

DROSOPHILA MELANOGASTER'DE LOBARIA PULMONARIA (L.) HOFFM. LİKENİNİN ÖMÜR UZUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİ

Handan Uysal^{1*}, Deniz Altun², Ali Aslan³

¹Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240, Erzurum

²Erzincan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 24100, Erzincan

³Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, 25240, Erzurum

Özet

Bu çalışmada, *Lobaria pulmonaria* likeninin metanol, kloroform ve su ekstralarının *Drosophila melanogaster*'in ömür uzunluğu üzerine etkileri araştırılmıştır. Standart *Drosophila* Besiyerine farklı konsantrasyonlarda (0.5; 1.0; 1.5; 2.0mL/100mL besiyeri) ilave edilen *L. pulmonaria* likeninin farklı çözücülerdeki bu etkisi, uygulama ve kontrol grupları için dişi ve erkek popülasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Çalışmamızda *L. pulmonaria*'nın metanol, kloroform ve su ekstralarına maruz bırakılan her iki popülasyonda da ömür uzunluğu konsantrasyon artışına paralel olarak artmış ve bu artışın kontrole göre $p<0.05$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Ancak metanol ekstresinin kloroform ve su ekstralarına göre daha etkili, su ekstresinin ise metanol ve kloroform ekstralarına göre nispeten daha zayıf etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, *Lobaria pulmonaria*, ömür uzunluğu, yaşlanma, serbest radikaller, antioksidanlar

THE EFFECTS OF LOBARIA PULMONARIA (L.) HOFFM. ON THE LONGEVITY ON DROSOPHILA MELANOGASTER

Abstract

In this study, the effects of water extract, chloroform extract and methanole extract obtained from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm., a lichen species, on the longevity of *Drosophila melanogaster* was investigated. The effects of different concentrations of extract obtained from *L. pulmonaria* (0.5; 1.0; and 2.0mL/100mL medium) were separately administered as one by one in female and male populations of *D. melanogaster* for application groups. In all of application groups of each population the longevity increased, depending on the concentration of extract obtained from *L. pulmonaria*. It was found that the difference between the groups was significantly important ($p< 0.05$). The highest longevity was determined for the methanol extract of *L. pulmonaria*, followed by the chloroform extract and the water extract of *L. pulmonaria*.

Key Words: *Drosophila melanogaster*, *Lobaria pulmonaria*, longevity, aging, free radicals, antioxidants

* E-posta:hauysal@atauni.edu.tr

Semboller:

°	Derece
C	Santigrat
g	Gram
mL	Mililitre
%	Yüzde değer
♀♀	Dişi
♂♂	Erkek

1. Giriş

Likenler çok eskiden beri pek çok ülkede tıbbi amaçlarla geleneksel ilaçlar olarak kullanılmıştır [1]. Bilimsel anlamda likenlerle ilgili bilgilere ilk kez 15. yüzyılda rastlanılmakta [2] ve Avrupa ülkelerinde de 16. yüzyıldan itibaren çeşitli hastalıkların tedavisinde dekoksasyon (demleme) veya infüzyon şeklinde kullanıldığına dair birçok kanıt bulunmaktadır [3, 4]. Örneğin, halk arasında ciğer likeni olarak bilinen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. likeninin ortaçağda Avrupalılar tarafından akciğer hastalıklarının tedavisinde ve yine Kolombiya’da yaşayan Hesquiata halkı tarafından verem hastalığının tedavisinde kullanıldığına dair kayıtlar vardır [5]. Likenlerin bu tedavi edici etkisi, onların stistik asit, giroforik asit ve norstistik asit gibi sekonder metabolitlerine atfedilmekte [6] ve günümüzde de bu metabolitlerin kullanılması ile artrit, egzema, solunum ve dolaşım yolu hastalıkları tedavi edilebilmektedir [7, 8]. Ayrıca mekanizması üzerinde hala bilinmeyen noktaların bulunduğu yaşlanmanın da, likenlere ait sekonder metabolitler ile belli ölçülerde ertelenebileceği düşünülmektedir. Çeşitli organizmalarda, oksidanların vücut sistemlerindeki hasarı, yaşla birlikte artmakta ancak antioksidanlar tarafından bu hasar önlenmektedir [9]. Likenlerin antioksidan aktiviteye sahip olmaları [10], onların besin şeklinde alınmaları halinde ömür uzunluğunu artırabileceğini düşündürmüştür. Bu noktadan hareketle antioksidan aktiviteye sahip olan *L. pulmonaria* likeninin metanol (Lpe_m), kloroform (Lpe_k) ve su (Lpe_s) ekstraktlarının *Drosophila melanogaster*’in ergin bireylerinde ömür uzunluğu üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem**2.1. Kullanılan organizma**

Deneylerimizde kullanılan *D. melanogaster*’in Oregon R soyu (Diptera: Drosophilidae) yabancıl tip (wild type=w.t.) bir soydur. Bu soy, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarı’nda 1988 yılından bu yana kendileştirilmiş homojen bir stoktur. Kısa hayat devri (9-10 gün), çok sayıda yavru verebilmesi, yetiştirilme şartlarının ucuz olması ve olası varyasyonların kolaylıkla gözlenebilmesi gibi sebepler *Drosophila*’yı ideal bir deneysel organizma haline getirmektedir [11].

2.2. Bitki materyali

Deneylerimizde, Murgul bölgesinden toplanarak Dr. Ali Aslan tarafından teşhis edilen ve Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi herbaryumunda saklanan *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. likeni kullanılmıştır.

2.3. Liken ekstraksiyonu

Toz haline getirildikten sonra hassas terazide her bir ekstrakt için 2.5g tartılan *L. pulmonaria* distile su, metanol ve kloroform ile ayrı ayrı 250mL’ye tamamlanarak Soxhlet cihazında 25°C’de 2 gün ekstrakte edilmiştir. Elde edilen bu ekstraktlardan stok çözeltiler (2.0mL/100mL) hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlarda (0.5; 1.0; 1.5 ve 2.0mL/100mL besiyeri) uygulama gruplarına ilave edilmiştir. Stok çözelti +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

2.4. Ömür uzunluğu deneyleri

L. pulmonaria likeninin ömür uzunluğu üzerine etkisi, *D. melanogaster*’in dişi ve erkek popülasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla aynı yaşlı bireyleri elde etmek için, taze besin ortamı içeren kültür şişelerinde çaprazlamalar yapılarak ön stoklar oluşturulmuştur. Pupadan çıkan aynı yaşlı (1- 3 günlük) çiftleşmemiş ♀♀ ve ♂♂ sineklerden, her bir grup için ortalama 100 birey toplanmıştır. Toplanan bireyler boş kültür şişelerine konularak uygulamadan önce 2 saat aç bırakılmıştır. Daha sonra, bu bireyler farklı konsantrasyonlarda (0.5; 1.0; 1.5 ve 2.0mL/100mL

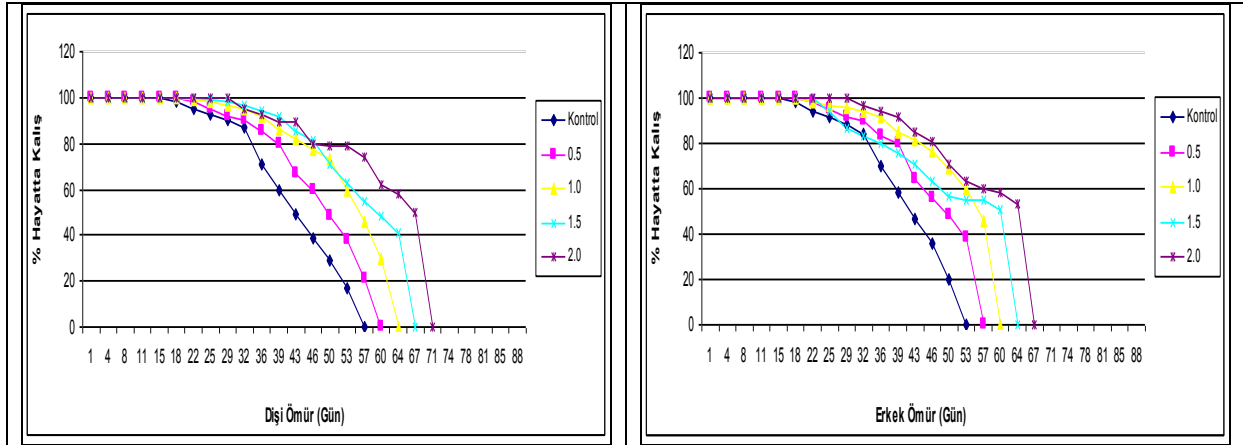
besiyeri) *L. pulmonaria* likeninin metanol (=Lpe_m), kloroform (=Lpe_k) ve su (=Lpe_s) ekstrelerini içeren şişelerde 2 saat beslenmişlerdir. Uygulama sonrasında ♀♀ ve ♂♂ bireyler, içinde Standart Drosophila Besiyeri (SDB) [12] bulunan kültür şişelerine aktarılmış ve tüm kültür şişeleri uygun sıcaklık kabinlerinde (25±1°C) tutulmuştur. Deney süresince besinler haftada iki kez tazelenmiştir. Birey sayıları her uygulama günü başlangıcında ve sonunda kontrol edilmiş ve ölen bireyler kaydedilerek ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarının tümünde, sayımlara ve uygulamaya en son birey ölene kadar devam edilmiştir.

2.5. İstatistiksel analizler

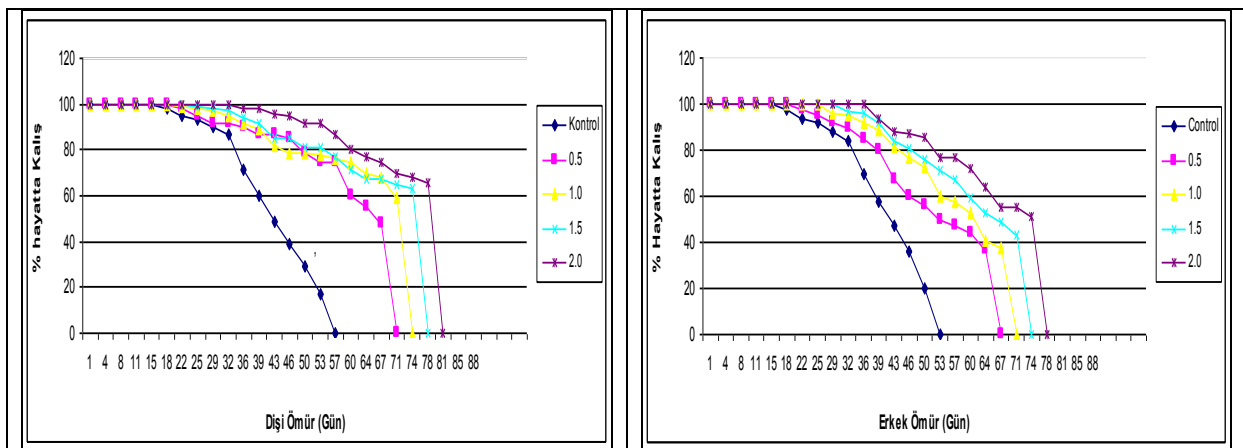
Ömür uzunluğu deneylerinden elde edilen verilerle ilgili istatistiksel analizler SPSS 12.0 programı ile yapılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sonuçlar, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testine göre p<0.05 ve p<0.001 düzeyinde karşılaştırılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmamızda *L. pulmonaria* likeninin metanol, kloroform ve su ekstrelerinin tüm uygulama gruplarında (0.5; 1.0; 1.5 ve 2.0mL/100mL besiyeri) hem dişi hem de erkek bireylerde ortalama ömür uzunluğunu kontrole göre artırdığı gözlenmiştir (Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3).



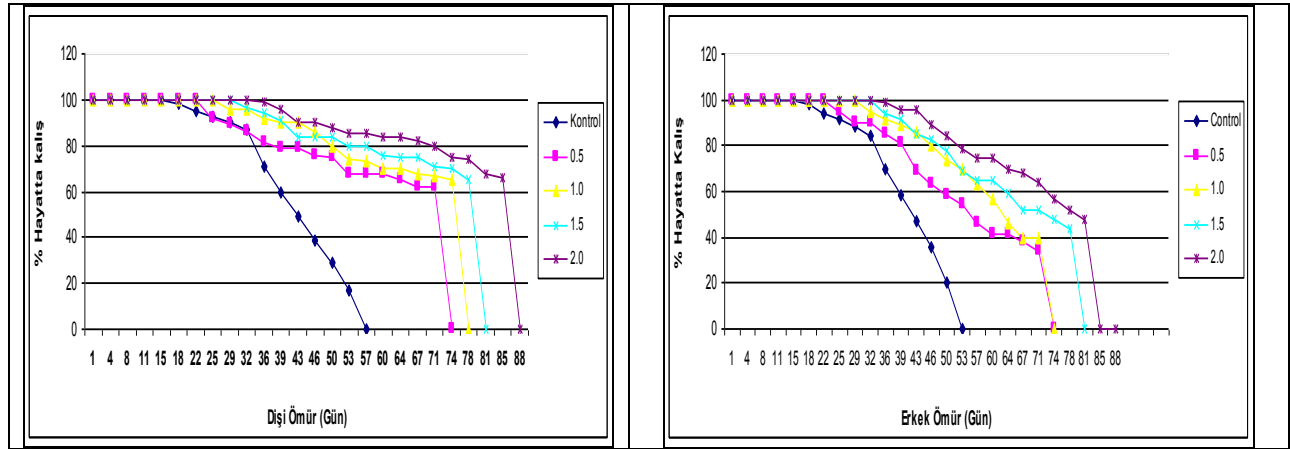
Şekil 1. Ergin yaşamları süresince farklı konsantrasyonlarda Lpe_s içeren besiyerinde yaşayan *D. melanogaster*'in dişi ve erkek bireylerinin hayatta kalış eğrileri



Şekil 2. Ergin yaşamları süresince farklı konsantrasyonlarda Lpe_k içeren besiyerinde yaşayan *D. melanogaster*'in dişi ve erkek bireylerinin hayatta kalış eğrileri

Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna ait dişi bireylerde maksimum ömür uzunluğu 57 gün iken, en yüksek konsantrasyonda (2.0mL/100mL besiyeri) Lpe_s, Lpe_k ve Lpe_m uygulanan dişilerin maksimum ömür uzunluğu sırasıyla 71, 81 ve 88 gün; kontrol grubuna ait erkek bireylerde ise maksimum ömür uzunluğu 53 gün iken, en

yüksek konsantrasyonda Lpe_s, Lpe_k ve Lpe_m uygulanan erkeklerin maksimum ömür uzunluğu sırasıyla 67, 78 ve 85 gün olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3. Ergin yaşamları süresince farklı konsantrasyonlarda Lpe_m içeren besiyerinde yaşayan *D. melanogaster*'in dişi ve erkek bireylerinin hayatta kalış eğrileri

Çizelge 1 ile Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'de görüldüğü gibi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman artan Lpe_m, Lpe_k ve Lpe_s konsantrasyonlarına bağlı olarak uygulama gruplarının tümünde maksimum ömür uzunluğunda artış görülmüştür. Bu sonuçlara göre, deneylerimizde kullandığımız ekstraları, ömür uzunluğu üzerindeki etkileri itibarıyla Lpe_m > Lpe_k > Lpe_s şeklinde sıralamak mümkündür. Ortalama ömür uzunluğu bakımından gözlenen bu farklılık, her iki eşey grubunda da p<0.05 ve p<0.001 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 1. *D. melanogaster*'in ♀♀ ve ♂♂ populasyonlarına ait ortalama ömür uzunlukları ve gruplar arası önem kontrolleri

Grup ve Grup No	♀♀ N	Max. ömür	Standart hata	Ort. ömür uzunluğu	Gruplar arası önem kontrolü	♂♂ N	Max. Ömür	Standart hata	Ort. ömür uzunluğu	Gruplar arası önem kontrolü
Kontrol -1	100	57	10,142	43,78	5-6**	100	53	9,358	42,26	5-6*
0.5 (s)-2	100	60	10,366	48,85		100	57	9,835	47,91	
0.5 (k)-3	100	71	13,490	61,33		100	67	13,954	53,22	
0.5 (m)-4	100	74	17,936	61,81		100	74	16,288	56,52	
1.0 (s)-5	100	64	10,218	54,51		100	60	9,645	53,01	
1.0 (k)-6	100	74	14,547	65,02		100	71	12,916	58,74	
1.0 (m)-7	100	78	15,566	68,00		100	74	13,628	61,51	
1.5 (s)-8	100	67	10,711	57,52		100	64	14,023	52,46	
1.5 (k)-9	100	78	14,539	68,66		100	74	13,173	62,53	
1.5 (m)-10	100	81	16,003	71,51		100	81	15,930	67,07	
2.0 (s)-11	100	71	11,941	62,18		100	67	10,847	58,53	
2.0 (k)-12	100	81	11,653	73,99		100	78	12,894	68,26	
2.0 (m)-13	100	88	15,724	79,18		100	85	15,003	72,92	

Max.:Maksimum, Ort.: Ortalama, N:Birey sayısı, (s):su ekstresi, (k):kloroform ekstresi, (m):metanol ekstresi, **:Gruplar arasındaki fark p<0.001 düzeyinde önemsizdir. *:Gruplar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemsizdir.

Antioksidanların yaşlanmayı geciktirici etkisi nedeniyle son yıllarda likenleri de içine alan birçok bitki incelenmiş ve onların antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir [13, 14]. Bu likenlerden birisi de deneylerimizde kullanmış olduğumuz *L. pulmonaria* olup onun metanol ve su ekstralarının kuvvetli antioksidan özelliğe sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [15]. Antioksidanlarla ilgili olarak yapılan çalışmalardan bir diğerinde, *Rosa damascena* bitkisine ait ekstraktın, ergin *D. melanogaster*'de mortaliteyi azalttığı [16], yine yeşil çay ve brokoli ekstraktının, *Drosophila*'da aşırı yağlı besinlerin alımıyla meydana gelen yüksek mortalite oranını, antioksidan enzimlerinin aktivitesini artırarak düşürdüğü belirlenmiştir [17]. Halk arasında sakal likeni olarak bilinen *Usnea longissima*'nın da antioksidan potansiyeli test edilmiş ve güçlü antioksidan aktivitesinden dolayı koruyucu etkiye

sahip olduğu bulunmuştur [18]. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda, *U. longissima* likeninine ait su ekstrelerinin *D.melanogaster*'in ömür uzunluğu ve çeşitli gelişim parametreleri üzerindeki iyileştirici etkileri de belirlenmiştir [19, 20].

Alternatif tıp alanında kullanılan pek çok bitkinin antioksidan özellikleri, sahip oldukları sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır [21]. Bitkilerin yanı sıra, aerobik organizmalarda da serbest oksijen radikallerine karşı çeşitli antioksidan enzimlerin bulunduğu bilinmektedir [22]. Organizmada bulunan serbest oksijen radikalleri hücrede DNA, protein, lipid ve diğer moleküllere zarar vermekte, gen ekspresyonu ve hücre bölünmesi sikluslarını olumsuz etkilemektedir [23]. Hücrede meydana gelen bu çeşit hasarlar, birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunmakta ayrıca yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde de önemli rol oynamaktadır [24].

Yaşlanma, sürekli devam eden biyolojik bir süreçtir. Fizyolojik kapasitede azalma ve çevresel stresler, aerobik canlı metabolizmasının doğal sonucu olarak oluşan serbest radikallerin artışına neden olmaktadır. Bütün bu etkenler yaşla birlikte canlıda ölüm riskinin artışına yol açmaktadır. Özellikle alternatif tıp alanında yapılan çalışmalara göre, likenlerin de arasında bulunduğu birçok bitkinin antioksidan özellikleri sebebiyle hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılması canlı için olumlu sonuçlar doğurabilmektedir [25]. Diyetle yeterli miktarda alınan likenlerin, organizmada serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon sonucu oluşan doku hasarlarını önlemede etkili olacağı ve dolayısıyla yaşam süresini uzatabileceği düşünülmektedir [26, 27].

D. melanogaster'in normalden daha uzun yaşayan soylarında ömür uzunluğundaki artışın, antioksidan sisteme ait genlerin ekspresyonundan, Cu/Zn-SOD protein üretiminden ve ADS (antioksidan savunma sistemi) enzim aktivitelerinde meydana gelen artıştan kaynaklandığı ve bu sebeple oksidatif strese karşı direnç gösterdikleri belirtilmiştir [28]. *D. melanogaster*'de yaşlanmayla beraber katalaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidatif enzimlerin aktiviteleri ve total glutatyon miktarı azalmaktadır [29]. Ancak antioksidan kaynağı olan sebze ve meyvelerin diyetle alınması, endojen kaynaklı antioksidan savunma sistemleri ile birlikte organizma için koruyucu etki oluşturabilir. Bu nedenle, serbest oksijen radikallerine ve onların meydana getirdiği birçok hastalığa karşı antioksidan enzim içeren yiyecek ve ilaçların alınması oldukça önemlidir [30]. Muhtemelen, *L. pulmonaria*, bazı antioksidatif enzimlerin aktivitelerini artırmak suretiyle *D. melanogaster*'in hücrelerinde serbest radikal oluşumunu önleyerek ya da metabolizma hızını azaltarak yaşlanmayı geciktirmekte ve böylece dişi ve erkek bireylerin ortalama ömür uzunluğu artmaktadır. Literatür bilgileri de bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

4. Sonuçlar

Yaşlanma ve ömür uzunluğunun temel mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammış olsa da, bu sürecin ertelenebileceği savunulmaktadır. Günümüzde bu konuyla ilgili insanlar üzerinde yapılmış çalışmalar yeterli değildir. Fakat hayvansal organizmalarda, herhangi bir işleme gerek duyulmaksızın yenilebilen besin maddelerinin başında gelen *L. pulmonaria*'nın, diyetle yeterli miktarda alınması halinde, organizmada serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon sonucu oluşan doku hasarını önlemede etkili olabileceği ve dolayısıyla yaşam süresini uzatabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- [1]Shibata, S., Ukita, T., Tamura, T., Miura, Y., "Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivatives", *Jpn Med J*, 1: 152–155 (1948).
- [2] Jahns, H.M., "Collins guide to Ferns Mosses & Lichens", (1983).
- [3]Toroğlu, S., Çenet, M., "Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar", *KSU J Sci Eng*, 9(2): 12- 20 (2006).
- [4]Schindler, H., *Zur Geschichte der Anwendung von Flechten (Lichenes) in der Medizin*, Carolinea, 4631- 4646 (1988).
- [5]Zeybek, U., John, V., "Likens, Kimyasal Bileşikleri ve Tıbbi Kullanımları", *Pharmacia-JTPA*, 32(1): 37- 48 (1992).
- [6]Asahina, Y., "Lichenologische Notizen (§205)", *J Jap Bot*, 42: 289– 294 (1967).
- [7]Biswas, K., "Common medicinal plants of Darjeeling and the Sikkim-Himalayas", pp 90 (1956).
- [8]Huneck, S., Yoshimura, I., "Identification of lichen substances", *Springer*, Berlin Heidelberg, pp 304– 349 (1996).
- [9]Cook, N.C, Saman, S., "Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources", *J Nutr Biochem*, 7: 66- 76 (1996).

- [10] Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P., “Antioxidant activity of selected medicinal plants”, *J Agric Food Chem*, 46: 4487– 4490 (1998a).
- [11] Uysal, H., Şişman, T., “Genetik Laboratuvar Kılavuzu”, *Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Yayını*, Erzurum, 2003.
- [12] Bozcuk, A.N., “*Drosophila melanogaster* Meig. (Diptera:Drosophilidae) Yaşlanması ve Orgel hipotezi üzerinde araştırmalar”, *Doçentlik tezi, Hacettepe Üniv. Fen Fak.*, (1976).
- [13] Hidalgo, M.E., Fernandez, E., Quilhot, W., Lissi, E., “Antioxidant activity of depsides and depsidones”, *Phytochemistry*, 37: 1585– 1587 (1994).
- [14] Huneck, S., “The significance of lichens and their metabolites”, *Naturwissenschaften*, 86: 559- 570 (1999).
- [15] Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Halici M., Bayir, Y., “Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Three Lichen Species”, *Phytother Res*, 18: 938– 941 (2004).
- [16] Jafari, M., Zarban, A., Pham, S., Wang, T., “*Rosa damascena* decreased mortality in adult *Drosophila*”, *J Med Food*, 11: 9- 13 (2008).
- [17] Man Li, Y., Chan, H.Y.E., Yao, X.Q., Huang, Y., Chen, Z.Y., “Green tea catechins and broccoli reduce fat-induced mortality in *Drosophila melanogaster*”, *J Nutr Biochem*, 19: 376- 383 (2008).
- [18] 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*, 12: 656– 662 (2005).
- [19] Uysal, H., Altun, D., Aşkın, H., Aslan, A., “The effects of water extract of *Usnea longissima* Ach. on some development stages in *Drosophila melanogaster*”, *Fresen Environ Bull*, 18(4): 450-455 (2009).
- [20] Uysal, H., Altun, D., Aşkın, H., Aslan, A., “The effects of water extract of *Usnea longissima* Ach. on the longevity of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)”, *Fresen Environ Bull*, 18(5a): 699-703 (2009).
- [21] Pietta, P.G., Simonetti, P., Gardana, C., Brusamolino, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., “Catechin metabolites after intake of green tea infusions”, *Biofactors*, 8: 111- 118 (1998b).
- [22] Stadtman, E.R., “Protein oxidation and aging”, *Science*, 257: 1220- 1224 (1992).
- [23] Wallace, D.C., “Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?”, *Science*, 256: 628- 632 (1992).
- [24] Burtis, C.A, Ashwood, E.R., “Tietz Textbook of Clinical Chemistry”, *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, Pennsylvania, (1999).
- [25] Block, G., Patterson, B., Subar, A., “Fruit, vegetables, and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence”, *Nutr. Cancer* 18: 1– 29 (1992).
- [26] Niwa, Y., Tominaga, K., Yoshida, K., “Successful treatment of severe atopic dermatitis, complicated cataract, and male infertility with a natural product antioxidant”, *Int J Tissue React* 20(2): 63- 69 (1998).
- [27] Papas, A M., “Diet and antioxidant status”, *Food Chem Toxicol*, 37: 999- 1007 (1999).
- [28] Arking, R., Burde, V., Graves, K., Hari, R., Feldman, E., Zeevi, A., Soliman, S., Saraiya, A., Buck, S., Vettraino, J., Sathrasala, K., Wehr, N., Levine, R.L., “Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns”, *Exp Geront*, 35: 167- 185 (2000).
- [29] Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., “Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7915– 7922 (1993).
- [30] Yen, G.C., Hsieh, C.L., “Antioxidant activity of extracts from Du-Zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*”, *J Agric Food Chem*, 46: 3952– 3957 (1998).