



Usnea Longissima Ach. Liken Türününün Metanol Ekstresinin İn Vitro Sıçan Midesinde Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkisi*

Tubanur ASLAN¹, Fikret ÇELEBİ¹✉, Emin ŞENGÜL¹, Volkan GELEN², Ali ÇINAR¹

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
2. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received
27.03.2017

Kabul Tarihi/Accepted
06.06.2017

Yayın Tarihi/Published
20.12.2017

Öz: Likenler alternatif tıpta yaygın olarak kullanılan birliklerdir. Likenlerin biyolojik içerikleri ve etkinlikleri üzerine çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmada *Usnea longissima Ach.* liken türünden elde edilen metanol ekstresinin *in vitro* sıçan midesinde asit salgısı üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda Sprague-Dawley ırkı 24 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar anestezisi altında ötenazi edildiler. Mide dokusu izole edildi ve serozal solüsyon bulunan petri kabı içinde temizliği yapıldı. Mide içeriğinin boşaltılması işlemi ise mukozal solüsyon ile yapıldı. *Usnea longissima Ach.* metanol ekstresinin mide asit salgısı üzerine beş farklı dozunun (0.012 µg/ml, 0.12 µg/ml, 1.2 µg/ml, 12 µg/ml, 120 µg/ml) etkileri, izole organ banyosunda nöronal (asetilkolin) ve parakrin (histamin) yollarının antagonistlerinin varlığında ve yokluğunda araştırıldı. Sonuç olarak, *Usnea longissima Ach.* ekstraktının farklı dozlarının mide asit sekresyonunu önemli düzeyde artırdığı belirlendi. *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit salgısını artırıcı etkisinin histamin aracılı parakrin yolak üzerinden olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: ACh, Histamin, Likenler, Mide asit sekresyonu, *Usnea longissima Ach.*

Effect of Methanol Extract of *Usnea Longissima Ach.* Lichen Species on Gastric Acid Secretion in *In Vitro* Rat Stomach

Abstract: Lichens are unity that commonly used in the alternative medicine. There are numerous studies on the biologic contents and activities of lichens. In this study, it has aimed that to investigate the effect of methanol extract obtained from *Usnea longissima Ach* lichen species on acid secretion in *in vitro* rat stomach. Our study were used 24 adult male Sprague-Dawley rats. Rats were euthanized under anesthesia. The stomach tissue was isolated and cleaned in a petri dish containing serosal solution. Emptying stomach contents was done with mucosal solution. The effects of the five different doses (0.012 µg/ml, 0.12 µg/ml, 1.2 µg/ml, 12 µg/ml, 120 µg/ml) of *Usnea longissima Ach.* methanol extract on gastric acid secretion were investigated in the presence and absence of antagonists of neuronal (acetylcholine) and paracrine (histamine) pathways in the isolated organ bath. In conclusion, it was obtained that different doses of *Usnea longissima Ach.* extract increased significantly the gastric acid secretion. It was arrive the opinion that of the gastric acid secretion enhancing effect of *Usnea longissima Ach.*'s is via the histamine mediated paracrine pathway.

Keywords: ACh, Gastric acid secretion, Histamine, Lichens, *Usnea longissima Ach.*

✉ Fikret ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: fncelebi@atauni.edu.tr

*Bu makale "*Usnea Longissima Ach.* Liken Türününün Metanol Ekstresinin İn Vitro Sıçan Midesinde Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkisi" isimli yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

GİRİŞ

Likenler mantarlar ile siyanobakterilerden oluşan simbiyotik birliklerdir (1,2). Tüm dünya üzerinde ebat, form ve renk açısından son derece zengin 14.000 civarında liken türü mevcuttur (3). Dünya genelinde tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin toplam tür sayısı 15.000 civarındadır. Tedavi amacıyla kullanılan bu bitkiler arasında likenler önemli bir yer tutmaktadır (3-5). 20. yüzyılın ilk yarısına kadar likenlerin çok özel sekonder metabolitleri kimyasal olarak tam aydınlatılmadığından likenlerden tam anlamıyla istifade edilememiştir. Ancak 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren ince tabaka kromatografisi (TLC) yönteminin geliştirilmesiyle birlikte likenlerin yapısında bulunan bazı metabolitlerin aydınlatılmasıyla önemli bir yol kat edilmiştir. Bu sayede protolikesterik asit, pulvinik asit ve türevleri, fisodik, lobarik, fumarprotosetrarik ve usnik asit gibi yüksek biyolojik aktiviteli bileşikler elde edilmiştir (6-9). Likenlerin insanlardaki toksisitesiyle ilgili az sayıda veri bulunmakla birlikte, kaydedilmiş yan etkileri lokal tahrişler ve bazen konjuktivit ile beraber meydana gelen alerjik deri iltihabı ile sınırlıdır. Duyarlı kişilerde alerjiye neden olan liken asitleri arasında usnik, diffraktaik, lobarik, barbatik, salazinik ve stistik asit gibi birçok asit yer almaktadır (10-12). Farklı liken türlerinden elde edilen pulvinik, fisodik, protolikesterinik, lobarik ve usnik asidin antimikrobiyal etkili olduğu bilinmektedir (6,10,13). Bazı likenlerin sekonder metabolitleri insektisit etkiye sahiptir (14). Likenlerin antibakteriyel ve insektisit etkilerinin yanı sıra antiviral, antiprotozoal, antienflamatuvar, antitümoral, antioksidan, analjezik, antiproliferatif ve antiülserojenik etkilerinin olduğu ifade edilmektedir (3,6,7,10,15). Yapılan bir araştırmada *Usnea longissima Ach.*'nin farklı dozlarının, *in vitro* rat ileum düz kas kontraktilesini inhibe ettiği belirlenmiştir (16). *Usnea longissima Ach.*'nin indometazin ile indüklenen mide ülseri modelinde antiülserojenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (17). Birçok biyolojik aktivitesinin yanı sıra antiülserojenik etkili olduğu belirlenen *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit

sekresyonu üzerine etkisi ile alakalı literatür bilgiye rastlanılmamıştır. Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada *Usnea longissima Ach.*'nin metanol ekstresinin *in vitro* rat midesinde mide asit sekresyonu üzerine olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Usnea longissima Ach. Liken Türünün Temini

Bu araştırmada *Usnea longissima Ach.* liken türü kullanıldı ve liken örnekleri 2013 yılı Haziran-Ağustos aylarında Trabzon ili Maçka ilçesi Güzel Yayla bölgesinden toplandı. Örneklerin teşhisi likenoloji laboratuvarında yapıldıktan sonra yabancı bitkilerden arındırıldı ve daha sonra oda sıcaklığında kurutularak öğütücü yardımı ile toz haline getirildi.

Usnea longissima Ach. Ekstresi ve Total Ekstrenin Elde Edilmesi

Toz haline getirilen liken örneğinden 20 g alındı ve soxhlet cihazında metanol çözeltileri ile ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen ekstreler evapore edilerek bir kapta toplandı ve total ekstre +4°C'ta muhafaza edildi. 0.010 gr liken ekstresi %10'luk 10 mL DMSO'da çözündürülerek kullanıldı (8).

Kullanılan Deneysel Hayvanları

Bu araştırmanın deneysel çalışmaları Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışma, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.02.2014 tarih ve 36643897-52 sayılı yazısında belirtilen 254 nolu kararı ile onaylandı. Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen, ortalama 220 gr ağırlığında, Sprague-Dawley cinsi erişkin 24 adet erkek sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar standart bakım ve besleme şartlarına (12 saat aydınlık-12 saat karanlık, % 55-60 nem oranı ve 22 °C oda sıcaklığı, serbest su ve yem alımı) tabi tutuldu. Deneysel çalışmalardan 24 saat önce sıçanların midelerinin boşalması için yem kısıtlaması

uygulandı. Deneyler süresince etik kurallara özen gösterildi.

Sıçan Midesinin İzole Organ Preparatı Olarak Hazırlanması

Midenin boşalması için deneysel çalışmalara başlamadan 24 saat önce sıçanlar aç bırakıldı, ancak ad libitum su verildi. Ketamine hidroklorür (75 mg/kg) ve ksilazin (15 mg/kg) ile sedasyon sağlandı. Hayvanlar servikal dislokasyon metodu ile dekapite edildiler. Orta hattan abdomen açıldı ve mide çıkartılarak içinde serozal solüsyon (mM: NaCl 118, KCl 4.8, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.14, Na₂HPO₄ 15.9, CaCl₂ 0.65 ve glikoz 31.6; pH: 7.00) bulunan petri kabına alındı ve midenin çevresinde bulunan yağ ve bağ dokular temizlendi. Daha sonra mide içeriğinin boşaltılması amacıyla mide içi mukozal solüsyon (mM: NaCl 137, KCl 4.8, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.3, glukoz 30, pH: 5) ile yıkandı. Midenin iç ve dış temizliği yapıldıktan sonra 2 mm çapında 2 adet plastik kanül pilorus ve özefagus kısmına bağlandı. Mide lumeni bir peristaltik pompa yardımıyla (Kandol Kangaroo TM 924) özafagal kanülden pilorik kanüle doğru mukozal solüsyon ile dakikada 1 ml hızla perfüze edilerek temizlendi (18-20). Sonrasında mide, içerisinde serozal solüsyon ile dolu olan 20 ml'lik organ banyosuna yerleştirildi ve 37 °C sıcaklığa sahip olan ve %95 O₂ - %5 CO₂ oranında gaz karışımı ile gazlandırılan banyo ortamında 1 saatlik inkübasyon (dinlenme) periyoduna bırakıldı. Her 15 dk'da bir serozal solüsyon ve mide içerisine perfüze edilen mukozal solüsyon yenisi ile değiştirildi.

Mide Salgısının Elde Edilmesi

Bir saatlik dinlenme periyodundan sonra herhangi bir kimyasal ajan ile uyarılmamış istirahat halindeki mideden elde edilen mukozal sıvının pH'sı pH metre (1131 Hanna Instruments model) ile ölçülerek bazal pH olarak belirlendi. Daha sonra parakrin (Histamin yolağı) ve nöronal yolak (ACh yolağı) agonistleri ile mide asit sekresyonu uyarılarak pH değeri elde edildi. Sonrasında banyoda parakrin ve nöronal yolakların antagonistleri, sırasıyla, famotidin (10⁻⁶ M) ve atropin (10⁻⁶ M) varlığında Histamin (10⁻⁴ M) ve ACh (10⁻⁶ M) ile mide asit sekresyonu indüklenerek pH değerleri elde edildi. Son olarak banyoda famotidin ve atropin varlığında ve yokluğunda *Usnea longissima Ach.* metanol ektresinin beş farklı dozunun (0.012 µg/ml, 0.12 µg/ml, 1.2 µg/ml, 12 µg/ml, 120 µg/ml) uygulanmasından sonra elde edilen mukozal içeriğin pH değerleri bazal pH ile karşılaştırılarak aşağıda belirtilen formül ile ΔpH'lar hesaplandı. ΔpH kimyasal ajanlar ve/veya *Usnea longissima* ektresinin dozları uygulandıktan sonra elde edilen pH değerlerinin ortalamaları ile bazal pH değerlerinin ortalamaları arasındaki farkı ifade etmektedir (17,18).

$$\Delta p\bar{H} = p\bar{H}_1 - p\bar{H}_0$$

$p\bar{H}_1$ = deneylerden elde edilen ortalama pH değeri

$p\bar{H}_0$ = ortalama bazal pH değeri

Kimyasal ajanlar ve *Usnea longissima Ach.* ektresinin farklı dozlarının serozal ortama uygulanması Tablo 1 ve Tablo 2'de belirlenen protokole göre yapıldı.

Tablo 1. Famotidin varlığında ve yokluğunda *Usnea Longissima Ach.*'nin farklı dozlarının mide asit sekresyonu üzerine etkisinin belirlendiği deneysel protokol.

Table 1. The experimental protocol which was determined the effect of different doses of *Usnea Longissima Ach.* on gastric acid secretion in the presence and absence of famotidine.

Zaman	Prosedür	Reaksiyon	Test Döngüsü
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	I
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü (Bazal pH)
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	II
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü (Bazal pH)
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	III
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü (Bazal pH)
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı IV
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa ACh (10^{-6} M/ml) uygulandı	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı V
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa Atropin(10^{-6} M/ml)+ ACh(10^{-6} M/ml) uygulandı	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı VI
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa <i>Usnea longissima Ach.</i> (0.012 µg/ml dozu)	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı VII
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa Atropin(10^{-6} M/ml) + <i>Usnea longissima Ach.</i> (0.012 µg/ml dozu)	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü

**Usnea longissima Ach.*'nin 0.12, 1.2, 12 ve 120 µg/ml dozları sırayla VI. ve VII. aşamalarda yukarıdaki protokole göre çalışıldı.

Tablo 2. Atropin varlığında ve yokluğunda *Usnea Longissima Ach.*'nin farklı dozlarının mide asit sekresyonu üzerine etkisinin belirlendiği deneysel protokol.

Table 2. The experimental protocol which was determined the effect of different doses of *Usnea Longissima Ach.* on gastric acid secretion in the presence and absence of atropine.

Zaman	Prosedür	Reaksiyon	Test Döngüsü
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	I
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü (Bazal ph)
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	II
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü (Bazal ph)
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	III
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü (Bazal ph)
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı IV
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa Histamin (10^{-4} M/ml) uygulandı	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı V
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa Famotidin (10^{-6} M/ml) +Histamin (10^{-4} M/ml) uygulandı	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı VI
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa <i>Usnea longissima Ach.</i> (0.012 µg/ml dozu).	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü
5 dk	2 kez yıkama	Serozal ve mukozal taraf yıkandı	Bu işlem 3 kez yapıldı VII
2 dk	Mide içi infüzyonu	2 ml mukozal solüsyon peristaltik pompa (1 ml/dk) ile mideye verildi.	
	İlaç uygulaması	Serozal tarafa Famotidin (10^{-6} M/ml) + <i>Usnea longissima Ach.</i> (0.012 µg/ml dozu).	
10 dk	Beklendi		
2 dk	Numune alınması	2 ml mide içeriği toplandı.	pH ölçüldü

**Usnea longissima Ach.*'nin 0.12, 1.2, 12 ve 120 µg/ml dozları sırayla VI. ve VII. aşamalarda yukarıdaki protokole göre çalışıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 20 istatistik programı kullanılarak

yaşandı. Veriler One Way ANOVA'da Tukey testi ile değerlendirildi. Değerler, ortalama \pm SD olarak verildi. $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Usnea longissima Ach.'nın Atropin Varlığında ve Yokluğunda Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkisi

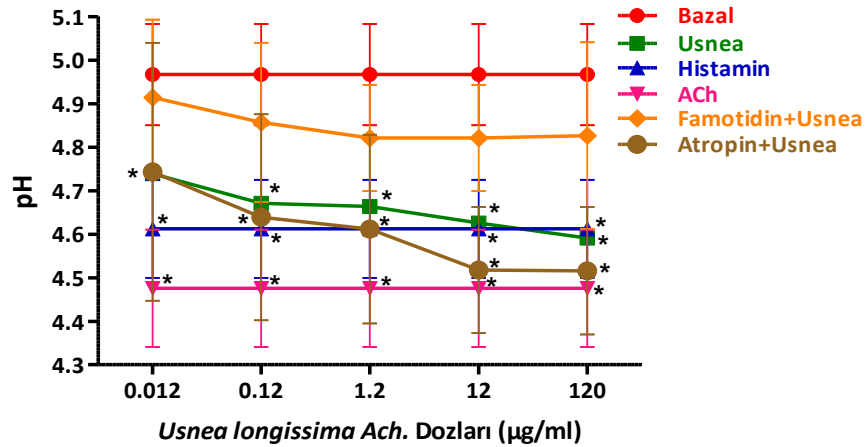
Usnea longissima Ach.'nin 0.012 ve 0.12 µg/ml dozunun mide asit salgısını artırmadığı, 1.2, 12 ve 120 µg/ml dozlarının banyoya uygulanması sonrasında elde edilen mukozal içeriğin pH'sı bazal pH ile

karşılaştırıldığında mide asit salgısının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($P < 0.05$, $n=12$, Tablo 3 ve Şekil 1, 2). Ayrıca *Usnea longissima Ach.*'nin farklı dozlarının mide asit sekreyonunu artırıcı etkisinin, banyoda atropin varlığında da devam ettiği görüldü ($P < 0.05$, $n=12$, Tablo 3 ve Şekil 1, 2).

Tablo 3. *Usnea longissima Ach.*'nin farklı dozlarının, banyoda atropin varlığında ve yokluğunda mide asit sekresyonu üzerine etkisi. Aynı satırda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (ab: $P < 0.0001$; ac: $P < 0.001$; bc: $P < 0.01$, $n=12$).

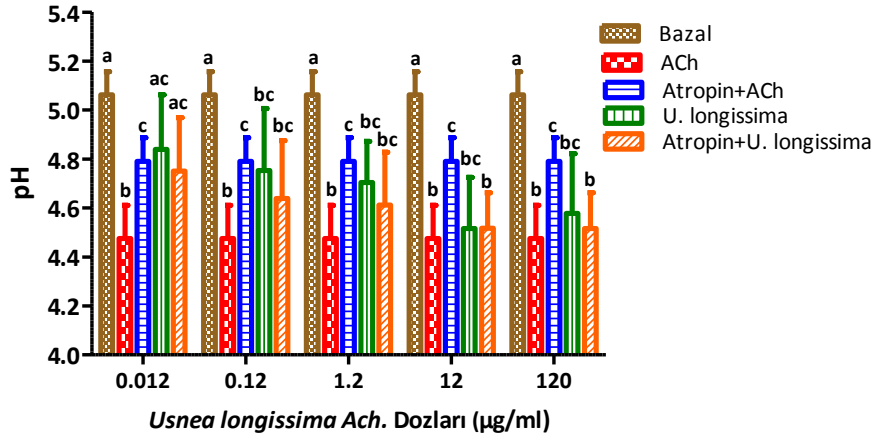
Table 3. Effect of different doses of *Usnea longissima Ach.* on the gastric acid secretion in the presence and absence of atropine in the bath. The values indicated by different letters on the same line are statistically different from each other (ab: $P < 0.0001$; ac: $P < 0.001$; bc: $P < 0.01$, $n=12$).

<i>Usnea longissima</i> Dozları		Bazal n=12 $\bar{X} \pm SD$	ACh(10^{-6}) n=12 $\bar{X} \pm SD$	Atropin(10^{-6} M) +ACh(10^{-6} M) n=12 $\bar{X} \pm SD$	Usnea µg/ml n=12 $\bar{X} \pm SD$	Atropin(10^{-6} M) + Usnea µg/ml n=12 $\bar{X} \pm SD$
0.012µg/ml	pH	5.06±0.09 ^a	4.47±0.13 ^b	4.79±0.09 ^c	4.8±0.29 ^{ac}	4.74±0.29 ^{ac}
	ΔpH	0	-0.58±0.19	-0.27±0.15	-0.26±0.27	-0.32±0.28
0.12µg/ml	pH	5.06±0.09 ^a	4.47±0.13 ^b	4.8±0.29 ^c	4.71±0.36 ^{ac}	4.63±0.23 ^{bc}
	ΔpH	0	-0.58±0.19	-0.27±0.15	-0.34±0.31	-0.41±0.22
1.2µg/ml	pH	5.06±0.09 ^a	4.47±0.13 ^b	4.8±0.29 ^c	4.70±0.32 ^{bc}	4.61±0.21 ^{bc}
	ΔpH	0	-0.58±0.19	-0.27±0.15	-0.35±0.29	-0.45±0.23
12µg/ml	pH	5.06±0.09 ^a	4.47±0.13 ^b	4.8±0.29 ^c	4.51±0.20 ^{bc}	4.51±0.14 ^b
	ΔpH	0	-0.58±0.19	-0.27±0.15	-0.54±0.19	-0.56±0.18
120µg/ml	pH	5.06±0.09 ^a	4.47±0.13 ^b	4.79±0.29 ^c	4.57±0.24 ^{bc}	4.51±0.14 ^b
	ΔpH	0	-0.58±0.19	-0.27±0.15	-0.39±0.36	-0.45±0.32



Şekil 1. *Usnea longissima Ach.*'nin farklı dozlarının, banyoda famotidin ve atropin varlığında ve yokluğunda mide asit sekresyonu üzerine etkisi ($*P < 0.05$, $n=12$).

Figure 1. Effect of different doses of *Usnea longissima Ach.* on the gastric acid secretion in the presence and absence of famotidine and atropine in the bath ($*P < 0.05$, $n=12$).



Şekil 2. Bazal pH ve banyoda atropin varlığında ve yokluğunda ACh (10^{-6} M) ve *Usnea longissima* Ach.'nin farklı dozlarının uygulanması sonucunda elde edilen mide içeriği pH değerleri (Aynı harflerle ifade edilen sütunlar arasında istatistiksel farklılık yoktur, ab: $P<0.0001$; ac: $P<0.001$; bc: $P<0.01$).

Figure 2. Basal pH and obtained stomach contents pH values as a result of application of different doses of ACh (10^{-6} M) and *Usnea longissima* Ach. in the absence and presence of atropine in the bath (There are no statistical differences between columns expressed with same letters, ab: $P<0.0001$; ac: $P<0.001$; bc: $P<0.01$).

Usnea longissima Ach.'nin Famotidin Varlığında ve Yokluğunda Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkisi

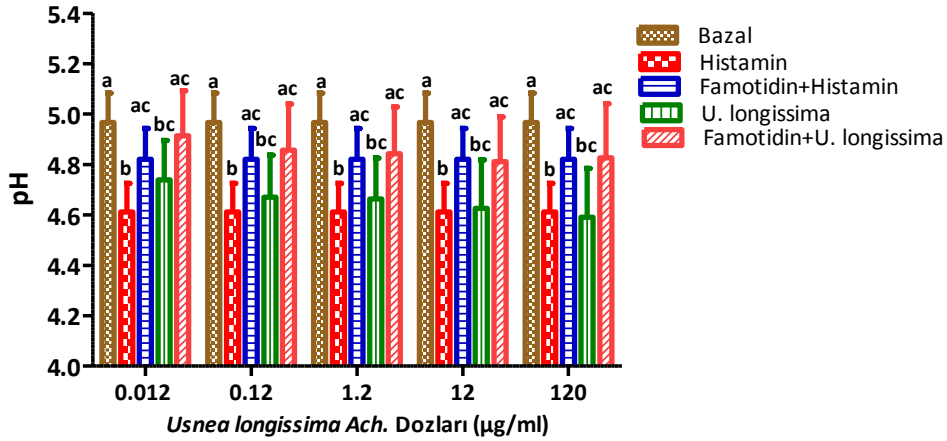
Usnea longissima Ach.'nin beş farklı dozunun (0.012, 0.12, 1.2, 12 ve 120 µg/ml) banyoya uygulanması sonrasında elde edilen mukozal içeriğin pH'sı bazal pH ile karşılaştırıldığında mide asit

salgısının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($P<0.05$, $n=12$, Tablo 4 ve Şekil 1, 3). Banyoda famotidin varlığında, *Usnea longissima* Ach.'nin farklı dozlarının mide asit sekresyonunu artırmadığı belirlendi ($P>0.05$, $n=12$, Tablo 4 ve Şekil 1, 3).

Tablo 4. *Usnea longissima* Ach.'nin farklı dozlarının, banyoda famotidin varlığında ve yokluğunda mide asit sekresyonu üzerine etkisi. Aynı satırda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (ab: $P<0.0001$; ac: $P<0.01$, $n=12$).

Table 4. Effect of different doses of *Usnea longissima* Ach. on the gastric acid secretion in the presence and absence of famotidine in the bath. The values indicated by different letters on the same line are statistically different from each other (ab: $P<0.0001$; ac: $P<0.01$, $n=12$).

<i>Usnea longissima</i> Dozları		Bazal n=12 $\bar{X}\pm SD$	Histamin(10^{-4}) n=12 $\bar{X}\pm SD$	Famotidin(10^{-6} M)+Histamin(10^{-4} M)	Usnea µg/ml n=12 $\bar{X}\pm SD$	Famotidin(10^{-6} M)+Usnea µg/ml
				n=12 $\bar{X}\pm SD$		n=12 $\bar{X}\pm SD$
0.012µg/ml	pH	4.96±0.11 ^a	4.61±0.11 ^b	4.82±0.12 ^{a ac}	4.73±0.15 ^{bc}	4.91±0.17 ^{ac}
	ΔpH	0	-0.35±0.08	-0.17 ±0.09	-0.23±0.11	-0.05±0.01
0.12µg/ml	pH	4.96±0.11 ^a	4.61±0.11 ^b	4.82±0.12 ^{a ac}	4.67±0.16 ^{bc}	4.85±0.18 ^{ac}
	ΔpH	0	-0.35±0.08	-0.17±0.09	-0.29±0.1	-0.11±0.05
1.2µg/ml	pH	4.96±0.11 ^a	4.61±0.11 ^b	4.82±0.12 ^{a ac}	4.66±0.16 ^{bc}	4.84±0.18 ^{ac}
	ΔpH	0	-0.35±0.08	-0.17±0.09	-0.30±0.09	-0.12±0.04
12µg/ml	pH	4.96±0.11 ^a	4.61±0.11 ^b	4.82±0.12 ^{a ac}	4.62±0.19 ^{bc}	4.81±0.17 ^{ac}
	ΔpH	0	-0.35±0.08	-0.17±0.09	-0.34±0.12	-0.15±0.04
120µg/ml	pH	4.96±0.11 ^a	4.61 ± 0.11 ^b	4.82±0.12 ^{a ac}	4.59 ± 0.19 ^{bc}	4.82 ± 0.21 ^{ac}
	ΔpH	0	-0.35±0.08	-0.17 ±0.09	-0.37±0.08	-0.14±0.05



Şekil 3. Bazal pH ve banyoda famotidin varlığında ve yokluğunda histamin (10^{-4} M) ve *Usnea longissima* Ach.'nın farklı dozlarının uygulanması sonucunda elde edilen mide içeriği pH değerleri (Aynı harflerle ifade edilen sütunlar arasında istatistiksel farklılık yoktur, ab: $P<0.0001$; ac: $P<0.01$).

Figure 3. Basal pH and obtained stomach contents pH values as a result of application of different doses of Histamine (10^{-4} M) and *Usnea longissima* Ach. in the absence and presence of atropine in the bath (There are no statistical differences between columns expressed with same letters, ab: $P<0.0001$; ac: $P<0.01$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Antiinflammatuar, anti-ülserojenik ve antioksidan etkileri olan *Usnea longissima* Ach., çeşitli biyolojik aktivitelere sahip birçok bileşik ihtiva etmektedir. Bu bileşiklerin en önemlilerinden birisi olan usnik asitin organizmada farklı etkilerinin yanı sıra gastrik asit sekresyonunu etkilediği belirlenmiştir (21). *Usnea longissima* Ach.'dan elde edilen metanol ekstresi, insan lökosit hücrelerinde aflatoksin B1'in neden olduğu SOD ve GPx enzimlerinin aktivitelerindeki azalmayı ve lipid peroksidasyonundaki artışı anlamlı düzeyde engellemiştir (22). *Usnea longissima* Ach.'nın metanol ekstresinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir (23). Halıcı ve ark. (17) *Usnea longissima*'nın sulu ekstraktının indometazin ile indüklenen mide ülseri üzerine protektif etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. Farklı bir çalışmada ise sıçanlarda indometazin ile oluşturulan mide ülseri modelinde *Usnea longissima* Ach.'dan izole edilen usnik asidin gastroprotektif etkili olduğu rapor edilmiştir (24). *Usnea longissima* Ach.'nın sulu ekstraktının ve bazı

bileşiklerinin mide ülser modellerinde protektif etkinliği belirlenmesine rağmen, *Usnea longissima* Ach.'nın metanol ekstresinin *in vitro* mide asit sekresyonu üzerine etkileriyle alakalı araştırmaya rastlanılmamıştır. Yaptığımız çalışmada, izole edilmiş rat midesinde ortamda parakrin yolak antagonisti olan famotidin ve nöronal yolak antagonisti olan atropin varlığında ve yokluğunda *Usnea longissima* Ach. metanol ekstresinin beş farklı dozunun mide asit sekresyonu üzerine etkileri ayrı ayrı araştırılmıştır. Mide mukozasında bulunan parietal hücrelerin uyarılması ile salgılanan mide asit salgısı, üç farklı yolağın idare edilmektedir. Bu yolağın; parakrin uyarılma olarak bilinen histamin yolağı, nöronal uyarılma denilen ACh yolağı ve hormonal uyarılma diye bilinen gastrin yolağıdır (25-28).

Histamin midenin mukozal yüzeyinde bulunan enterokromafin (ECL) hücrelerinden salgılanır (29) ve parietal hücreler üzerinde bulunan H_2 reseptörlerine bağlanarak bu hücrelerde adenilat siklazın aktivasyonuna neden olur (30). Adenilat siklaz enziminin aktivasyonu ile siklik adenosin monofosfat (cAMP) oluşumu artar. Artan cAMP,

parietal hücre ile kanalikuli arasında H^+ ve K^+ iyonlarının taşınımını sağlayan proton pompasının aktivasyonuna neden olur. Bu pompanın aktive olması ile parietal hücrelerden kanalikuliye yüksek konsantrasyonda salınan H^+ kanalikulide bulunan Cl^- ile birleşir ve HCl oluşur (25,31-34). Çalışmamızda *Usnea longissima Ach.* metanol ekstresinin farklı dozlarının mide asit sekresyonunu artırdığı belirlendi. Ancak banyo ortamında H_2 reseptör antagonisti olan famotidin varlığında *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit sekresyonunu etkilemediği görüldü ve *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit sekresyonunu artırıcı etkisinin parakrin yolak üzerinden olduğu düşünüldü.

Mide asit sekresyonunu uyarıcı bir diğer ajan olan ACh, pariyetal hücreler üzerinde bulunan muskarinik M_3 reseptörlerine bağlanarak asit salgısını direkt olarak uyarır. Asit salgısının nörojenik (M_3 muskarinik) yoldan uyarılması, intrasellüler kalsiyum salınımına ve inozitol trifosfat (IP3) üretimiyle fozfolipaz C aktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda proton pompası aktive olur ve parietal hücrelerden kanalikuliye yüksek konsantrasyonda H^+ salınması sonucunda HCl oluşur (25,31,34-36). *Usnea longissima Ach.*'nin çeşitli dozlarının mide asit salgısı artırdığını belirlediğimiz araştırmamızda banyo ortamında M_3 reseptör antagonisti olan atropin varlığında *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit salgısı üzerine etkisini değerlendirdik. Bu durumda *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit sekresyonunu uyardığı ve ortamda atropin varlığının *Usnea longissima Ach.*'nin etkinliğini önleyemediği belirlendi. Böylece *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit sekresyonunu uyarıcı etkisinin nöronal yolak üzerinden olmadığı düşünüldü.

Parietal hücrelerden salınan HCl salgısının uyarılmasında söz konusu olan üçüncü yolak ise hormonal yolak olarak ifade edilmektedir. Midede ve Gastrointestinal kanalın diğer bölümlerinden bulunan G hücreleri (Gastrin Hormonu Üreten hücreler) tarafından üretilen Gastrin hormonu gerek parietal hücre üzerinde bulunduğu ifade edilen CCK_2 reseptörlerini direkt uyararak ve gerekse ECL

hücreleri üzerinde bulunan CCK_2 reseptörlerini uyarıp histamin salınımına yol açmaktadır (28,37). Histaminin ise parakrin olarak parietal hücre üzerinde bulunan H_2 reseptörlerini uyararak parietal hücrelerden asit salınımını uyarmaktadır (31). Gastrin endokrin mekanizmalar üzerinden mide asit salgısında etkili olduğu için in vitro sistemde bu mekanizmanın etkinliği ihmal edilebilir sayılmıştır. Bu nedenle çalışmada endokrin yolak üzerinde herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

Sonuç olarak, *Usnea longissima Ach.*'nin farklı dozlarının mide asit sekresyonunu uyardığı, bu etkinin Histamin yolağı (H_2 reseptörü) üzerinden gerçekleştiği belirlendi. Bulgularımız doğrultusunda *Usnea longissima Ach.*'nin mide ülseri modelinde protektif etkisinin mide asit sekresyonunun inhibisyonuyla olamayacağı, *Usnea longissima Ach.*'nin antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden kaynaklanan bir etkinliğin sonucu olabileceği düşünülebilir. *Usnea longissima Ach.*'nin mide asit salgısını uyardığı sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, mide ülserinin tedavisine *Usnea longissima Ach.*'nin katkısını mide asit salgısını uyarıcı etkisi ile beraber değerlendirmek gerekmektedir. Ayrıca *Usnea longissima Ach.*'nin farklı dozlarının mide asit sekresyonunu uyarıcı etkisinin, hormonal yolak olarak bilinen gastrin yolağı üzerinden olup olmadığı farklı bir çalışma ile araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Aslan A., 1992. Oltu (Erzurum) yöresine ait liken florası üzerine araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
2. Öztürk A., Aslan A., 1991. Likenlerin ekonomik özellikleri ve Kuzeydoğu Anadolu'dan bazı liken türleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 2, 27-42.
3. Öztürk A., Aslan A., 1991. Likenlerin ekonomik özellikleri ve Kuzeydoğu Anadolu'dan bazı liken türleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 2, 27-42.
4. Nash I., Thomas H., 1996. Lichen biology. 2th ed., Cambridge University Press, UK.

5. Aslan A., 2000. Lichens from the regions of Artvin, Erzurum, and Kars (Turkey). *Isr J Plant Sci*, 48, 143-155.
6. Culberson CF., 1969. Chemical and botanical guide to lichen products. 1st ed., The University of North Carolina Press, North Carolina.
7. Aslan A., Güllüce M., Öğütçü H., 1999. Bazı likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bir araştırma. *Biyoteknoloji Dergisi*, 22, 19-26.
8. Açar G., Güllüce M., Aslan A., Bozari S., Karadayı M., Orhan F., 2010. Mutation preventive and antigenotoxic potential of methanol extracts of two natural lichen. *JMPR*, 4, 2132-2137.
9. Kotan E., Alpsoy L., Anar M., Aslan A., Açar G., 2011. Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB(1) in human lymphocytes in vitro. *Toxicol Ind Health*, 27, 599-605.
10. Ingólfssdóttir K., 2002. Molecules of interest: usnic acid. *Phytochemistry*, 61, 729- 736.
11. Evans FJ., Schmidt RJ., 1980. Plants and plant products that induce contact dermatitis. *Planta Med*, 38, 289.
12. Schwarz K., Bertelsen G., Nissen LR., Gardner PT., Heinonen M., 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol*, 212, 319-328.
13. Gücin F., Dülger B., Aslan A., 1997. *Pseudoevernia furfuracea* (L.) Zopf. likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 7, 22-24.
14. Emsen B., Yildirim E., Aslan A., Anar M., Ercisli S., 2012. Insecticidal effect of the extracts of *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd. and *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale against adults of the Grain weevil, *Staphilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Egypt J Biol Pest Co*, 22, 145-149.
15. Boustie J., Grube M., 2005. Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet Resour*, 3, 273-287.
16. Atasever A., Çınar A., Gelen V., Şengül E., Çelebi F., 2016. Investigation the Effects of Lichen's Total Extract Produced From *Usnea Longissima* Ach. on Motility of Rat Ileum In Vitro. *Van Vet J*, 27, 129-133.
17. Halıcı M., Odabaşoğlu F., Süleyman H., Çakır A., Aslan A., Bayır Y., 2005. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine*, 12, 656-662.
18. Topal A., Çelebi F., 2011. Effects of *nigella sativa* aqueous extracts on gastric acid secretion in isolated rat stomach. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 531-536.
19. Topal A., Çelebi F., 2011. Hiperisin'in izole edilmiş siçan midesinde mide asit sekresyonu üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 6, 201-208.
20. Gelen V., Çelebi F., Şengül E., Çınar A., 2017. The effect of *Rosmarinus officinalis* L. aqueous extract on gastric acid secretion in isolated rats stomach. *Van Vet J*, 28, 95-99.
21. Halıcı MB., 2007. Bazı Likenlerden izole edilen maddelerin siçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde antiülserojen mekanizmalarının araştırılması. *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum*.
22. Açar G., Aslan A., Sarıoğlu EK., Alpsoy L., Çeker S., 2011. Protective activity of the methanol extract of *Usnea longissima* against oxidative damage and genotoxicity caused by aflatoxin B(1) in vitro. *Turk J Med Sci*, 41, 1043-1049.
23. Odabaşoğlu F., Aslan A., Çakır A., Süleyman H., Karagöz Y., Halıcı M., Bayır Y., 2004. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytother Res*, 18, 938-941.
24. Odabaşoğlu F., Çakır A., Süleyman H., Aslan A., Bayır Y., Halıcı M., Kazaz C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic

- acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*, 103, 59-65.
25. Topal A., 2011. Bazı Kantaron bileşiklerinin mide üzerine etkisi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
26. Waldum HL., Kleveland PM., Fossmark R., 2015. Upper gastrointestinal physiology and diseases. *Scand J Gastroenterol*, 50, 649-656.
27. Waldum HL., Hauso O., Brenna E., Qvigstad G., Fossmark R., 2016. Does long-term profound inhibition of gastric acid secretion increase the risk of ECL cell-derived tumors in man? *Scand J Gastroenterol*, 51, 767-773.
28. Rasanen T., 2016. Some aspects of the humoral mechanism of gastric secretion. *Gastric Secretion: Mechanism and Control*. 1st ed., 255, Pergamon Press, London.
29. Engelstoft MS., Lund ML., Grunddal KV., Egerod KL., Lawrence SO., Poulsen SS., Zigman JM., Schwartz TE., 2015. Research resource: a chromogranin A reporter for serotonin and histamine secreting enteroendocrine cells. *Mol Endocrinol*, 29, 1658-1671.
30. Abdul-Hussein M., Freeman J., Castell D., 2015. Concomitant administration of a histamine₂ receptor antagonist and proton pump inhibitor enhances gastric acid suppression. *Pharmacotherapy*, 35, 1124-1129.
31. Phan J., Benhammou JN., Pisegna JR., 2015. Gastric hypersecretory states: investigation and management. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 13, 386-397.
32. Panula P., Chazot PL., Cowart M, Gutzmer R., Leurs R., Liu WLS., Stark H., Thurmond RL., Haas HL., 2015. International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacol Rev*, 67, 601-655.
33. Jiang H., Wang W., Zhang Y., Yao WW., Jiang J., Qin B., Yao WY., Liu F., Wu H., Ward TL., Chen CW., Liu L., Ding X., Liu X., Yao X., 2015. Cell polarity kinase MST4 cooperates with cAMP-dependent kinase to orchestrate histamine-stimulated acid secretion in gastric parietal cells. *J Biol Chem*, 47, 28272-28285.
34. Altamirano M., 2016. Backdiffusion of H⁺ during gastric secretion. *AJP Legacy Content*, 218, 1-6.
35. Schubert ML., 2016. Gastric acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol*, 32, 452-460.
36. Hunt RH, Camilleri M, Crowe SE, El-Omar EM., Fox JG., Kuipers EJ., Malfertheiner P., McColl KEL., Pritchard DM., Rugge M., Sonnenberg A., Sugano K., Tack J., 2015. The stomach in health and disease. *Gut*, 10, 1650-1668.
37. Hayakawa Y, Jin G, Wang H, Chen X., Westphalen CB., Asfaha S., Renz BW., Ariyama H., Dubeykovskaya ZA., Takemoto Y., Lee Y., Muley A., Tailor Y., Chen D., Muthupalani S., Fox JG., Shulkes A., Worthley DL., Takaishi S., Wang TC., 2014. CCK2R identifies and regulates gastric antral stem cell states and carcinogenesis. *Gut*, 64, 544-553.