

Efectos del D-004, Extracto Lipídico de los Frutos de la Palma Real (*Roystonea regia*), sobre el Granuloma inducido por Algodón en Ratas y sobre la Lipoxigenasa presente en Leucocitos Polimorfonucleares (PMNs)

Roberto MENÉNDEZ *, Daysi CARVAJAL, Rosa MAS, Yohanis PÉREZ, Vivian MOLINA, Maria de Lourdes ARRUZAZABALA & Rosa Ma. GONZÁLEZ

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158 N°15202. Cubanacan, Playa. Ciudad de la Habana 12100. Cuba

RESUMEN. El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*, Arecaceae), en el cual los ácidos oleico, laurico y palmítico son los principales componentes. La administración oral inhibe significativamente la hiperplasia prostática inducida por testosterona en roedores. El objetivo del presente trabajo consistió en investigar los efectos anti-inflamatorios inducidos por el tratamiento oral con D-004 en el modelo de granuloma por algodón y sus efectos *in vitro* sobre la actividad de la 5-lipoxigenasa (5-LO). La administración oral de D-004 a una dosis en que previene la hiperplasia prostática (HP) en ratas (400 mg/kg) disminuyó significativamente el peso seco y el edema del granuloma, en un 32 y un 23%, respectivamente. El estudio *in vitro* revela que el D-004 (0,9-1000 µg/ml) también inhibió, significativamente y de modo dosis-dependiente, la actividad de la 5-LO presente en leucocitos polimorfonucleares (CI₅₀ = 140,5 µg/ml), efecto consistente con la actividad anti-inflamatoria en el modelo del granuloma por algodón, en el cual leucotrienos (LTs) como el leucotrieno B4 y otros LTs, actúan como agentes proinflamatorios en la formación del granuloma. La demostración de un efecto antiinflamatorio *in vivo* del D-004 a una dosis a la cual previene la HP en roedores, podría explicarse, al menos parcialmente, por la inhibición de la 5-LO aquí demostrada, lo que podría ser de utilidad potencial en el manejo de HP, si bien estudios ulteriores, experimentales y clínicos, deben demostrar esta suposición.

SUMMARY. "Effects of D-004, a Lipid Extract of the Ground Fruits of the Cuban Royal Palm (*Roystonea regia*), on the Cotton Pellet Granulome in Rats and the Activity of Lipoxygenase from Polymorphonuclear Leucocytes". D-004 is a lipid extract of the ground fruits of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*) containing oleic, lauric and palmitic acids as the main components. Oral treatment with D-004 inhibited prostate hypertrophy (PH) induced with testosterone in rodents. Previous works have demonstrated that the infiltration of prostate by inflammatory cells may be one of the etiologic factors in PH. Since fatty of similar chain length have shown to inhibit lipoxygenases (LO) and cicloxygenases (CO), we tested the *in vivo* anti-inflammatory effects of D-004 on cotton pellet granuloma and the *in vitro* effect of D-004 on LO activity. Oral administration of D-004 (400 mg/kg) at a dose preventing PH in rats significantly inhibited dry weight and granuloma by 32 and 23%, respectively. Besides, the addition of D-004 (0.9-1000 µg/ml) at the incubation medium almost completely inhibited in a dose dependent manner LO activity from polymorphonuclear leukocytes (IC₅₀ = 140.5 µg/ml). Thus, the ability of D-004 to antagonize the production of chemotactic leukotrienes and other LO metabolites may account the anti-inflammatory effects of D-004 in cotton pellet granulome. Since the infiltration of inflammatory cells seems to play a role in PH, the anti-inflammatory effects of D-004 may contribute at least partially, for the beneficial effects of D-004 in this pathology. However, further experimental and clinical studies are required.

INTRODUCCION

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una enfermedad común en el hombre a partir de los 50 años, cuya frecuencia aumenta con la edad¹, y consiste en el crecimiento incontrolado y no maligno de los elementos glandulares y estromales de la próstata, que conllevan a una

compresión de la uretra que desencadena un conjunto de síntomas del tracto bajo urinario. El mecanismo a través del cual se induce la HP no está totalmente esclarecido. Sin embargo, una de las causas fundamentales del incremento del tamaño de la próstata es la hiperactividad de la enzima 5-α reductasa prostática, que cataliza la

PALABRAS CLAVE: Ácidos grasos, Anti-inflamatorio, D -004, Hiperplasia prostática, 5-LO.
KEY WORDS: Anti-inflammatory effects, D-004, Fatty acids, 5-LO, Prostate hyperplasia.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: rmenendez76@yahoo.com ó cpn.bioquimica@cnic.edu.cu

conversión de la testosterona (T) en su metabolito activo la dihidrotestosterona (DHT), la cual al unirse a los receptores androgénicos, promueve la liberación de factores de crecimiento celular ^{2,3}. Además, ha sido reconocido también que la infiltración de células inflamatorias en la próstata, tales como los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), es otro factor etiológico que puede contribuir al desarrollo de la HPB ^{4,5}. De esta forma, un efecto anti-inflamatorio podría ser de utilidad adicional en el tratamiento de esta enfermedad.

El D-004 es un extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real (*Roystonea regia*, Arecaceae), en el cual los ácidos oleico, laurico y palmítico son los principales componentes. El D-004 presenta analogías en su origen taxonómico, composición y efectos farmacológicos con los extractos lipídicos de los frutos de Saw palmetto (*Serenoa repens*), la alternativa fitoterapéutica más utilizada en el tratamiento de la HPB en el hombre ⁶⁻⁸. El D-004 previene la hiperplasia prostática (HP) inducida por T, no por DHT, en roedores, ^{9,10} y además ejerce un antagonismo de los receptores (1 adrenérgicos, fundamentalmente en aquellos presentes en estructuras no vasculares, tales como los del tracto urogenital y los del conducto de roedores, efecto que podría contribuir a su eficacia potencial en el manejo de la HPB ¹¹.

Por otra parte, diversos estudios muestran que ácidos grasos de diferentes largos de cadenas inhiben la actividad de las lipoxigenasas (LO) y las cicloxigenasas (CO), enzimas involucradas en la síntesis de importantes mediadores lipídicos de la inflamación, los leucotrienos y prostaglandinas ¹². Así, se ha encontrado que ácidos grasos saturados e insaturados de largo de cadena entre 10 y 18 átomos de carbono y mezclas de diferentes orígenes que poseen entre sus componentes ácidos grasos de similar largo de cadena, inhiben la actividad de ambas enzimas, mostrando sus potencialidades como agentes anti-inflamatorios ¹³⁻¹⁷. En tal sentido, se ha demostrado que el extracto lipídico de Saw palmetto posee un efecto anti-inflamatorio sobre el tejido prostático a través de la inhibición dual de las enzimas COX y 5-LOX, acción anti-inflamatoria adicional a otros mecanismos que explican los efectos terapéuticos de esta sustancia, tales como la inhibición de la enzima 5 α -reductasa prostática y el antagonismo de los receptores α_1 adrenérgicos ^{18,19}.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el objetivo del presente trabajo con-

sistió en investigar los efectos anti-inflamatorios inducidos por el tratamiento oral con D-004 en el modelo de granuloma por algodón y sus efectos *in vitro* sobre la actividad de la 5-LO presente en neutrófilos PMNs aislados de sangre humana.

MATERIALES Y METODOS

Animales y tratamiento

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba) de 200 a 250 g de peso. Los animales se mantuvieron en las condiciones de laboratorio con agua y comida *ad libitum* por un período de adaptación de 15 días previos al inicio del experimento. El manejo de animales fue conducido de acuerdo con las regulaciones cubanas para el uso de animales de laboratorio y los principios éticos. Los animales fueron privados de alimento durante las 16 h previas al experimento.

El D-004 se administró en forma de suspensión en Tween 65/H₂O (2%) por vía oral, durante los 10 días previos y durante los 6 días posteriores a la implantación del "pellet". Se utilizó como droga de referencia la indometacina, la cual fue disuelta en bicarbonato al 5%. y fue administrada mediante entubación gástrica durante los 6 días posteriores a la implantación del algodón. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos experimentales: un grupo control, al cual se administró vehículo solamente, dos grupos tratados con D-004 (200 y 400 mg/kg, respectivamente) y un grupo de referencia tratado con indometacina (3 mg/kg). Los tratamientos se administraron durante 16 días. Las dosis de D-004 administrada en estudio se selecciono por encontrarse dentro del rango de dosis que han resultado efectivas en prevenir la HP en esta especie.

Granuloma por algodón

Las ratas fueron previamente anestesiadas con éter, realizándose una incisión en su mitad del dorso lateral. La mota de algodón estéril de 50 mg de peso se colocó subcutáneamente, suturándose la herida y aplicándose un antiséptico local. Un día posterior a la última administración, los animales se sacrificaron en atmósfera de éter y los granulomas fueron cuidadosamente disecados y colocados en estufa a 60 °C durante 48 h, determinándose sus pesos secos. El peso del "pellet" algodón (50 mg) se sustrajo del peso del granuloma. El porcentaje de inhibi-

ción se expresó tomando como referencia el peso del granuloma formado en el grupo control.

Efecto sobre la actividad de la 5-LO

Para la obtención de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) se utilizó la metodología descrita por Boyum ²⁰. Con tal objetivo, la sangre con anticoagulante (EDTA) fue diluida con un volumen similar de solución salina fisiológica. En un tubo de centrifuga se colocó primeramente un volumen equivalente a 3 ml de Nycondenz (d = 1,077 g/ml) preparada en tampón Tris HCl 5 mM, pH 7,2 y NaCl 0,44% (p/v) y encima, fueron colocados cuidadosamente 6 ml de sangre diluida. Posteriormente, este gradiente fue centrifugado a 800 x g durante 30 min a 20 °C, en un rotor de ángulo libre. Las células mononucleadas, que aparecen como una banda en la interfase Nycondenz-plasma, fueron colectadas con la ayuda de una pipeta y transferidas a un tubo de centrifuga más pequeño, al cual se añadió un volumen similar de tampón PBS 50 mM/EDTA 1 mM, pH 7,4. Esta mezcla fue centrifugada nuevamente a 400 x g durante 10 min y el precipitado obtenido fue lavado nuevamente con un volumen similar de tampón ya mencionado. El precipitado fue resuspendido en el mismo tampón y fue utilizado en la preparación cruda de la enzima.

Para obtener la fracción citosólica se empleó la metodología descrita por Tateson ²¹. Para ello, los PMNs obtenidos por el protocolo anterior fueron sonicados a razón de tres ciclos de 30 seg cada uno a la potencia submáxima. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 2000 x g durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante fue centrifugado nuevamente, pero en este caso a 100000 x g durante 1 h y la fracción citosólica obtenida fue almacenada a -20 °C hasta su utilización. Todas estas operaciones fueron realizadas garantizando una temperatura de 4 °C.

Para ensayar la actividad de la LO se empleó una modificación de la metodología descrita por Abad *et al.*, ²², midiendo la actividad de la enzima a través de la formación de los dienos conjugados mediante la lectura en espectrofotómetro a 234 nm. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes; fracción citosólica (20-50 µg, medida por Lowry) ²³ disuelta en tampón borato 0,2 M, pH 9, sustrato (ácido linoleico) a concentraciones entre 125 y 3 mM, D-004 preparado en carboximetilcelulosa 2% (0,9-1000 µg/ml), o en su lugar ácido norhidroguaiarético (NDGA) preparado en el mismo vehículo a una concentra-

ción de 30 µg/ml. La mezcla fue preincubada durante 5 min y luego de añadir el sustrato se midió la DO a 234 nm durante 10 min y se cuantificó a intervalos de 1 min. Los resultados fueron reportados en valores de DO Vs tiempo. El grado de inhibición fue determinado frente a muestras incubadas en presencia de vehículo solamente.

Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la prueba de la U de Mann Whitney. *A priori* se estableció un $\alpha= 0,05$ para la significación estadística. Los datos fueron procesados de acuerdo al paquete de programas Statistic de Windows.

RESULTADOS

La administración oral de D-004 a una dosis en que previene la HP en ratas (400 mg/kg) disminuyó significativamente el peso seco y el edema del granuloma, en un 32 y un 23 %, respectivamente. La dosis de 200 mg/kg, sin embargo, no redujo significativamente estas variables, si bien se aprecia una tendencia a disminuir los valores del peso húmedo y el peso seco. La comparación con el grupo de referencia tratado con indometacina muestra que la magnitud del efecto resulta moderada. (Tabla 1).

La Figura 1 muestra los efectos de la adición *in vitro* del D-004 sobre la actividad de la 5-LOX. Como se observa, la inhibición ejercida

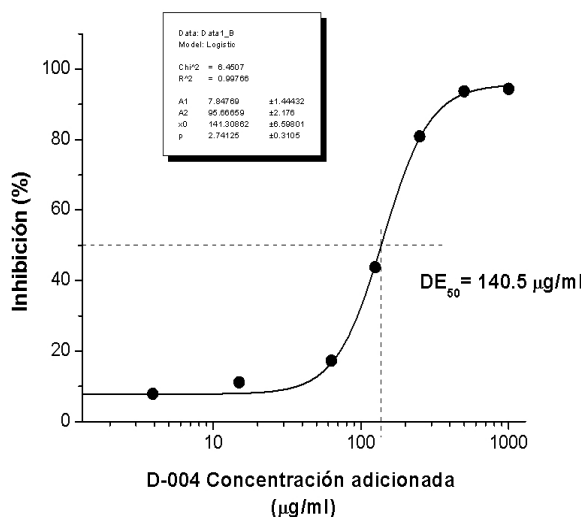


Figura 1. Curva dosis-respuesta representativa del efecto de la adición *in vitro* de D-004 sobre la generación de dienos conjugados en fracciones citosólicas de leucocitos PMN humanos. La grafica fue construida con los valores promedios de 3 experimentos independientes realizados en triplicado.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/d)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Inhibición (%)	Edema (%)	Inhibición (%)
Control	0	1189 ± 0.06	192 ± 0.016	-	996 ± 0.05	-
D-004	200	1026 ± 0.07 ^t	153 ± 0.008 ^t	20	872 ± 0.07	12
D-004	400	898 ± 0.01**	131 ± 0.005*	32	766 ± 0.01**	23
Indometacina	3	672 ± 0.03***	95 ± 0.008***	50	577 ± 0.029***	42

Tabla 1. Efecto de la administración de D-004 sobre el modelo de granuloma por algodón. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparación vs control. U de Mann Whitney.

por el D-004 resultado dependiente de la dosis, alcanzándose prácticamente un 100% a la dosis máxima ensayada. La dosis inhibitoria media (IC₅₀) para el D-004 fue de 140. 5 µg/ml. En estas experiencias se utilizó el NDGA como control positivo (resultados no mostrados), el cual añadido al medio de incubación en una concentración de 30 µg/ml inhibió la generación de dienos conjugados en un 30.5%.

La Figura 2 muestra los efectos del D-004 sobre la cinética de la actividad enzimática. El gráfico de Lineweaver-Burk donde se representan los efectos del D-004 (125-250 µg/ml) sobre la velocidad inicial de la reacción enzimática medida en presencia de concentraciones crecientes de sustrato (0.125, 0.25, 1 y 3 mM), muestra co-

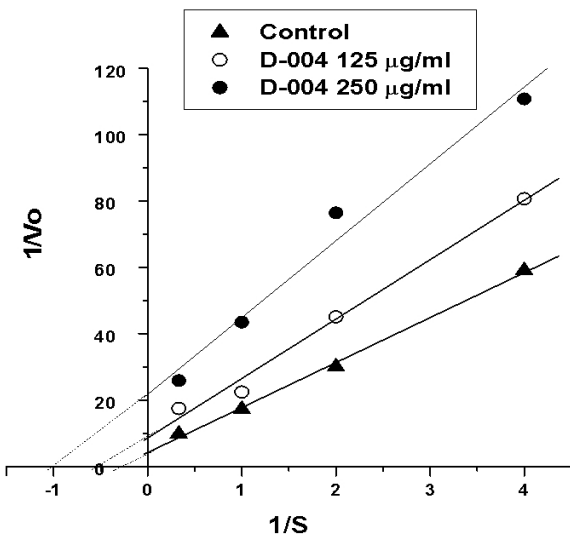


Figura 2. Representación doble recíproca (1/v₀ frente a 1/[S]₀), que muestra el efecto de concentraciones crecientes del D-004 (0.125 y 0.250 µg/ml) sobre la velocidad inicial de reacción medida en presencia de 0.125, 0.25, 1 y 3 mM de ácido linoleico. Como se aprecia, el D-004 modifica los valores de K_m (intercepto con el eje de las abscisas -1/K_m) y los de V_{max} (intercepto con el eje de las ordenadas, 1/V_{max}), de la LO presente en células PMN.

mo la adición de dosis crecientes de D-004 modifica los parámetros cinéticos K_m y V_m de la LO para el sustrato ensayado.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo demuestran que la administración oral de D-004 (400 mg/kg) durante 14 días a ratas mostró un efecto anti-inflamatorio en el modelo de granuloma por algodón, ya que disminuyó el peso húmedo, el peso seco y el edema inducido por el "pellet" de algodón.

El granuloma inducido por el "pellet" de algodón es un modelo frecuentemente utilizado para caracterizar los efectos anti-inflamatorios de diversas drogas. En este modelo, el mecanismo generador de la inflamación es una reacción de hipersensibilidad retardada, donde participan mediadores químicos que dan lugar a la infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, los cuales rodean la zona donde se encuentra el cuerpo extraño. De esta forma, este modelo caracteriza típicamente la fase proliferativa del proceso inflamatorio, ^{24,25} por lo cual estos resultados sugieren que el D-004 inhibe esta fase del proceso inflamatorio.

No obstante, el efecto fue moderado, ya que los porcentajes de inhibición alcanzados fueron inferiores al 50%, lo que se reafirma si se compara con la inhibición de un 50% lograda por la indometacina a una dosis de solo 3 mg/kg. Los resultados obtenidos con la indometacina son congruentes con los que sustentan que los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) son muy eficaces en este modelo ^{26,27}. La indometacina, como otros AINES, inhibe la infiltración de granulocitos en el cuerpo extraño, previniendo la generación de fibras de colágeno y la presencia de mucopolisacáridos ^{26,27}. Ha sido descrito también que estas drogas inhiben el incremento de la permeabilidad vascular inducida por la hialuronidasa, lo cual puede explicar la eficacia mos-

trada en este modelo, en el cual el incremento de la permeabilidad vascular es uno de los factores implicados en la formación del granuloma^{28,29}. Por tanto, no podemos descartar que el D-004 inhiba la infiltración en la mota de algodón a través de un mecanismo análogo al descrito para los AINES.

Sin embargo, en la formación del granuloma también juega un importante papel muy importante la presencia de agentes quimiotácticos que influyen en la migración celular^{30,31}. Dentro de los mediadores de la inflamación, el leucotrieno B4 (LTB4) constituye un potente agente quimiotáctico sobre los leucocitos PMNs, que induce su agregación, degranulación y la liberación de enzimas microsomales^{12, 32}.

De esta manera, la inhibición ejercida por el D-004 sobre la actividad de la 5-LO podría explicar, al menos parcialmente, el efecto anti-inflamatorio observado, ya que esta enzima presente en los neutrófilos y los eosinófilos, es la responsable del paso inicial en la ruta de síntesis de LTB4³³ en estas estructuras celulares. Además, la 5-LO se encuentra localizada prácticamente en todas las células que participan en el proceso inflamatorio, por lo cual su inhibición podría también disminuir la formación de los leucotrienos (LTs) C4, D4 y E4, los cuales actúan también como mediadores de la inflamación^{32,33}. Sin embargo, a diferencia del efecto anti-inflamatorio, cuya magnitud resulto moderada, la inhibición de la enzima observada en las experiencias *in vitro* fue marcada, lográndose una inhibición de prácticamente el 100% con la dosis mayor. La diferencia en el alcance de ambos efectos podría estar relacionada con diversos factores, entre los cuales se encuentran la biodisponibilidad *in vivo* de la sustancia sobre el blanco evaluado y/o la presencia de diferentes factores que *in vivo* modulen el alcance de la inhibición enzimática. Estos aspectos, no obstante, requieren de estudios ulteriores que profundicen en el alcance de la acción anti-inflamatoria del D-004.

Teniendo en cuenta la composición del D-004, en la cual el ácido oleico se encuentra en

tre los principales componentes, la inhibición de la actividad de la 5-LO aquí descrita resulta consistente, ya que ha sido referido que el ácido oleico inhibe la 5-LO^{13, 34}, y que los extractos lipídicos de los frutos de *Serenoa repens* también inhiben esta enzima^{18,19}. No obstante, mientras que nuestros resultados indican un antagonismo incompetitivo sobre la enzima, ha sido descrito que el ácido oleico inhibe la LO a través de su unión a un sitio alostérico de la enzima que induce un incremento notable de su Km para el ácido araquidónico (AA)³⁴. Tal discrepancia, no obstante, no resulta necesariamente contradictoria, ya que el D-004 consiste en una mezcla constituida por varios ácidos grasos de diferente largo de cadena y grado de insaturación, lo que puede enmascarar el efecto ejercido por el oleico.

En resumen, la administración oral de dosis repetidas de D-004 a una dosis (400 mg/kg) en que previene la HP en ratas mostró efectos anti-inflamatorios moderados en el modelo de granuloma por algodón, evidenciado a través de la reducción del peso húmedo, el peso seco y el edema del granuloma con un grado de inhibición inferior al 50%. Las experiencias *in vitro* mostraron que el D-004 (0.9-1000 µg/ml) inhibió la actividad de la 5-LO presente en leucocitos PMNs (CI50 = 140.5 µg/ml) de modo dependiente de las dosis y muy efectivo, ya que se logró una inhibición de prácticamente un 100% con la dosis máxima ensayada. La inhibición ejercida por el D-004 sobre la actividad de la 5-LO, puede explicar, al menos parcialmente, los efectos anti-inflamatorios del D-004 en este modelo, ya que el D-004 puede inhibir la formación del LTB4 y otros LTs, mediadores pro-inflamatorios en la formación del granuloma. Además, teniendo en cuenta que evidencias experimentales sugieren que los procesos inflamatorios se encuentran involucrados en la progresión de la HPB, los efectos anti-inflamatorios del D-004 podrían constituir un efecto beneficioso adicional que contribuyera al manejo de esta patología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrams, P., L. Cardozo, M. Fall, D. Griffiths, P. Rosier, U. Ulmsten, P. van Kerrenboeck, A. Victor & A. Wein. (2003) *Urology* **61**: 37-49.
2. Oesterling, J.E. (1992) *Arch. Family Med.* **1**: 257-66.
3. Barry, M.J. (1997) *I. Urol.* **158**: 488-91.
4. Robinnette, C.L. (1998) *Prostate* **12**: 271-86.
5. Theyer, G., G. Kramer & I. Assmann, I. (1992) *Lab Invest.* **66**: 96-107.
6. Gerber, G.S. & J.M. Fitzpatrick (2004) *BJU Int.* **94**: 338-44.
7. Plosker, G.L. & R.N. Brodgen. (1996) *Drug Ageing* **9**: 379-95.
8. Gong, E.M. & G.S. Gerber. (2004) *Am. J. Chin. Med.* **32**: 331-8.

9. Arruzazabala, M.L., D. Carvajal, R. Mas, V. Molina, E. Rodríguez & V. González. (2004) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **30**: 227-34.
10. Carvajal, D., M.L. Arruzazabala, R. Mas, V. Molina, E. Rodríguez & V. González (2004) *Curr. Ther. Res.* **66**: 1-4.
11. Arruzazabala, M.L., R. Mas, D. Carvajal & V. Molina. (2005) *Drugs RD* **6**: 281-9.
12. Salmon, J.A. & G.A. Higgs. (1987) *Br. Med. Bull.* **43**: 285-96.
13. Chaudry, A.A., K.W. Wahle, S. McClinton & L.E. Moffat. (1994) *Int. J. Cancer.* **57**: 176-80.
14. Henry, G.E., R.A. Momin, M.G. Nair & D.L. Dewitt. (2002) *J. Agric. Food. Chem.* **50**: 2231-4.
15. Mogul R., E. Johansen & T.R. Holman (2000) *Biochemistry* **39**: 4801-7.
16. Naidu, K.A. (1995) *Prostag. Leukotr. Ess.* **53**: 79-90.
17. Zhang, Y., G.L. Mills & M.G. Fair (2002) *J. Agric. Food. Chem.* **18**: 7581-5.
18. Paubert-Braquet, M., J.M. Mencia Huerta, H. Cousse & P. Braquet. (1997) *Prostag. Leukotr. Ess.* **57**: 299-304.
19. Breu, W., M. Hagenlocher, K. Redl, G. Tittel, F. Stadler & H. Wagner (1992) *Arzneimittelforschung* **42**: 547-51.
20. Boyum, A. (1983) *Iodinated density gradient media. A practical approach.* (D. Rickwood, ed.), IRL Press, pp. 147-171.
21. Tateson, J.E., R.W. Randall, C.H. Reynolds, W.P. Jackson, P. Bhattacharjee, J.A. Salmon & L.G. Garland. (1988) *Br. J. Pharmacol.* **94**: 528-539.
22. Abad, M.J., P. Bermejo, S. Valverde & A. Villar. (1994) *Planta Med.* **60**: 228-33.
23. Maxwell, M.A., S.M. Haas, L.L. Beiber & N.E. Tolbert. (1987) *Anal. Biochem.* **87**: 206-9.
24. Spector, W.G. (1969) *Int. Rev. Exp. Pathol.* **8**: 1-5.
25. Swingle, K.F. & F.E. Shideman. (1972) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **183**: 226-234.
26. Suleyman, H., L.O. Demirezer, A. Kuruuzum, Z.N. Banoglu, F. Gocer & G. Ozbakir (1999) *J. Ethnopharmacol.* **65**: 141-76.
27. Lonae, M., M.J. Parnham, M. Plauchithiu & K. Brune (1996) *Pharmacol. Res.* **33**: 367-73.
28. Suleyman, H., L.O. Demirezer, A. Kuruuzum, F. Gocer, Z.N. Banoglu & A. Gepdirem (2001) *Pharmazie* **56**: 92-3.
29. Suleyman, H., F. Gocer, G. Ozbaki, M.E. Buyukokuroglu & Z.N. Banoglu (1997) *Med. J. Atatürk Univer.* **29**: 548-50.
30. Laskin, D.L. & K.J. Pendido. (1995) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 655-77.
31. Dunne, M.W. (1995) *"Pathophysiology. Concepts of Altered Health States with Contributors"*. (C.M. Porth, ed) Lippincott, Philadelphia, pp. 165-76.
32. Sala, A., S. Zarini & M. Bolla (1998) *Biochem. (Moscow)* **63**: 84-92.
33. Samuelsson, B., S. Dahlin, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer & C.N. Serhan (1987) *Science* **237**: 1171-6.
34. Mogul, R., E. Johansen & T.R. Holman (2000) *Biochemistry* **39**: 4801-7.