalışmalarda da ülsere karşı koruyucu etkisi belirlenen[15] *Maclura pomifera* bitkisinin, bu etkiyi hangi metabolit(ler) aracılığıyla gerçekleştirdiği ve etkinin mekanizmasının nasıl işlediğini tespit etmek amaçlanmış; dolayısıyla sunulan bu araştırmada *Maclura pomifera*

bitkisinden saflaştırılan pomiferin (PMF) maddesinin ratlarda indometazin (IND) ile oluşturulan akut mide hasarı üzerine antiülser etkisi araştırılmıştır.

Pomiferin üzerine hayvanlarda yapılan immünolojik çalışmalarda güçlü antimikrobiyal etkilerinin olduğu bildirilmiştir.[163-165]

Pomiferin antioksidan ve antimikrobiyal etki gösterdiği gibi yapılan *in vitro* çalışmalarda PMF meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanser hücreleri, böbrek kanseri dahil çeşitli tümör hücre hatları üzerine antitümör etkiler gösterdiği bildirilmiştir.[163-166]

Yapılan bir çalışmada PMF'nin total antioksidan kapasiteyi ve süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığı, malondialdehit oranını düşürerek böbrek fonksiyonlarının (kreatinin ve kandaki üre) iyileşmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.[167]

Yine pomiferinin etkileri üzerine yapılan çalışmalardan birisi de, iskemi ve reperfüzyona maruz kalan rat kalpleri üzerine kardiyo-koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiş bunun da lipid peroksidasyonu mekanizması üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir. Pomiferin, hücre membranında LPO seviyesini düşürerek serbest radikallere karşı savunma mekanizması oluşturarak bu etkiyi gerçekleştirir.[168, 169]

Bunlara ilaveten streptozotosin ile indüklenen diyabetik ratlarda pomiferin ve osajinin antidiyabetik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 100 ile 300 mg/kg/gün pomiferin uygulanan rat gruplarında 14 gün boyunca serum trigliserid miktarının azaldığı ve serum glukoz seviyesinde önemli bir düşüş meydana getirdiği gözlenmiştir. Ek olarak, diyabetik ratlarda insulin miktarı artarken normal ratlarda etkisinin olmadığı ve pomiferinin osajine göre daha iyi antidiyabetik etki gösterdiği bildirilmiştir.[170]

Ülser çoğunlukla mide, duodenum da görülürken az oranda da özefagusta görülür.[171] Ülsere sebep olan en önemli faktörler; midede *Helicobacter pylori* infeksiyonu[172], NSAİİ kullanımı ve gastrik asit salgısının artmasıdır. Bu faktörlerin yanısıra sigara, alkol ve glukokortikoid ilaç kullanımı, ağır stres altında kalmak, radyasyon ve kemoterapi de ülser oluşumasına sebep olan önemli etkenlerdir.[173-175]Ülser aynı zamanda, bazı psikiyatrik tedaviler esnasında da ortaya çıkmaktadır ve ülsere sebep olan bu tedaviler arasında en yaygın olarak depresyon gösterilmektedir. Çünkü selektif serotonin reuptake (geri emilim) inhibitörleri gibi antidepresanlar da gastrointestinal kanamalara neden olmaktadır.[176] Bu durumda ilaç kullanımına bağlı ülser oluşumunun öngörülebileceği kanısına varılabilir. Çünkü bu ilaçlardan bazıları ömür boyu kullanılmak zorunda kalınabilir.

Bunların yanısıra ülsere sebep olan faktörlerden birisi de stresdir. Stres ve ülser arasındaki ilişkiyi araştırmak için deneysel olarak immobilizasyon, soğukta bırakma ve yüzdürme yöntemleri denenmiştir.[177] Bu yöntemler kullanılarak yapılan incelemelerde stres, mast hücre degranülasyonuna sebebiyet vererkek histamin salınımını arttırmış, hipermotiliteye, mukus tabakasının zayıflamasına ve mide mukoza kan akışının bozulmasına neden olmuştur.[178-181]

Bunlara ilaveten stresin prostaglandinler, nörepeptitler ve nitrik oksit (NO) gibi midenin korunmasında görev alan ajanlar üzerinden mukozal savunmayı zayıflattığı bildirilmiştir.[182]

NSAİİ'lerin kullanımı ülserin ana sebeplerinden birisidir. Bu ilaçların kullanımı özellikle yaşlı popülasyonda (kronik romatizmal hastalıklar, eklem rahatsızlıkları vb. nedenlerle) artmış olup, her yaştan insanlarda kanamaya kadar varabilen komplikasyonlarla gastrik yaralar oluşturmaktadır.[183] Kullanım sıklığı bakımından en

üst sıralarda yer alan aspirin, ibuprofen ve indometazin gibi ağrı kesiciler, romatoid artrit ve diğer pek çok akut ve kronik inflamatuar problemlerin tedavisinde önemli bir yere sahipken, aynı zamanda midede diğer bir inflamasyon türü olan ülsere de neden olmaktadırlar. NSAİİ'ler birçok yan etkiye sahip olmalarının yanısıra en belirgin etkilerini gastrointestinal dokuda hasar oluşumuyla göstermektedir. Bu hasarın meydana gelmesinde, mide dokusundaki sitoprotektif prostaglandinlerin sentezini inhibe ederler ve buna bağlı olarak mukus ve bikarbonat sekresyonu, yüzey epitel hidrofobikliği ve mukozal kan akışı gibi midenin koruyucu mekanizmalarını devre dışı bırakmada etkin bir rol oynamaktadır. Meydana gelen bu değişimlerle beraber NSAİİ'ler, mide asidinin dokuda hasar vermek üzere bu yüzeyden içeriye doğru yayılır ve hemorajik (kanamalı) ülserlerin oluşmasına sebep olurlar. Ayrıca NSAİİ'ler lökotrien sentezini arttırarak tahrip edici etkilerini güçlendirmektedir.[184, 185]

Non-steroid antiinflamatuarlar yaygın sindirim sistemi inflamasyonlarına ve artan sindirim kanalı mukoza permeabilitesi ile karakterize enteropatiye neden olabilmektedirler. NSAİİ'lerin sebep olduğu bu durum klinik olarak gizli kan kaybı, demir eksikliği anemisi, malabsorbsiyon ve protein kaybına yol açan enteropati şeklinde sonuçlar gösterebilir.[186] Ayrıca, NSAİİ'ler inflamatuar bağırsak hastalıkları lezyonlarına benzer bulgular verebilir ve gelişmekte olan inflamatuar bağırsak hastalıklarının da aktive edebilirler.[187]

Non-steroid antiinflamatuar grubu ilaçların bazı formları da belirgin yan etkilere yol açtıkları bildirilmiştir. Özellikle bu grubun fitil formlarının, anüs ve rektumda inflamasyon, ülser ve darlıklara sebep olduğu belirtilmiştir.[187]

Kullanımı artan NSAİİ'lerin etkileri üzerine her ne kadar çeşitli araştırmalar yapılmış olsa da, genelde daha çok ülser üzerine yoğunlaşılmıştır. Diğer taraftan NSAİİ

grubu ilaçlar tüketim sıklığına bağlı olarak kendilerinin direkt yan etki göstermelerinin yanısıra, bu grup ilaçların gastrointestinal sistemde meydana getirdikleri yan etkileri azaltmak için kullanılan anti asitler, proton pompa inhibitörleri ve histamin reseptör antogonistleri (ranitidin, simetidin vb.) gibi ilaçların yan etki görülme sıklığı da, bu iki grubun birlikte kullanımıyla artmaktadır. Örneğin alüminyum ve magnezyum ihtiva eden antiasit grubu ilaçlar mide ve idrar pH'nı arttırır ve bundan dolayı zayıf asit yapısında olan NSAİİ'lerin emiliminin azalmasına neden olmaktadırlar.[2] Bu sebeple bu ilaçların etkinliğinin azalmasından dolayı daha fazla kullanımını gerektirir ve bu da yüksek ülser riskini ortaya çıkarmaktadır. Simetidin ve ranitidin gibi H_2 reseptör antogonistlerinin, ketoprofen, ibuprofen, naproksen, tenoksikam gibi NSAİİ'lerle az da olsa etkileşime girdikleri belirtilmektedir.[187]

H_2 reseptör antogonistleri asit salgısını baskılamakta ve mide pH'sını alkalileştirmektedir. Düşen pH'ya bağırsak florasındaki artışın eşlik etmesi ile mide içeriğinde daha fazla nitratlanma meydana gelir, dolayısıyla muhtemel kanserojenik etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu grup ilaçlardan olan simetidin ise bu kanserojenik nitratlı yapıyı kendi yapısında bulundurmaktadır. Aynı zamanda, H_2 reseptör antogonisti kullanan hastalarda sindirim sistemi kanserlerindeki artış dikkat çekmiştir.[8, 188, 189]

Ülser tedavisinde bu ilaçların yanı sıra çoğunlukla proton pompa inhibitörü (PPI) olan ilaçlar da (omeprazol, lasoprazol vs. gibi) kullanılmaktadır. PPI'lar mide dokusunda bulunan proton pompalarının (H^+/K^+ ATPaz) fonksiyonunu geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler ve bu mekanizmayla mide lümenine asit salınımını durdurmaktadırlar.[190]

Bu ilaçların yan etkilerini ortaya koyan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak; PPI kullanımı gastrin salgısını yüksek oranda arttırarak tümör oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir.[191] Menapoz geçirmiş ve sigara kullanan kadınların 2 yıldan fazla PPI kullanmaları sonucunda kemik erimesi ve kalça kırıklarının meydana geldiği rapor edilmiştir.[9] Amerika'da gönüllü deneklerle yapılan bir çalışmada reflü tedavisinde sıklıkla kullanılan someprazol ile gece uyku sırasında ortaya çıkan asitsiz reflü sayısının normalden 4 kat daha çok olduğu ve uyku kalitesinin olumsuz etkilendiği gözlenmiştir.[192]

Aynı zamanda PPI türevi ilaçların uzun süreli kullanımıyla çeşitli yan etkilerde meydana gelmektedir. Bunlardan en önemli olanları; hipomagnezemi[193,] mide mukozasının incelmesi[194] ,mide pH'sının azalmasıyla bakteriyel ishallerin artması[195], üst fundusta polip oluşumu[10], yaşlılarda B_{12} vitamini eksikliği[196], hasta olmayanlarda salgı azalması ve bağımlılık[197], kalp ritim bozuklukları[11] gibi yan etkilerdir.

Günümüzde ülser tedavisinde bu ilaç gruplarının kullanımıyla, elektif (koşullara bağlı) cerrahi gereksinimi azalmasına rağmen meydana gelen komplikasyonlar sonucu ihtiyaç duyulan acil gastrointestinal cerrahi operasyon sıklığında herhangi bir değişiklik olmamıştır.[183]

Deney hayvanları üzerinde yapılan ülser çalışmları genellikle NSAİİ'lerin ülser oluşumu yan etkisinden faydalanılarak yapılır. Buna bağlı olarak deney hayvanları üzerine uygulanan NSAİİ'ler kısa zamanda gastrik hasar meydana getirerek dokuda çeşitli patolojik değişiklikler meydana getirmektedirler.[198] Bu ilaçların yan etkilerinden yaralanılarak yapılan benzer araştırmalarda, IND'nin ratlara uygulanmasıyla mide dokusunun histopatolojisinde, hemoraji, makrofaj ağırlıklı mononükleer hücre

infiltrasyonları, nötrofil, epitel hücre döküntüleri ve konjesyonlar meydana geldiği bildirilmiştir.[14, 199]

İndometazin aynı zamanda bu değişikliklerin yanı sıra mide dokusu hücrelerinde de çeşitli değişiklikler meydana getirmektedir. Bu değişikliklerin başında antioksidan savunma mekanizmasının çıktığı söylenebilir. NSAİİ grubu ilaçları mide dokusunda prostaglandin sentezini inhibe ederek ülser oluşumunda önemli bir rol oynayarak ortaya çıkmaktadır.[200] Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar, IND gibi NSAİİ ilaçların etkilerinin sadece bu yolla ülser oluşturmadığı, aynı zamanda mide dokusu hücrelerinde antioksidan mekanizmanın dengesinde de bozulmalar meydana getirdikleri ortaya konulmuş ve bu mekanizmanın sebep olduğu bozulmalarda artan ROS miktarının da önemli derecede rol oynadığını göstermektedir.[4, 201] ROS miktarındaki artışla birlikte dokuda LPO seviyesi artar ve bu da ülser oluşumunun miktarını ve hızını da arttırmaktadır.[202, 203] Bunlara ek olarak, doku glukoz seviyesini azaltmaları[204], MPO ve NOS aktivitelerini de arttırmaları hasar oluşumundaki önemli etkilerinden sayılabilir.[205, 206]

Ratlara IND ile deneysel olarak oluşturulan ülser modelinde intraperitonal yolla verilen ozonun etkisinin olmadığı gibi ülser alanını arttırdığı bildirilmiştir.[207] Ortaya çıkan bu durumun sebebi ozonun peroksit radikalleri ile reaksiyona girmesi sonucu serbest radikalleri arttırması ve ortamda artan ROS miktarı ülseri iyileştirmekten ziyade oluşum sürecini kolaylaştırdığı düşünülebilir.[208, 209] Elde edilen bu bulgular ışığında ülser oluşumunda süperoksit radikallerinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Ülser oluşumunda süperoksit radikallerinin yanısıra hidroksil ($^{\cdot}OH$), hidrojen peroksit, nitrik oksit, peroksinitrit gibi radikallerin de çeşitli reaksiyonlarla

midede hasar oluşumunda önemli oranda sebebiyet verdikleri bilinmektedir.[4, 51, 140, 210-215].

İndometazin ile oluşturulan ülser modeli üzerine yapılmış taranan tüm çalışmalarda IND uygulanan kontrol grubu dokularında ülser oranına paralel bir LPO artışı gözlenmektedir.[6, 51, 198, 199, 201, 202, 216-229] Yine benzer bir çalışmada Chattopadhyay ve ark.[51] midede radikal miktarlarını ölçerek, IND verilen kontrol grubunda mide asidi ve radikal miktarlarının aşırı derecede arttığını, buna bağlı olarak da LPO seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada LPO ile ilgili elde edilen bulgular literatür ile uyum içerisindedir. Mevcut çalışmada da deney sonunda alınan mide dokularında kontrol grubu LPO seviyelerinin sağlıklı gruba oranla aşırı miktarda yüksek bulunmuş ve bunun sebebininde yukardaki bahsedilen ROS miktarındaki artışa bağlı olarak teşekkül ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, mevcut çalışmada tedavi gruplarında (100, 200 ve 300 mg/kg dozlarda PMF uygulanan) doza bağlı olarak LPO seviyelerinde dikkate değer bir azalma gözlenmesi, LPO ile ülser arasındaki ilişkiyi açıkça ortaya koymaktadır. Tüm bu verilerin ışığında LPO'nun sadece oksidatif stresin değil, aynı zamanda hücresel hasarlarında önemli bir indikatörü olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Organizmalar, ROS'nin oluşturduğu her türlü hasarı savuşturabilecek veya düzeltebilecek çok sayıda mekanizmaya sahip olduğundan dolayı bu zararlı radikallerin meydana getirdikleri olumsuz etkiler, primer olarak enzimler, sekonder olarak da antioksidan özelliği bulunan vitaminler, glutatyon, melatonin vb. birçok savunma ajanlarınca azaltılabilir veya engellenebilir.[184, 230]

Her ne kadar vücutta savunma mekanizmaları olsa da $O_2^{\cdot -}$, $^{\cdot}HO$ ve H_2O_2 gibi ROS miktarlarındaki artış veya birikme, membranların (lipidlerin), proteinlerin, ekstraselüler matriksteki glikozaminoglikanların ve hatta nükleik asitlerin yapılarını

bozabilirler. Buda zincirleme reaksiyonlarla hücre ölümüne ve doku hasarına neden birçok mekanizmayı başlatmasına sebep olur.[4, 140, 211, 212, 223, 229]

Vücutta savunma mekanizmasının ilk hattını iyi bir antioksidan olan SOD enzimi oluşturmaktadır. Süperoksit radikallerinin etkisiz hale getirilmesinde anahtar görev olan SOD enziminin aktivitesinin artması veya azalması aynı zamanda meydana gelmiş olan süperoksit radikal miktarı hakkında da bizlere fikir verebilir.[108] Ülser alanının ve LPO miktarının azalması bu ilk basamağın önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Süperoksit radikali zayıf bir radikal görülmesine rağmen; kendisinden daha tehlikeli ve hatta en tehlikeli ve zararlı kabul edilen hidroksil radikalinin oluşumunda önemli bir rolü vardır. Bunu en iyi şekilde ortaya koyan çalışmalardan biri de mide ortamında yapılan radikalik ölçümlerde hidroksil radikali miktarının 5 kata kadar artması açıkça ortaya koymaktadır.[51] Mide pariyetal hücreleri mide lümenine H^+ pompaladıklarından, ortamdaki süperoksit radikallerinin de bu protonlar ile birleşerek $^{\cdot}OH$ radikali miktarını arttırabileceğini düşünülmektedir.[5, 231]

Mevcut çalışmada alınan mide dokularındaki SOD aktivitesi göz önüne alındığında IND tarafından önemli derecede inhibe edildiği tespit edilmiştir. Uygulanan PMF'nin ise doza bağımlı olarak SOD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Yine çalışmamız da tedavi ilaçlarının artan doz miktarıyla SOD aktivitesinin daha çok artıp sağlıklı SOD aktivitesine yaklaştığı da tespit edilmiştir. Ajaikumar ve ark. [186] tarafından *Punica granatum* bitkisinin metanol ekstradının ratlarda aspirin ve etanol ile oluşturulan ülser üzerine yapılan bir çalışmada, bir NSAİİ grubu olan aspirinin SOD aktivitesini önemli oranda düşürdüğünü, verilen çeşitli dozlardaki ekstratın ise bu azalan aktiviteyi arttırdığı ve buna bağlı olarak da ülser alanlarının azaldığını bildirilmiştir.

Dengiz ve ark. [216] tarafından amiodaronun ratlarda IND ile oluşturulan ülser modeli üzerine yapılan bir çalışmada, IND verilen ratların mide dokularında SOD aktivitesinin önemli düzeyde azaldığını, amiodaronun ise azalan bu aktiviteyi arttırdığı belirtilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak diklofenak sodyum, meloksikam, ketoprofenil ve IND gibi çeşitli NSAİİ'ların da, rat mide dokularında SOD aktivitesini azalttıklarını ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır.[217, 224, 225, 232]

H_2O_2, her ne kadar eşlenmemiş bir elektron içermemesi sebebiyle gerçekte radikal olmasa da parçalanma ürünleri ROS olan; Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında ve/veya asidik ortamlarda süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek en zararlı ve reaktif özellikte olan hidroksil radikallerinin meydana gelmesinde rol alır.[66, 71, 184] Bundan dolayı ortamdaki H_2O_2'nin uzaklaştırılması önemlidir.

GPO ve KAT enzimleri, peroksitlerle mücadelede antioksidan savunma mekanizmasının ikinci basamağında yer almaktadır. Bu enzimler H_2O_2'yi suya dönüştürerek zayıf radikal gücünü ortadan kaldırırlar.[75, 83] Her iki enzimde H_2O_2 için yarışmaktadırlar.[233]

Çalışmada yapılan KAT aktivitesi ölçümlerinde, kontrol grubunda bu aktivitenin önemli derecede arttığı bulunmuştur. KAT aktivitesi üzerine hem referans ilaç hem de PMF' nin bütün dozları pozitif yönde etki göstererek katalaz seviyesini sağlıklı seviyesine yaklaştırmıştır. Bunun sonucunda ise ortamdan uzaklaştırılan H_2O_2'nin ileri derecede zararlı peroksit radikallerinin oluşumunu azalttığı hatta engellediği, bu sayede de ülsere karşı yapılan savunmada önemli bir katkı yaptığı düşünülmektedir. Mide dokusunda indometazin vasıtasıyla KAT aktivitesinin artırıldığı literatürlerde belirtilmiştir.[217, 232, 234]

Mide ve barsak dokularının korunmasında önemli görevleri bulanan GSH oksidatif yıkıma karşı iyi bir savunma elemanıdır.[130, 235-237] Bazı bitkisel kaynaklı

metabolitlerin LPO seviyesini düşürücü etkilerinin bulunduğunu ve bu etkinin ise GSH ve buna bağlı enzimlerin (GPO, GST ve GGT) miktarlarını arttırarak gerçekleştiği ortaya atılmıştır.[238, 239] Aynı zamanda çeşitli dokularda bulunan GSH ile buna bağlı enzimlerin antioksidan savunma ve detoksifikasyondaki rolleri sebebiyle önemli bir koruyucu faktör oldukları belirtilmiştir. [240-242]

Mevcut çalışmada kontrol grubu (IND) dokularında GSH miktarı sağlıklı dokularla mukayese edildiğinde anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu düşüşün, yukarıda da bahsedildiği şekilde radikal miktarındaki artışa bağlı olarak, ortamdaki GSH'nun tüketildiğini açıkça gözler önüne sermektedir. Diğer yandan REF ve PMF tedavi gruplarının tamamında tedaviye paralel GSH miktarlarındaki artış, oksidatif hasarın azaldığını işaret etmektedir. Tüm bu verilerden yola çıkarak GSH miktarının; direk olarak antioksidan savunmayı, indirek olarak ise oksidatif hasarı işaret eden bir belirteç olabileceği söylenebilir. Çünkü ROS'larla mücadelenin GSH'a kalması antioksidan savunmanın çalışmadığını, organizmanın son çare olarak elinde kalan GSH'ı kullandığını göstermektedir. Nitekim SOD enziminin inhibe olması da bunu doğrulamaktadır. Yine GSH miktarının azalmasının ortamdaki radikallere bağlandığını, dolayısıyla bu radikallerin miktarlarının arttığını doğrulamaktadır.

Kaplan ve ark.[218] tarafından ratlarda IND ile meydana getirilen gastrik oksidatif stres modeli üzerine yapılan bir çalışmada, IND uygulamasının rat mide dokusunda GSH miktarını önemli oranda azaltırken tedavi için uygulanan alfa-lipoik asitin ise azalan bu miktarı arttırdığı bildirilmiştir.

Halıcı ve ark [198] tarafından ratlarda IND ile oluşturulan gastrik hasar üzerine yapılan bir çalışmada, rat mide dokusunda GSH miktarı IND tarafından önemli düzeyde azaldığını, *Ramalina capitata* likeninden elde edilen su ve etanol ekstrelerinin ise azalan GSH miktarını arttırdığı belirtilmiştir.

Yakın zamanda, bitkisel kaynaklı birçok metabolitin NSAİİ'lerin uygulanılmasıyla oluşturulan akut mide hasarları üzerine olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Berenguer ve ark.[243] tarafından ratlarda NSAİİ (diklofenak sodyum) ile indüklenen gastrik hasar üzerine *Rhizophora mangle* bitkisi su ekstresinin etkisi incelenmiş ve oluşan hasarın bu ekstre tarafından önemli oranda azaltıldığı belirlenmiştir.

Monteiro ve ark. [244] tarafından *Lippia sidoides* bitkisinin yapraklarından elde edilen esansiyel yağların farelerde gastroprotektif (etanol modeli) ve antiinflamatuar (kulak ödemi modeli) etkisi incelenmiş, bu bitkiden elde edilen esansiyel yağların iyi gastroprotektif ve antiinflamatuar etki gösterdikleri bildirilmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen biyokimyasal analizler, istatistiksel analizler ve makroskobik analizler göz önüne alındığında, çalışma verileri ile mevcut literatürler benzerlik gösterdiği görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada *Maclura pomifera* bitkisinden saflaştırılan PMF maddesinin ratlarda IND ile oluşturulan ülser modeli üzerine etkileri araştırılmış olup, elde edilen sonuçlar PMF'nin ülser oluşumunu engellediği ve hatta günümüzde yaygın olarak kullanılan ranitidin gibi etken maddeli ilaçlardan daha etkili olduğunu göstermiştir.

Günümüzde ülser hastalığında yaygın olarak kullanılan ranitidin, lansaprazol ve famotidin gibi pozitif etki gösteren ilaçlara benzer olarak pomiferin etken maddesi de ileride yapılabilecek olan farmasötik teknolijik çalışmalar ile alternatif bir ilaç olarak piyasaya sürülebilir ve ülser tedavisinde kullanılabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Sung J, Kuipers E, El-Serag H. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2009, 29: 938-946.

2. Yoshida H, Mamada Y, Taniai N, Mineta S, Kawano Y, Mizuguchi Y, Kakinuma D, Kanda T, Tajiri T. Interactions between anti-ulcer drugs and non-steroidal anti-inflammatory drugs in cirrhotic patients with bleeding esophagogastric varices. *Hepato-Gastroenterology*, 2008, 56: 1366-1370.

3. Halıcı M. Bazı Likenlerden Izole Edilen Maddelerin Sıçanlarda Indometazin ile Oluşturulan Ülser Modelinde Antiülserojen Mekanizmalarının Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2007.

4. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 23: 8-18.

5. Das D, Banerjee RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1993, 125: 115-125.

6. Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1968, 4: 265-267.

7. Smith SM, Kvietys PR. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Critical Care Medicine*, 1988, 16: 892-898.

8. Farrow DC, Vaughan TL, Sweeney C, Gammon MD, Chow W-H, Risch HA, Stanford JL, Hansten PD, Mayne ST, Schoenberg JB. Gastroesophageal reflux disease, use of H2 receptor antagonists, and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Causes and Control*, 2000, 11: 231-238.

9. Gray SL, LaCroix AZ, Larson J, Robbins J, Cauley JA, Manson JE, Chen Z. Proton pump inhibitor use, hip fracture, and change in bone mineral density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative. *Archives of Internal Medicine*, 2010, 170: 765-771.

10. Jalving M, Koornstra J, Wesseling J, Boezen H, De Jong S, Kleibeuker J. Increased risk of fundic gland polyps during long-term proton pump inhibitor therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 24: 1341-1348.

11. Marcus GM, Smith LM, Scheinman MM, Badhwar N, Lee R. Proton Pump Inhibitors are Associated with Focal Arrhythmias. *The Journal of Innovations in Cardiac Rhythm Management*, 2010, 1: 85-89.

12. Yazıcı A. Peptik Ülser Hastalığı Değişiyor. İstanbul Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2008.

13. Atalay F, Halici MB, Mavi A, Cakir A, Kazaz C, Aslan A, Kufrevioglu OI. Antioxidant phenolics from Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. and Usnea longissima Ach. Lichen species. *Turkish Journal of Chemistry*, 2011, 35: 647-661.

14. Chatterjee A, Khatua S, Chatterjee S, Mukherjee S, Mukherjee A, Paloi S, Acharya K, Bandyopadhyay SK. Polysaccharide-rich fraction of Termitomyces eurhizus accelerate healing of indomethacin induced gastric ulcer in mice. *Glycoconjugate Journal*, 2013, 30: 759-768.

15. Aci R. Maclura Pomifera Bitkisinin Su Ekstresinin Ratlarda İndometazinle Oluşturulan Ülser Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması ve Antioksidan Mekanizmasını İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2013.

16. Jefferson G. The human stomach and the canalis gastricus (Lewis). *Journal of Anatomy and Physiology*, 1915, 49: 165.

17. Çelik M, Doğan E, Dobrucalı A. ATROFİK GASTRİT VE MİDEDE İNTESTİNAL METAPLAZİ. http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/atrofik-gastrit-ve-intestinal-metaplazi/. 06.07.2015.

18. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: Enhanced E-book*. 10. Baskı. Mississippi, Elsevier Health Sciences, 2010.

19. Ganong W. *Review of medical physiology*. 18. Baskı. United States, Appleton and Lange Stamford, CT, 1997.

20. Schubert M, Makhlouf G. Neural and paracrine regulation of gastrin and gastric acid secretion. *Gastroenterology*, 1996, 111: 837-838.

21. Silverthorn DU, Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC, Johnson BR. *Human Physiology: An Integrated Approach*. 5. Baskı. Pearson/Benjamin Cummings, 2009.

22. Kurata JH. Ulcer epidemiology: an overview and proposed research framework. *Gastroenterology*, 1989, 96: 569-580.

23. Szabo S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1987, 22: 21-28.

24. Rhoades R, Pflanzer RG. *Human Physiology*. 1. Baskı. Saunders College Publication, 1989.

25. Porth C, Matfin G. *Pathophysiology: Concepts of Altered Health States*. 7. Baskı. Lippincott Williams and Wilkins, 2005.

26. Iber FL. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology/Diagnosis/Management. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 1998, 279: 715-716.

27. Castillo-Rojas G, Cerbón MA, López-Vidal Y. Presence of Helicobacter pylori in a Mexican pre-Columbian mummy. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 119.

28. Kurata J, Haile B. Epidemiology of peptic ulcer disease. *Clinics In Gastroenterology*, 1984, 13: 289-307.

29. Swabb EA, Szabo S. *Ulcer Disease: Investigation and Basis for Therapy*. 17. Baskı. New York, Taylor and Francis, 1991.

30. Sullivan M, Yool D. Gastric disease in the dog and cat. *The Veterinary Journal*, 1998, 156: 91-106.

31. Vatn S, Sjaastad Ø, Ulvund M. Histamine in lambs with abomasal bloat, haemorrhage and ulcers. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2000, 47: 251-255.

32. Menteş N. *Klinik Gastroenteroloji*. 4. Baskı. Ankara, Sanem Matbaacılık San. ve Tic, 2005.

33. Memik F. *Her Yönüyle Peptik Ülser*. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.

34. Stern A, Hogan D, Isenberg J. A new method for quantitation of ion fluxes across in vivo human gastric mucosa: effect of aspirin, acetaminophen, ethanol, and hyperosmolar solutions. *Gastroenterology*, 1984, 86: 60-70.

35. Tache Y. CNS peptides and regulation of gastric acid secretion. *Annual review of physiology*, 1988, 50: 19-39.

36. Taché Y, Collu R. CNS mediated inhibition of gastric secretion by bombesin: independence from interaction with brain catecholaminergic, and serotoninergic pathways and pituitary hormones. *Regulatory Peptides*, 1982, 3: 51-59.

37. Silen W. Experimental models of gastric ulceration and injury. *American Journal of Physiology*, 1988, 255: G395-G402.

38. Smalley WE, Griffin MR. The risks and costs of upper gastrointestinal disease attributable to NSAIDs. *Gastroenterology Clinics of North America*, 1996, 25: 373-396.

39. Piper D, McIntosh J, Ariotti D, Fenton B, MacLennan R. Analgesic ingestion and chronic peptic ulcer. *Gastroenterology*, 1981, 80: 427-432.

40. Soll AH, Weinstein WM, Kurata J, McCarthy D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer disease. *Annals of Internal Medicine*, 1991, 114: 307-319.

41. Lockard Jr O, Ivey K, Butt J, Silvoso G, Sisk C, Holt S. The prevalence of duodenal lesions in patients with rheumatic diseases on chronic aspirin therapy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 1980, 26: 5-7.

42. Bonnevie O. Causes of death in duodenal and gastric ulcer. *Gastroenterology*, 1977, 73: 1000-1004.

43. Langman M, Cooke A. Gastric and duodenal ulcer and their associated diseases. *The Lancet*, 1976, 307: 680-683.

44. Chabner B, B. K. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics*. 10. Baskı. New York, McGraw-Hill, 2001.

45. Hawkey C, Rampton D. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology*, 1985, 89: 1162-1188.

46. Gold B, Blecker U. *Pediatric Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 2. Baskı. Philadelphia, WB Saunders, 1999.

47. Rasquin-Weber A. *Pediatric Clinical Gastroenterology*. 4. Baskı. St Louis Mosby, Year Book Inc., 1995: 174-215.

48. DuBois R, Eberhart C, Williams C. Introduction to eicosanoids and the gastroenteric tract. *Gastroenterology Clinics of North America*, 1996, 2: 267-277.

49. Supplisson S, Loo DD, Sachs G. Diversity of K+ channels in the basolateral membrane of restingnecturus oxyntic cells. *The Journal of Membrane Biology*, 1991, 123: 209-221.

50. Wilson DE. Role of prostaglandins in gastroduodenal mucosal protection. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 1990, 13: S65-71.

51. 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 and Medicine*, 2006, 40: 1397-1408.

52. Davenport H, Warner H, Code C. Functional Significance Of Gastric Mucosal Barrier To Sodium. *Gastroenterology*, 1964: 142-152.

53. Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract the double-edged sword. *Arthritis and Rheumatism*, 1995, 38: 5-18.

54. Lee M, Aldred K, Lee E, Feldman M. Aspirin-induced acute gastric mucosal injury is a neutrophil-dependent process in rats. *American Journal of Physiology*, 1992, 263: G920-G920.

55. Kauffman G. Aspirin-induced gastric mucosal injury: lessons learned from animal models. *Gastroenterology*, 1989, 96: 606-614.

56. Vane DSc F, John R, Botting PhD RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine*, 1998, 104: 2S-8S.

57. Roth SH. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy: new avenues for safety. *Clinical Interventions In Aging*, 2011, 6: 125.

58. Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 1991, 43: 109-142.

59. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 1998, 75: 199-212.

60. Dündar Y, Aslan R. *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*. 1. Baskı. Afyon, AKÜ Yayın, 2000: 1-35.

61. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 1984, 219: 1.

62. Weiss S, LoBuglio A. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 1982, 47: 5-18.

63. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2007, 12: 287-295.

64. Slater T, Cheeseman K, Davies M, Proudfoot K, Xin W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proceedings of The Nutrition Society*, 1987, 46: 1-12.

65. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals In Biology and Medicine*, 1985, 1: 3-25.

66. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 1995, 41: 1819-1828.

67. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological and pathological conditions. *Molecular Biotechnology*, 2007, 37: 2-4.

68. Aruoma OI. Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 8: 53-63.

69. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1993, 57: 715S-724S.

70. Ku H-H, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, 15: 621-627.

71. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 1993, 90: 7915-7922.

72. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of The Royal Society of Medicine*, 1989, 82: 747.

73. 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. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 1993, 38: 273-292.

74. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Medical Science Monitor,* 1998, 4: RA1089-RA1095.

75. Akkuş I. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. 1. Baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1995.

76. Georgieva N. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems—a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine,* 2005, 8: 1-11.

77. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, 1991, 37: 1932-1937.

78. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 1982, 47: 412-426.

79. Ames BN. Free Radicals: The Pros and Cons of Antioxidants. *American Society for Nutritional Sciences*, 2004, 134: 3164S–3168S.

80. Prichard M, Ducharme NG, Wilkins PA, Erb HN, Butt M. Xanthine oxidase formation during experimental ischemia of the equine small intestine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1991, 55: 310.

81. Doctor RB, Mandel LJ. Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury. *Journal of The American Society of Nephrology*, 1991, 1: 959-969.

82. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding Of Xanthine Oxidase To Vascular Endothelium Kinetic Characterization And Oxidative Impairment Of Nitric Oxide-Dependent Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 4985-4994.

83. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine*, 1985, 312: 159-163.

84. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2, 3-dioxygenase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 1971, 246: 7825-7826.

85. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. İçinde:*Cell Function and Disease*, Springer, 1989: 209-218.

86. Jana A, Agarwal S, Chatterjee S. Membrane lipid peroxidation by ultrasound: mechanism and implications. *Journal of Biosciences*, 1990, 15: 211-215.

87. Li J-M, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *Journal of The American Society of Nephrology*, 2003, 14: S221-S226.

88. Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory Investigation*, 1985, 53: 599-623.

89. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 1991, 91: S14-S22.

90. Panduri V, Weitzman SA, Chandel NS, Kamp DW. Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2004, 286: L1220-L1227.

91. Davies K, Goldberg A. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262: 8220-8226.

92. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Annals of Emergency Medicine*, 1986, 15: 1075-1083.

93. Goulart M, Batoreu M, Rodrigues A, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 2005, 20: 311-315.

94. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research; Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1999, 424: 83-95.

95. Long CA, Bielski BH. Rate of reaction of superoxide radical with chloride-containing species. *The Journal of Physical Chemistry*, 1980, 84: 555-557.

96. Cakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2004, 35.

97. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 2003, 329: 23-38.

98. Simpson J, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Gebicki J, Dean R. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochemical Journal*, 1992, 282: 621-624.

99. Epe B, Ballmaier D, Adam W, Grimm GN, Saha-Möller CR. Photolysis of N-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24: 1625-1631.

100. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 2002, 181: 219-222.

101. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 2003, 17: 1195-1214.

102. Jornot L, Petersen H, Junod A. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochemical Journal*, 1998, 335: 85-94.

103. Knaapen AM, Güngör N, Schins RP, Borm PJ, Van Schooten FJ. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 2006, 21: 225-236.

104. Knaapen AM, Schins RP, Polat D, Becker A, Borm PJ. Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002, 234-235: 143-151.

105. Odabasoglu F. Antioksidan Vitaminler, Konferans, 1999, Erzurum.

106. Bulucu D. Mide ülserlerinde melatonin antioksidan etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 1998.

107. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers V, Schafer FQ. A New Paradigm: Manganese Superoxide Dismutase Influences the Production of H2O2 in Cells and Thereby Their Biological State. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 41: 1338-1350.

108. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 1995, 64: 97-112.

109. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244: 6056-6063.

110. Halliwell B, Gutteridge J. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1990, 280: 1-8.

111. 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. *Microbiology*, 2001, 147: 3105-3111.

112. Mao GD, Thomas P, Lopaschuk G, Poznansky M. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 416-420.

113. Amorim AM, Gasques MD, Andreaus J, Scharf M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2002, 74: 433-436.

114. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81: 4343-4347.

115. Frew JE, Jones P. Structure and functional properties of peroxidases and catalases. *Advances In Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, 1984, 3: 175-212.

116. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH Kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 13908-13914.

117. Mills GC. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 229: 189-197.

118. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1967, 70: 158-169.

119. Pamuk T. Blood serum concentrations of selenium and glutathione peroxidase activity in Akkaraman sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2001, 25: 731-734.

120. Piorunska-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.

121. Tsai AC. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in the liver of cholesterol-fed rats. *The Journal of Nutrition*, 1975, 105: 946-951.

122. van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metabolism Reviews*, 2003, 35: 215-253.

123. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27: 951-965.

124. Thomas J, Maiorino M, Ursini F, Girotti A. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265: 454-461.

125. Pickett CB, Lu AY. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual Review of Biochemistry*, 1989, 58: 743-764.

126. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 1994, 344: 721-724.

127. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods in enzymology*, 1984, 113: 484-490.

128. Stryer L, Tymoczko J, Berg J. *Biochemistry*. 5. Baskı. United States, W.H. Freeman & Co Ltd, 2002.

129. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Harper'ın Biyokimyası*. 19. Baskı. İstanbul, Barış Kitabevi, 1998.

130. Hiraishi H, Terano A, Ota S, Mutoh H, Sugimoto T, Harada T, Razandi M, Ivey K. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. *Gastroenterology*, 1994, 106: 1199-1207.

131. Keha E, Kufrevioglu O. *Biyokimya*. Baskı. Erzurum, Aktif Yayınevi, 2007: 348-470.

132. Perpetuo EA, Souza CB, Nascimento CAO. Progress in molecular and environmental Bioengineering. İçinde:*Analysis and Modeling to Technology Applications*, 1. Baskı. Brazil, University of Sao Paulo, 2011: 605-632.

133. Siems W, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clinical Nephrology*, 2000, 53: S9-17.

134. Montgomery R, Contway T, Specter A. *Biyokimya Olgu Sunumlu*. 1. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2000.

135. Champe P, Harvey R. *Lippincott's Illustrated Reviews serisinden Biyokimya*. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 1997: 300-350.

136. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 1996, 96: 693-702.

137. Tariq M. Gastric anti-ulcer and cytoprotective effect of vitamin E in rats. *Research Communications In Chemical Pathology and Pharmacology*, 1988, 60: 87-96.

138. Erdem L. Peptik Ülser Tedavisinde Yeni İlaçlar. *Turkiye Klinikleri Journal of Gastroenterohepatology Special Topics*, 2009, 2: 46-54.

139. Neal K, Logan R. Potential gastrointestinal effects of long-term acid suppression with proton pump inhibitors. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2001, 15: 1085-1085.

140. Isenberg J, McQuaid K, Laine L, Walsh J. Acid-peptic disorders. *Textbook of Gastroenterology*, 1995, 1: 1241-1244.

141. Itoh M, Guth PH. Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology*, 1985, 88: 1162-1167.

142. Banerjee S, Hawksby C, Miller S, Dahill S, Beattie A, McColl K. Effect of Helicobacter pylori and its eradication on gastric juice ascorbic acid. *Gut*, 1994, 35: 317-322.

143. Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA, Motilva V, Herrerías JM, Martín MaJ. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: role of prostaglandins and inflammatory response. *Life Sciences*, 2004, 74: 873-884.

144. Whittle BJ. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 500: 427-439.

145. Anonim. Maclura pomifera (Raf.) C.K.Schneid. http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2501306. 04.07.2015.

146. USDA. Maclura pomifera (Raf.) C.K. Schneid. osage orange. http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=MAPO. 04.07.2015.

147. Armağan G. N-Metil- D-Aspartat Reseptörleri Aracılı Nörodejenarasyonda Bazı Nonsteroidal Antiiflamatuar İlaçların Nöroprotektif Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2011.

148. Girl B. My Osage Orange Trees: Holiday Craft. http://www.blimpygirl.com/personal-what-not/my-osage-orange-trees-holiday-craft. 13 Şubat 2014.

149. Tsao R, Yang R, Young JC. Antioxidant isoflavones in osage orange, Maclura pomifera (Raf.) Schneid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 6445-6451.

150. Teixeira DM, Costa C. Novel methods to extract flavanones and xanthones from the root bark of Maclura pomifera. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1062: 175-181.

151. Saloua F, Eddine NI, Hedi Z. Chemical composition and profile characteristics of Osage orange< i> Maclura pomifera</i>(Rafin.) Schneider seed and seed oil. *Industrial Crops and Products*, 2009, 29: 1-8.

152. Carlson GG, Jones VH. *Some notes on uses of plants by the Comanche Indians*. 1. Baskı. Michigan, University of Michigan Press, 1940.

153. Marek J, Vesela D, Lišková M, Žemlička M. Pomiferin. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 2003, 59: 127-128.

154. Guidobono F, Pagani F, Ticozzi C, Sibilia V, Pecile A, Netti C. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *British Journal of Pharmacology*, 1997, 120: 581-586.

155. Abdel-Wahab MH, Arafa HM, El-Mahdy MA, Abdel-Naim AB. Potential protective effect of melatonin against dibromoacetonitrile-induced oxidative stress in mouse stomach. *Pharmacological Research*, 2002, 46: 287-293.

156. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95: 351-358.

157. Sedlak JF, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 1968, 25: 192-205.

158. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, 34: 497-500.

159. Aebi H. Catalase in vitro. İçinde:Lester P (editör). *Methods in Enzymology*, 1. Baskı. Academic Press, 1984: 121-126.

160. SPSS. Statistical Packages for The Social Sciences. 2011, MAC.

161. Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2011, 11: 52-67.

162. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 2006, 27: 1-93.

163. Zhao D, Yao C, Chen X, Xia H, Zhang L, Liu H, Jiang X, Dai Y, Liu J. The fruits of Maclura pomifera extracts inhibits glioma stem-like cell growth and invasion. *Neurochemical research*, 2013, 38: 2105-2113.

164. Son IH, Chung I-M, Lee SI, Yang HD, Moon H-I. Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of Maclura pomifera. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2007, 17: 4753-4755.

165. Yang R, Hanwell H, Zhang J, Tsao R, Meckling KA. Antiproliferative activity of pomiferin in normal (MCF-10A) and transformed (MCF-7) breast epithelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011, 59: 13328-13336.

166. Bajer MM, Kunze MM, Blees JS, Bokesch HR, Chen H, Brauß TF, Dong Z, Gustafson KR, Biondi RM, Henrich CJ. Characterization of pomiferin triacetate as a novel mTOR and translation inhibitor. *Biochemical pharmacology*, 2014, 88: 313-321.

167. Bartošíková L, Nečas J, Bartošík T, Pavlík M, Fráňa P. Effect of pomiferin administration on kidney ischaemia-reperfusion injury in rats. *Interdisciplinary toxicology*, 2010, 3: 76-81.

168. Janoštíková E, Bartošíková L, Nečas J, Juřica J, Florian T, Bartošík T, Klusáková J, Suchý V, Lišková M, Frydrych M. Effects of pomiferin premedication on the

antioxidant status of rats with ischemia-reperfused kidney. *Acta Veterinaria Brno*, 2005, 74: 557-564.

169. Florian T, Necas J, Bartosikova L, Klusakova J, Suchy V, El Naggar E, Janostikova E, Bartosik T. Effects of prenylated isoflavones osajin and pomiferin in premedication on heart ischemie-reperfusion. *BIOMEDICAL PAPERS-PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC*, 2006, 150: 93.

170. Moon H-I. Effect of osajin and pomiferin on antidiabetic effects from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Natural product communications*, 2014, 9: 1723-1724.

171. Bumin O. *Sindirim Sistemi Cerrahisi (I)*. 1. Baskı. Ankara, İlksan Matbaası, 1987: 128-147.

172. Franceschi F, Genta RM, Sepulveda AR. Gastric mucosa: long-term outcome after cure of Helicobacter pylori infection. *Journal of Gastroenterology*, 2002, 37: 17-23.

173. Hughes JR, Gust SW, Keenan RM, Fenwick JW, Healey ML. Nicotine vs placebo gum in general medical practice. *The Journal of The American Medical Association*, 1989, 261: 1300-1305.

174. Mulholland M, Debas H. Chronic duodenal and gastric ulcer. *The Surgical Clinics of North America*, 1987, 67: 489-507.

175. Schiller L. *Cecil Textbook of Medicine*. 1. Baskı. Philadelphia, Saunders Company, 1988.

176. Güneş ML, Yazici E, Yazıcı AB, Ferah I, Çadırcı E. Antidepresan ilaçların gastrik ülser üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, 2013, 40.

177. Brodie D. Ulceration of the stomach produced by restraint in rats. *Gastroenterology*, 1962, 43: 107-109.

178. Cho C, Koo M, Garg G, Ogle C. Stress-induced gastric ulceration: its aetiology and clinical implications. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1992, 27: 257-262.

179. Guth PH. Gastric blood flow in restraint stress. *The American Journal of Digestive Diseases*, 1972, 17: 807-813.

180. Szabo S, Cho C. Animal models for studying the role of eicosanoids in peptic ulcer disease. İçinde:*Eicosanoids and The Gastrointestinal Tract*, Springer, 1988: 75-102.

181. Whittle B. *Protective mechanisms of the gastric mucosa*. 1. Baskı. New York, Churchil Livingstone, 1992: 81-101.

182. Hernandez DE, Stanley DA, Melvin JA, Prange Jr AJ. Role of brain neurotransmitters on neurotensin-induced gastric cytoprotection. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1985, 22: 509-513.

183. Üstüner MA, İlhan E, Şenlikçi A, Dadalı E, Gökçelli U, Üreyen O. Peptik Ülser Perforasyonlarinda Morbidite Ve Mortaliteye Etki Eden Faktörler. *İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 2013, 17: 37-43.

184. Ajaikumar K, Asheef M, Babu B, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by Punica granatum L.(pomegranate) methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96: 171-176.

185. Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, 292: 1161-1168.

186. Bjarnason I, Zanelli G, Smith T, Prouse P, Williams P, Smethurst P, Delacey G, Gumpel MJ, Levi AJ. Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology*, 1987, 93: 480-489.

187. Kucuksahin O, Turgay M. Analjezik, Antiinflamatuvar İlaçların Yan Etkileri ve Bunların Yönetimi. *İç Hastalıkları Dergisi*, 2013, 20: 39-47.

188. Feely J, Wormsley KG. New drugs. H2 receptor antagonists--cimetidine and ranitidine. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, 1983, 286: 695.

189. Moller H, Lindvig K, Klefter R, Mosbech J, Jensen OM. Cancer occurrence in a cohort of patients treated with cimetidine. *Gut*, 1989, 30: 1558-1562.

190. Richardson P, Hawkey CJ, Stack WA. Proton pump inhibitors. *Drugs*, 1998, 56: 307-335.

191. Poulsen A, Christensen S, McLaughlin J, Thomsen RW, Sørensen HT, Olsen J, Friis S. Proton pump inhibitors and risk of gastric cancer: a population-based cohort study. *British Journal of Cancer*, 2009, 100: 1503-1507.

192. Orr WC, Craddock A, Goodrich S. Acidic and non-acidic reflux during sleep under conditions of powerful acid suppression. *CHEST Journal*, 2007, 131: 460-465.

193. Cundy T, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clinical Endocrinology*, 2008, 69: 338-341.

194. Graham DY, Genta RM. Long-term proton pump inhibitor use and gastrointestinal cancer. *Current Gastroenterology Reports*, 2008, 10: 543-547.

195. Yearsley K, Gilby L, Ramadas A, Kubiak E, Fone D, Allison M. Proton pump inhibitor therapy is a risk factor for Clostridium difficile-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 24: 613-619.

196. Howden CW. Vitamin B12 levels during prolonged treatment with proton pump inhibitors. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2000, 30: 29-33.

197. Niklasson A, Lindstrom L, Simren M, Lindberg G, Bjornsson E. Dyspeptic symptom development after discontinuation of a proton pump inhibitor: a double-blind

placebo-controlled trial. *The American Journal of Gastroenterology*, 2010, 105: 1531-1537.

198. Halici M, Kufrevioglu OI, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aslan A. The Ethanol–Water Extract Of Ramalina Capitata Has Gastroprotective And Antioxidative Properties: An Experimental Study In Rats With Indomethacin-Induced Gastric Injuries. *Journal of Food Biochemistry*, 2011, 35: 11-26.

199. Thong-Ngam D, Choochuai S, Patumraj S, Chayanupatkul M, Klaikeaw N. Curcumin prevents indomethacin-induced gastropathy in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18: 1479.

200. Robert A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterology*, 1975, 69: 1045-1047.

201. Naito Y, Yoshikawa T, Yoshida N, Kondo M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 1998, 43: 30S-34S.

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

203. 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 Radical Biology and Medicine*, 1997, 23: 243-250.

204. Filaretova L, Tanaka A, Miyazawa T, Kato S, Takeuchi K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2002, 283: G1082-G1089.

205. Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, Takeuchi K. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacological Research*, 1999, 40: 517-524.

206. Whittle BJ, Laszlo F, Evans SM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. *British Journal of Pharmacology*, 1995, 116: 2286-2290.

207. Sarma A, Şahin A, Akdeniz CB, Şentürk E. Sıçanlarda Non-Steroidal Antiinflamatuvar İlaçla Oluşturulan Deneysel Peptik Ülser Modelinde Ozon Terapinin Koruyucu Etkisi, XII. Öğrenci Sempozyumu, 2010, Ankara 2.3.

208. Halliwell B. *Free Radicals and Other Reactive Species In Disease*. 1. Baskı. Singapore, Wiley Online Library, 2005.

209. Oguz E, Celik Z. Sularin Ozonlanmasindaki Gelişmeler. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 2011, 7.

210. Jainu M, Devi CSS. Gastroprotective action of< i> Cissus quadrangularis</i> extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 161: 262-270.

211. Jung HK, Lee KE, Chu SH, Yi SY. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2001, 16: 1336-1340.

212. Mizui T, Sato H, Hirose F, Doteuchi M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sciences*, 1987, 41: 755-763.

213. Neu S-L. Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127: 630-636.

214. 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. *Digestive Diseases and Sciences*, 1990, 35: 173-177.

215. Van Der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 1992, 12: 499-513.

216. Dengiz GO, Odabasoglu F, Halici Z, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y. Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 2007, 30: 1426-1434.

217. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of Usnea longissima on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine*, 2005, 12: 656-662.

218. Kaplan KA, Odabasoglu F, Halici Z, Halici M, Cadirci E, Atalay F, Aydin O, Cakir A. Alpha-Lipoic Acid Protects against Indomethacin-Induced Gastric Oxidative Toxicity by Modulating Antioxidant System. *Journal of Food Science*, 2012, 77: H224-H230.

219. Khattab MM, Gad MZ, Abdallah D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacological Research*, 2001, 43: 463-467.

220. Koc M, Imik H, Odabasoglu F. Gastroprotective and Anti-oxidative Properties of Ascorbic Acid on Indomethacin-induced Gastric Injuries in Rats. *Biological Trace Element Research*, 2008, 126: 222-236.

221. Mizoguchi H, Ogawa Y, Kanatsu K, Tanaka A, Kato S, Takeuchi K. Protective effect of rebamipide on indomethacin-induced intestinal damage in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2001, 16: 1112-1119.

222. Morsy MA, Fouad AA. Mechanisms of gastroprotective effect of eugenol in indomethacin-induced ulcer in rats. *Phytotherapy Research*, 2008, 22: 1361-1366.

223. Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nishimura S, Yagi M, Kondo M. Effects of free radical scavengers on indomethacin-induced aggravation of gastric ulcer in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 1995, 40: 2019-2021.

224. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 103: 59-65.

225. Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Aygun H, Suleyman H, Cadirci E, Atalay F. Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and α-tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 591: 300-306.

226. Sandor V, Cuparencu B, Dumitrascu DL, Birt MA, Krausz TL. Protective effects of amphetamine on gastric ulcerations induced by indomethacin in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12: 7168.

227. Takeuchi K, Ueshima K Fau - Hironaka Y, Hironaka Y Fau - Fujioka Y, Fujioka Y Fau - Matsumoto J, Matsumoto J Fau - Okabe S, Okabe S. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. *Digestion*, 1991, 49: 175-184.

228. Tanaka J, Yuda Y. Lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1996, 19: 716-720.

229. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Iinuma 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.

230. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 1997, 82: 291-295.

231. Perry M, Wadhwa S, Parks D, Pickard W, Granger D. Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology*, 1986, 90: 362.

232. Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 2006, 13: 584-590.

233. Cheung C, Siu W, Richardson B, De Luca-Abbott S, Lam P. Antioxidant responses to benzo [a] pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, Perna viridis. *Environmental Pollution*, 2004, 128: 393-403.

234. Karakus B, Odabasoglu F, Cakir A, Halici Z, Bayir Y, Halici M, Aslan A, Suleyman H. The effects of methanol extract of Lobaria pulmonaria, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. *Phytotherapy Research*, 2009, 23: 635-639.

235. Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 1987, 142: 23-29.

236. Sakurai K, Yamasaki K. Protective effect of rebamipide against hydrogen peroxide-induced hemorrhagic mucosal lesions in rat stomach. *Japanese Journal of Pharmacology*, 1994, 64: 229-234.

237. Jain A, Mårtensson J, Mehta T, Krauss AN, Auld P, Meister A. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects on lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89: 5093-5097.

238. Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 1993, 49: 481-493.

239. Prestera T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak CA, Talalay P. The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity. *Advances in Enzyme Regulation*, 1993, 33: 281-296.

240. Hayes JD, Pulford DJ. The Glut athione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the lsoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. *Critical Reviews In Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 30: 445-520.

241. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research; Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1988, 202: 343-361.

242. Van Lieshout E, Peters W, Jansen J. Effect of oltipraz, alpha-tocopherol, beta-carotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*, 1996, 17: 1439-1445.

243. Berenguer B, Sánchez L, Quilez A, López-Barreiro M, De Haro O, Galvez J, Martin M. Protective and antioxidant effects of Rhizophora mangle L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 103: 194-200.

244. Monteiro MVB, de Melo Leite AKR, Bertini LM, de Morais SM, Nunes-Pinheiro DCS. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of Lippia sidoides Cham. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 111: 378-382.

1, 2, 22

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı : İlyas BOZKURT **Doğum tarihi** : 17.05.1989 **Doğum yeri** : Erzurum **Medeni hali** : Bekar **Uyruğu** : T.C. **Adres** : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM **Tel** : 05412811992 **Faks** : **E-mail**: ibozkurt565@gmail.com
Eğitim
Lise: Sakarya Akyazı Lisesi (2006) **Lisans**: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2007-2011) **Yüksek lisans**: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı (2012-2015) **Doktora**:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: YDS 57,5, Nisan 2015 Almanca: …… Rusça: ……
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
…… ……
İlgi Alanları ve Hobiler
…… ……

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-**124**
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

29.08.2013
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

İlgi : 28.08.2013 tarih ve 77040475/17592 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Esra DİLEK'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülecek olan **"Maclura *Pomifera* Bitkisinden İzole Edilen Pomiferin Maddesinin Ratlarda İndometazin İle Oluşturulan Gastrik Hasar Üzerine Etkilerinin Araştırılması"** başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 29.08.2013 tarih ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 106 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan Vekili

Toplantı Tarihi : 29.08.2013
Toplantı Sayısı : 3
KARAR N0 : **106-** Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Esra DİLEK'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülecek olan **"Maclura *Pomifera* Bitkisinden İzole Edilen Pomiferin Maddesinin Ratlarda İndometazin İle Oluşturulan Gastrik Hasar Üzerine Etkilerinin Araştırılması"** başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 28.08.2013 tarih ve 77040475/17592 sayılı Atatürk Üniversitesi Hukuk Müşavirliğinin yazısı ekindeki Erzincan Üniversitesi Rektörlüğü, Genel Sekreterliğinin 28.08.2013 tarih ve 88012460.804.01/773-7695 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; Erzincan Üniversitesi Rektörlüğünde Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu olmadığından, Başkanlığımıza başvurulan adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 **Fax** : 0-442-236 08 81 **e-mail:** hadyek@atauni.edu.tr