

**BAZI LİKEN TÜRLERİNİN ANTİMUTAJENİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Mustafa ANAR**

**Doktora Tezi  
Biyoloji Ana Bilim Dalı  
Prof. Dr. Ali ASLAN  
2014  
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAZI LİKEN TÜRLERİNİN ANTİMUTAJENİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Mustafa ANAR**

**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**ERZURUM  
2013**

**Her Hakkı Saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

BAZI LİKEN TÜRLERİNİN ANTİMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Ali ASLAN danışmanlığında, Mustafa ANAR tarafından hazırlanan bu çalışma 09/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ali ASLAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan GÜRBÜZ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Lokman ALPSOY

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

**Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU**  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: 2011/219

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

### BAZI LİKEN TÜRLERİNİN ANTIMUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa ANAR

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali ASLAN

Bu çalışmada, Erzurum-Artvin-Giresun ve çevresinde yetişmekte olan 10 farklı liken türünün total ekstralarının mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin belirlenmesi için mutant bakteri suşlarının kullanıldığı Ames/*Salmonella* ve *E. coli* WP2 test sistemleri kullanılmıştır. Bu testler sonucunda likenlerin total ekstralarının mutajenik etkisinin olmadığı buna karşın, antimutajenik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca insan periferik kanından elde edilen lenfositlerde AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisine karşı bu liken türlerinin mutajenik veya antimutajenik özelliklerinin olup olmadıkları Mikronükleus (MN) yöntemi ile araştırılmıştır. İnsan lenfosit kültürlerinde biyokimyasal çalışmalar yapılarak total liken özütlerinin antioksidan özelliklerinin (SOD, GPx, GSH ve MDA enzimleriyle) tespiti, etki derecelerinin belirlenmesi ve antimutajenik özelliğinin antioksidan özelliğinden kaynaklı olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. AFB<sub>1</sub>'in insan periferik kanından elde edilen lenfosit kültürlerinde MN frekansını önemli derecede artırdığı gözlenmiştir. AFB<sub>1</sub> ile birlikte 10 farklı liken türünün total ekstralarının uygulandığı üç farklı konsantrasyonu AFB<sub>1</sub> ile karşılaştırıldığında da MN frekansında önemli derecede azalma görülmüştür. Ayrıca uygulanan liken konsantrasyonlarının mutajenik etkinliğe sahip olmamakla beraber değişik oranlarda kuvvetli antimutajenik özelliğe sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmanın biyokimyasal sonuçlarına bakıldığında ise AFB<sub>1</sub>'in önemli derecede süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini ile glutatyon (GSH) seviyesini azalttığı, malondialdehit (MDA) seviyesini ise artırdığı ortaya konulmuştur. AFB<sub>1</sub> ile birlikte liken ekstralarının verilmesi SOD, GPx aktivitelerini ve GSH miktarı artırırken, MDA miktarını azaltmıştır. Sonuç olarak, liken ekstralarının reaktif oksijen türlerinin salınımını sağlayan AFB<sub>1</sub>'e karşı koruyucu etkinliğe sahip oldukları tespit edilmiştir.

**2013, 143 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Aflatoksin B<sub>1</sub>, Oksidatif stres, Ames, *E.coli* WP2, Mikronükleus ve Liken

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### DETERMINATION OF ANTIMUTAGENIC PROPERTIES OF SOME LICHEN SPECIES

Mustafa ANAR

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ali ASLAN

In this study, we aimed to determine mutagenic and antimutagenic properties of total extract of 10 different lichens species with Ames/*Salmonella* and *E. coli* WP2 test systems, which obtained from Erzurum-Artvin-Giresun provinces. This test systems showed that lichens total extracts have not mutagenic effect. However, lichens have antimutagenic effects. In addition to this, we investigated mutagenic and antimutagenic properties of this lichens species against to mutagenic effects of AFB<sub>1</sub> on human lymphocyte obtained from peripheral blood with Micronucleus (MN) method. We aimed to research determination of antioxidant effects of total extract of this lichens species with biochemical parameters (SOD, GPx, GSH and MDA enzymes) on human lymphocyte cultures, determining the degree of influence and antimutagenic property resulting from antioxidant. We observed that AFB<sub>1</sub> significantly increased the MN frequency on lymphocyte culture obtained from human peripheral blood. When applied to 3 different concentrations of 10 different lichen extracts are decreased to MN frequency significantly, total extracts of 10 different lichen species compared with. Furthermore, we have been found that lichens applied concentrations not having mutagenic effects howbeit, to have potent antimutagenic properties in various proportions. According to the biochemical results of the study, AFB<sub>1</sub> significantly decreased the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione level, increased the level of and malondialdehyde. When applied to lichen extracts with AFB<sub>1</sub>, increased the activities of SOD, GPX and GSH level, decreased the level of MDA. As a result, lichens exhibited protective effects on human lymphocytes exposed to AFB<sub>1</sub> by inhibiting AFB<sub>1</sub>-induced ROS generation.

**2013, 143 pages**

**Keywords:** Aflatoxin B1, Oxidative stress, Ames, E.coli WP2, Micronucleus and lichen.

## TEŞEKKÜR

Doktora Lisans tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında ve Eğitim Fakóltesi Biyoloji Eğitimi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Bu tez konusunu çalışmamı sağlayan, çalışmalarında ve tezin hazırlanışında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Ali ASLAN'a ve bu tezim maddi manevi hamiliniğini yapan hocam Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a en içten teşekkürlerimi arz ederim. Ayrıca Biyoloji Eğitimi bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Hasan GÜRBÜZ hocama teşekkür ederim.

Tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim ve biyokimyasal analizlerin yapılmasında yardımda bulunan Sayın Doç. Dr. Lokman ALPSOY'a ve yine fikirlerinden istifade ettiğim Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE hocama, Moleküler Biyoloji ve Tıbbi Genetik Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamızı destekleyen Atatürk Üniversitesi BAP (2011-219) Saymanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca kendilerinden görmüş olduğum destekten ve güvenden dolayı aileme, dünyaya teşrifiyle bana yeni bir hayat nefesi üfleyen canım kızıma, son olarak da her zaman güven ve desteğiyle bana ışıktan göz nurum eşime teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Mustafa ANAR

Aralık, 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>14</b>
2.1. Aflatoksinler.....	14
2.1.1. Aflatoksinlerin ilk bulunuşu ve isimlendirilmesi.....	14
2.1.2. Aflatoksinlerin özellikleri.....	14
2.1.3. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı.....	17
2.1.4. Aflatoksinlerin canlılar üzerine etkisi.....	21
2.2. Gen Mutasyonlarının Etkileri.....	30
2.2.1. Gen mutasyonlarının genom üzerine etkileri.....	30
2.2.2. Gen mutasyonlarının mikroorganizmalar üzerine olan etkileri.....	31
2.3. Yaygın Olarak Kullanılan Mutajenite Yöntemleri.....	32
2.3.1. Ames/ <i>Salmonella</i> ve <i>E. Coli</i> WP2 test sistemleri.....	32
2.3.2. Mikronükleus (MN).....	33
2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	38
2.4.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet}$ ).....	41
2.4.2. Singlet oksijen ( $^1O_2$ ).....	42
2.4.3. Hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ).....	42
2.4.4. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ).....	43
2.4.5. Peroksil ( $ROO^{\bullet}$ ) ve alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ) radikalleri.....	44
2.5. Antioksidanlar.....	44
2.5.1. Enzimatik antioksidanlar.....	47
2.5.1.a. Süperoksit dismutaz (SOD).....	47
2.5.1.b. Glutasyon peroksidaz (GPx).....	48

2.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar .....	50
2.5.2.a. Glutasyon (GSH).....	50
2.5.2.b. Malondialdehit (MDA).....	51
<b>3. MATERYAL ve METOD.....</b>	<b>53</b>
3.1. Deney Bitkilerinin Temini ve Teşhisi .....	53
3.2. Bitki Türlerinin Ekstraksiyonu ve Total Ekstrenin Elde Edilmesi.....	54
3.3. Çalışmada Kullanılan Mutant Bakteri Suşları, Kimyasallar ve Cihazlar .....	54
3.3.1. Çalışmada kullanılan mutant bakteri suşları .....	54
3.3.2. Çalışmada kullanılan pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler .....	55
3.3.2.a. Ames/ <i>Salmonella</i> ve <i>E. Coli</i> WP2 test sistemleri için.....	55
3.3.2.b. Mikronükleus test sistemi için.....	55
3.3.3. Çalışmada kullanılan aletler ve cihazlar.....	56
3.4. Ames/ <i>Salmonella</i> ve <i>E. Coli</i> WP2 Test Sistemleri .....	57
3.4.1. Çözeltiler ve besiyerleri.....	57
3.5. Mikronükleus Analizleri.....	63
3.5.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	63
3.5.2. Donör seçimi .....	64
3.5.3. Deney düzeneğinin oluşturulması .....	65
3.5.4. Lenfosit kültürü .....	65
3.5.5. Giemsa ile boyama işlemi .....	66
3.6. SOD, GSH, GPx, MDA Ölçümü.....	67
3.6.1. Superoksit dismutaz (SOD) ölçümü.....	67
3.6.2. Glutasyon peroksidaz (GPx) ölçümü.....	67
3.6.3. Glutasyon (GSH) ölçümü .....	68
3.6.4. Malondialdehit (MDA) ölçümü.....	69
3.7. İstatistiksel değerlendirme.....	70
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>71</b>
4.1. Mutajenite ve Antimutajenite Araştırmalarında Kullanılan Mutant Bakterilerin Genetik Özelliklerinin Kontrolü.....	71
4.1.1. Histidin/Biyotin gereksinimi .....	71
4.1.2. Triptofan gereksinimi .....	72
4.1.3. <i>uvrA</i> ve <i>uvrB</i> mutasyonları.....	72



4.1.4. <i>rfa</i> mutasyonu.....	73
4.2. Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayılarının Belirlenmesi .....	74
4.3. Pozitif Mutajenlerin ve Test Materyallerinin Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .....	74
4.4. Bitki Özütlerinin Mutajenik ve Antimutajenik Özellikleri .....	74
4.5. MN Bulguları .....	85
4.6. SOD, GPx, GSH ve MDA Bulguları.....	99
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>114</b>
5.1. Öneriler.....	129
KAYNAKLAR .....	131
ÖZGEÇMİŞ .....	144

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFB <sub>1</sub>	Aflatoksin B <sub>1</sub>
BrdU	5-Bromo-2' deoksiuridin
CA	'Chromosomal aberrations'
CAT	Katalaz
CHO	Çin Hamster Ovaryum
CMA	Klormadinon asetat
Cu, Zn –SOD	Bakır-Çinko Bulunduran SOD
DHAA	Dihidroaskorbik asit
dL	Desilitre
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DXR	Doksozobisin
EC-SOD	Ekstraseluler SOD
GPx	Gulutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
g	Gram
GS	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
I.A.R.C.	International Agency for Research on Cancer
KA	Kromozomal anormallikler
kg	Kilogram
KKD	Kardeş kromatid değişimi
L	Litre
LPO	Lipid peroksidasyonu
M	Molarite
MC	Merkurik klorit
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre

mM	Milimolar
MN	Mikro nükleus
Mn-SOD	Mangan bulunduran SOD
NADH	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Nm	Nanometre
LD <sub>50</sub>	Ortalama letal doz
PCB	Poliklorinat bifenil
PUFA	Poliansature yağ asiti
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
SCE	Sister chromatid exchange
Se	Selenyum
SOD	Süperoksit dismutaz
TNF- $\alpha$	Tümör Nekroz Faktör
mg	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aflatoksin B <sub>1</sub> 'in doğal sentez mekanizması .....	15
Şekil 2.2. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı .....	19
Şekil 2.3. Aflatoksin B <sub>1</sub> 'in dönüştüğü metabolitler .....	22
Şekil 2.4. Aflatoksin B <sub>1</sub> 'in metabolik yolları .....	23
Şekil 2.5. AFB <sub>1</sub> 'in farklı metabolitlere dönüştürülmesi ve etkileşimi .....	24
Şekil 2.6. AFB <sub>1</sub> -N7-Guanil kompleksi .....	25
Şekil 2.7. AFB <sub>1</sub> 'in metabolik yolları ve ürünleri .....	27
Şekil 2.8. AFB <sub>1</sub> 'in biyoaktivasyonu ve DNA ile etkileşimleri .....	29
Şekil 2.9. Memeli hücrelerinde meydana gelen hasarların onarım mekanizması.....	30
Şekil 2.10. Baz değişimi nokta mutasyonlarının genom üzerine olan etkileri.....	31
Şekil 2.11 MN oluşumu ve boyaması .....	34
Şekil 2.12. <i>S. cerevisiae</i> 'nin yaşam döngüsü. ....	37
Şekil 2.13. Oksidatif stres seviyesinin hücrelerde meydana getirdiği etkiler .....	39
Şekil 2.14. ROT ve antioksidanlar .....	45
Şekil 4.1. <i>S. typhimurium</i> TA1535 ve TA1537 suşlarında üreme için histidin/biyotin gereksiniminin gösterilmesi .....	71
Şekil 4.2. <i>E. coli</i> WP2uvrA suşunda üreme için triptofan gereksiniminin gösterilmesi .	72
Şekil 4.3. Test suşlarının <i>uvrA</i> ve <i>uvrB</i> mutasyonlarını taşıdıklarının gösterilmesi.....	73
Şekil 4.4. <i>S. typhimurium</i> TA1535 ve TA1537 suşlarında <i>rfa</i> mutasyonunun gösterilmesi .....	73
Şekil 4.5. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre .....	86
Şekil 4.6. Sitokinezi bolke edilmiş dört mikronükleus bulunan hücre .....	86
Şekil 4.7. Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre.....	86
Şekil 4.8. DM ve FC'nin MN sonuçları.....	96
Şekil 4.9. LV ve PS'in MN sonuçları .....	97
Şekil 4.10. PS ve RF'nin MN sonuçları.....	97
Şekil 4.11. UA ve UF'nin MN sonuçları .....	98
Şekil 4.12. VP ve XP'nin MN sonuçları.....	98

<b>Şekil 4.13.</b> <i>Dermatocarpon miniatum</i> Eschw. biyokimyasal sonuçları.....	109
<b>Şekil 4.14.</b> <i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale biyokimyasal sonuçları .....	109
<b>Şekil 4.15.</b> <i>Letharia vulpina</i> (L.) Hue biyokimyasal sonuçları .....	110
<b>Tablo 4.16.</b> <i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları.....	110
<b>Şekil 4.17.</b> <i>Parmelia sulcata</i> Taylor biyokimyasal sonuçları .....	111
<b>Şekil 4.18.</b> <i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları .....	111
<b>Şekil 4.19.</b> <i>Usnea articulata</i> (L.) Hoffm. biyokimyasal sonuçları .....	112
<b>Şekil 4.20.</b> <i>Usnea filipendula</i> Stirt. biyokimyasal sonuçları.....	112
<b>Şekil 4.21.</b> <i>Vulpicida pinastri</i> (Scop.) J.-E. Mattsson & M.J. Lai biyokimyasal sonuçları.....	113
<b>Şekil 4.22.</b> <i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr. biyokimyasal sonuçları .....	113

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çeşitli hayvanlara ait LD <sub>50</sub> değerleri. ....	17
Çizelge 2.2. Aflatoksinlerin formül ve özelliklerini gösteren çizelge .....	20
Çizelge 2.3. Papas (1999)'a göre ROT nin oluşumu .....	40
Çizelge 4.1. Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları .....	74
Çizelge 4.2. Ames- <i>Salmonelle typhimurium</i> (TA 1535, TA1537) ve <i>E. Coli</i> WP2uvrA mutajenite test sonuçları .....	75
Çizelge 4.3. Ames- <i>Salmonelle typhimurium</i> (TA 1535, TA1537) ve <i>E. Coli</i> WP2uvrA test sonuçları .....	84
Çizelge 4.4. <i>Dermatocarpon miniatum</i> Eschw. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	87
Çizelge 4.5. <i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	88
Çizelge 4.6. <i>Letharia vulpina</i> (L.) Hue total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	89
Çizelge 4.7. <i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	90
Çizelge 4.8. <i>Parmelia sulcata</i> Taylor total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	91
Çizelge 4.9. <i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	92
Çizelge 4.10. <i>Usnea articulata</i> (L.) Hoffm. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	93
Çizelge 4.11. <i>Usnea filipendula</i> Stirt. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	94
Çizelge 4.12. <i>Vulpicida pinastri</i> (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	95
Çizelge 4.13. <i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).....	96

<b>Çizelge 4.14.</b> <i>Dermatocarpon miniatum</i> Eschw. biyokimyasal sonuçları.....	99
<b>Çizelge 4.15.</b> <i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale biyokimyasal sonuçları .....	100
<b>Çizelge 4.16.</b> <i>Letharia vulpina</i> (L.) Hue biyokimyasal sonuçları.....	101
<b>Çizelge 4.17.</b> <i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları .....	102
<b>Çizelge 4.18.</b> <i>Parmelia sulcata</i> Taylor biyokimyasal sonuçları .....	103
<b>Çizelge 4.19.</b> <i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları .....	104
<b>Çizelge 4.20.</b> <i>Usnea articulata</i> (L.) Hoffm. biyokimyasal sonuçları .....	105
<b>Çizelge 4.21.</b> <i>Usnea filipendula</i> Stirt. biyokimyasal sonuçları.....	106
<b>Çizelge 4.22.</b> <i>Vulpicida pinastri</i> (Scop.) J.-E. Mattsson & M.J. Lai biyokimyasal sonuçları.....	107
<b>Çizelge 4.23.</b> <i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr. biyokimyasal sonuçları .....	108

## 1. GİRİŞ

Liken tabiri ilk olarak M.Ö. IV yüzyılda Yunanlı bilim adamı Theophrastus tarafından kullanılmıştır. Sonraki yıllarda liken olarak tarif edilen bu bitkilerin gerçekte liken olmayıp bu terimin “ciğer otları” için kullanıldığı anlaşılmıştır. İlk önceleri tek bir bitki olduğu sanılan likenler daha sonra Schwender ve Trebox’un yaptığı çalışmalar sonucunda bir mikobiyont olarak anılan fungal ortak ile bir ya da daha fazla sayıda alg ya da siyanobakter olabilen ve fotobiyont olarak anılan fotosentetik ortak ile oluşan simbiyotik canlılar olarak açıklanmıştır (Aslan 1995; Nash and Thomas 1996).

Asırlardan beri yaşadıkları bilinen likenler, mevcut durumda yaşamakta olan en yaşlı ve uzun ömürlü canlılar arasında ilk sıralarda yer almaktadırlar. *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. gibi bazı liken türlerinin yaklaşık 25 milyon yıldan beri yaşadıkları düşünülmektedir. Kimi araştırmacılara göre likenlerin yaşamış oldukları ile ilgili bu rakam nerdeyse 70 milyon yıla kadar varmaktadır (Richardson 1975; Richardson 1992; Taylor *et al.* 1995; Nash and Thomas 1996; Baron 1999; Dobson 2005; Anonymous 2013a). Likenler arktik (kutupsal) bölgeden ekvatorial bölgeye kadar yaşamsal olarak yayılış gösteren sıra dışı canlılardandır (Nash and Thomas 1996; Aslan *et al.* 1998). Likenlerin sahip olduğu bu üstün yaşam mukavemetleri birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir ve hala da çekmektedir (Altun 2007).

Günümüzde yaklaşık olarak 20.000’nin üzerinde liken türünün olduğu tahmin edilmektedir. Buna karşın ülkemizin liken florası henüz tam olarak tespit edilememiştir. Bölgemiz (Doğu Anadolu) ile ilgili yapılan çalışmalar ise günden güne artmaktadır (Öztürk ve Aslan 1991; Aslan 2000).

Likenler, yapısını meydana getiren mantar ve algden şekil ve yaşayış bakımından tamamen ayrı özellik gösterirler. Tallusun yapısında bulunan hifte renksiz bir mantar ve fotosentetik canlı (fotobiyont) bulunmaktadır. Bu fotobiyont genellikle yeşil alg ya da bir siyanobakteriden oluşmaktadır (Nash and Thomas 1996). Bununla beraber



likenlerdeki mantarın bazı sarı-yeşil alglerden ve kahverengi alglerden de oluştuğunu bilinmektedir. Fotobiyont olarak en fazla *Cyanophyta* ve *Chlorophyta*'ya ait cinsler ve *Xanthophyta* ve *Phaeophyta*'dan bazı alg türleri görülmektedir. Mantarlarda ise genellikle Ascomycetes ve az olarak da Basidiomycetes'e ait cinslerdir (Cocchietto *et al.* 2002; Sanders 2004).

Likenleri oluşturan alg ve mantar arasında bir takım fizyolojik iş paylaşımları bulunmaktadır. Mantarlar, klorofilleri olmadığından dolayı fotosentez yapamazlar. Bundan dolayı da kendi besinlerini kendileri üretemezler. Mantarlar besinlerini çürükçül olarak dışarıdan hazır alırlar. Fakat bu birliktelikte klorofil taşıyan fotobiyont ortak; mantar için karbonhidrat üreterek birlikteliğin devamını sağlarken, mantar ise fotobiyont ortağın fotosentetik ve hayatsal faaliyetlerinin devamı için su ve minerallerin alınmasında görev almaktadır (Cocchietto *et al.* 2002). Oluşturulan bu birliktelik sayesinde likenler, normal olarak yaşayamayacakları alanlarda yaşayabilmektedirler (Nash and Thomas 1996).

Likenlerin primer metabolitleri yalnız fotosentetik partner olan algler tarafından sentez edilmektedir (Huneck 1999; Boustie and Grube 2005). Likenler tarafından sentezlenen alifatik ve aromatik bileşikler ise mantar tarafından sentez edilen sekonder metabolitler olup günümüze kadar 800'den fazla sekonder metabolit saflaştırılmış ve yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak karakterize edilmiştir (Huneck 1999; Culberson 1969; Boustie and Grube 2005).

Likenler yavaş büyümelerini ürettikleri aromatik yapıları sekonder metabolitler sayesinde avantaja çevirebilmektedirler (Cocchietto *et al.* 2002; Dilsizoğlu vd 2004; Yazıcı ve Aslan 2006). Likenlerin ürettikleri bu maddelerin çoğu asit özelliği gösterdiği için bunlara karakteristik olarak "liken asitleri" denilmektedir. Likenlerin bu asidik maddeleri %1–5 oranında, liken ekstrelerinin ise çoğu zaman %25'lere varan oranlarda sekonder madde içermeleri bunların izolasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bundan dolayı da likenler tohumlu bitkilere nazaran daha fazla önem kazanmaktadır (Öztürk ve Aslan 1991).

Likenlerdeki organik maddelerin büyük kısmı fungal kaynaklıdır. Organik temelli ürünler genellikle suda çözünmezler ancak organik çözücülerde çözünürler. Bundan dolayı liken ekstraktlarının elde edilmesi için organik çözücüler kullanılmaktadır. Likenlerdeki asetilpolimalonil gibi sekonder metabolitlerin çoğu, şikimik ve mevalonik asit gibi asitlerin bir kısmı biyosentetik yolla sentezlenmektedir (Nash and Thomas 1996).

Likenler, ülkemizde ve dünyada çok eski zamanlardan beri halk hekimliğinde değişik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Birçok ülkedeki yayınlara dayanarak hazırlanan Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) araştırmasına göre, dünyada tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam tür sayısı 15.000 civarındadır. Tıbbi amaçla kullanılan bu bitkilerin arasında ise likenler önemli bir yer tutmaktadır (Öztürk ve Aslan 1991; Aslan 2000).

Yüzyıllardır halk sağlığında kullanılan likenlerden ürettikleri sekonder metabolitlerine göre değil morfolojik yapılarına bakılarak istifade edilmiştir. Bundan dolayı önceleri kullanılan likenlerin çok özel sekonder metabolitleri kimyasal olarak tam aydınlatılamamıştır. Liken kimyası üzerine ulaşılan ilk kayıtlar 19. Yüzyılda yaşayan, bu sahaya önemli katkıları bulunan ünlü Alman kimyacı Wilhelm Zopf'un 1895'te "Annalen der Chemie (284: 107–132)" dergisinde yayımlanan "Zur Kenntnis der Flechtenstoffe" adlı eseri olmuştur. Liken kimyası hakkında diğer bir kilometre taşı ise pek çok kimyasal bileşiğin yapılarını aydınlatan Japon araştırmacılar Yasuhiko Asahina ve Shōji Shibata'nın çalışmaları olmuştur. 1970'lere gelindiğinde Y. Asahina, S. Shibata, C.F. Culberson ve S. Huneck gibi araştırmacıların likenoloji alanında dönüm noktası sayılan yayınladıkları kitaplarda 400'den fazla liken asitlerinin kimyasal yapıları aydınlatılmıştır. Ayrıca aynı araştırmacılar, hangi liken türünde hangi metabolitlerin bulunduğunu ve bu liken metabolitlerinin kimyasal yapıları ile izolasyon tekniklerini de rapor etmişlerdir.

20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren ince tabaka kromatografisinin (TLC) keşfiyle birlikte çeşitli likenlerin içerdiği bileşiklerin aydınlatılmasında önemli yol kat edilmiş,

bu sayede likenlerin sınıflandırılmasında “kemotaksonomi” adı altında yeni bir yaklaşım ortaya çıkmıştır. Gelişen teknoloji ve yöntemler sayesinde günümüze kadar 800 den fazla liken asitlerinin kimyasal bileşiğinin yapısı aydınlatılmış, bilim adamları artık yeni moleküller peşinde koşmaktansa mevcut moleküllerin biyolojik önemini araştırmaya başlamıştır. Yapısı aydınlatan maddelerden özellikle protolikesterik asit, pulvinik asit ve türevleri, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asidin en yüksek biyolojik aktivite gösteren liken maddeleri olduğu saptanmıştır (Aslan vd 1998, 1999; Tokat 2004; Boustie and Grube 2005; Ağar vd 2010; Aslan vd 2011; Kotan vd 2011, 2013; Alpsoy vd 2011; Nardemir vd 2013).

Likenlerin sekonder metabolitleri birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle biyolojik aktivite çalışmalarında bu sekonder maddelerin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmekte ve bilhassa ilaç araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır (Huneck 1999). Likenlerin insanlardaki toksisitesiyle ilgili çok az sayıda veri bulunmakla birlikte, kaydedilmiş yan etkiler, lokal tahrişler ve bazen konjuktivit (genel anlamda gözü koruyan zarın iltihaplanması) ile beraber meydana gelen alerjik deri iltihabı ile sınırlıdır (Ingólfssdottir 2002). Likenlerin neden olduğu alerjik etkiler uzun zamandan beri bilinmekte olup, bu yan etkinin liken asitlerine karşı duyarlılık derecesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Ingólfssdóttir 2002). Yani liken asitlerine karşı duyarlı kişilerde bu yan etkiler görülebilir. Duyarlı kişilerde alerjiye neden olan liken asitleri arasında usnik asit, diffraktaik asit, lobarik asit, barbatik, salazinik, ve stistik asit gibi birçok asit yer almaktadır (Evans and Schmidt 1980; Thune and Solberg 1980).

Likenler, aminoasit türevleri, şeker alkolleri, alifatik asitler, makrolitik laktonlar, monosiklik aromatik bileşikler, kinin, dibenzofuran, depsid, depsidon, terpenoid, steroid, karatenoid ve difenil eterleri içine alan pek çok sınıfa ait 800’ün üzerinde sekonder metabolit üretmektedir (Huneck and Yoshimura 1996).

Likenlerden elde edilen bu 800’ün üzerindeki maddelerin büyük çoğunluğunun çok çeşitli biyolojik aktiviteler sahip oldukları bilinmektedir. Biyolojik aktiviteye sahip liken maddelerinin bir kısmının antibiyotik özelliğe sahip olduğu belirtilmiş olup bu

konuda dünyada ve ülkemizde çok sayıda çalışmalar yapılmıştır ve yapılmaya da devam etmektedir. Bu çalışmalar neticesinde günümüzde likenlerden elde edilen 60'dan fazla antibiyotik madde tespit edilmiştir. Farklı liken türlerinden izole edilmiş protolikesterinik asit, pulvinik asit türevleri, depsid grubundan evernik, olivetorik asit, tridepsid grubundan giroforik asit, depsidon grubundan fisodik, lobarik, fumarprotosetrarik asitler ile dibenzofuran türevlerinden usnik asidin antimikrobiyal etkileri saptanmıştır. Bunlardan özellikle protolikesterinik asit, pulvinik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asidin en yüksek antimikrobiyal etki gösteren liken maddeleri olduğu belirlenmiştir (Vartia 1950; Gücin vd 1997; Dülger vd 1998; Ingólfssdottir 2002; Boustie and Grube 2005).

Liken asitlerinden evernik asit ile usnik asidin karışımından Evosin adlı madde elde edilmektedir. Bu evosin maddesinin kuvvetli antibiyotik etkisinin özellikle Gram (+) coccuslar üzerine ve *Mycobacterium tuberculosis* (verem basili) ile *Corynebacterium diphtheria* (difteri basili)'ya karşı olduğu bildirilmiştir. *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Mycobacteriuma* karşı ise usnik asidin Na<sup>+</sup> tuzlarının kuvvetli antibiyotik etkisi olduğu tespit edilmiştir. *Ramalina reticulata*'dan elde edilen diğer bir antibakteriyal madde ise *Pneumococ*, *Staphylococcus* ve *Streptococ*'lar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Halen tüberküloza karşı *Cladonia* çayı kullanılmaktadır (Tutel 1986).

Likenlerde genel olarak arabinitol, eritritol, gliserol, glikoz, polioller, ribitol, sükroz, trehaloz, volemitol, D-D-sifutol gibi şekerler yaygındır (Honda and Vilagas 1998). Likenlerin protein yapılarıyla ilgili ise düzenlenmiş veya izolasyonu yapılmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Fakat 1988 yılında Vincent, likenlerdeki karbonhidratları, lipidleri, fenolik maddeleri, azot metabolizmasını ve liken enzimolojisini kapsayan bir inceleme çalışması yapmıştır (Honda and Vilagas 1998).

Liken asitleriyle yapılan son çalışmalarda ise liken sekonder metabolitlerinin insektisit aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Emsen 2012). Bu çalışmalara bakıldığında, likenlerin ürettiği çeşitli metabolitlerin bazı böcek, salyangoz ve nematodlar için zehirli olduğu, *Evernia prunastri* (L.) Ach. likeninden izole edilen değişik liken asitlerinin de

*Toxocara canis* (köpek kurdu) larvaları üzerinde nematosidik etki gösterdiği bildirilmiştir (Ahad *et al.* 1991; Purvis 2000).

Zararlı bir çay termiti olan *Glyptotermes dilatatus*'a karşı *Usnea* likeninin farklı türleri düşük dozlarda önemli seviyede antitermit etki göstermiştir. Çeşitli likenler tarafından üretilen pulvinik asit, salazinik asit, vulpinik asit ve usnik asidin *Spodoptera littoralis*'in (yaprak kurdu) larva gelişimini azalttığı belirlenmiştir (Emmerich *et al.* 1993; Giez *et al.* 1994; Kathirgamanathar *et al.* 2006).

Yine vulpinik asit, fisodik asit, salazinik asit ve usnik asidin otlarda tohum çimlenmesini ve kök büyümesini inhibe ettiği kaydedilmiştir. Örneğin; *Peltigera canina* (L.) Willd likeniyle aynı ortamda yetişen ot kolonilerinin kök sistemlerinin çok az geliştiği görülmüştür. Bu asitleri (vulpinik asit, fisodik asit, salazinik asit ve usnik asit) içeren *Cladonia* cinsine ait likenlerin konifer ormanlarında ağaç fidelerinin büyümesini ve karayosunu sporlarının çimlenmesini inhibe ettiği bilinmektedir (Halıcı ve Aksoy 2004). Aynı etki şekliyle barbatik asit, difraktaik asit, lekanorik asit gibi liken asitlerinin de marul ve salatalık filizlenmesini inhibe ettiği düşünülmektedir (Nishitoba *et al.* 1987).

Bu asitleri dışında eskiden beri ve günümüzde de liken türlerinin çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. Geçmişten günümüze kadar likenlerin tıbbi amaçlı olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Ayrıca likenlerin sekonder metabolitlerinden dolayı ilaç yapımında ve kozmetikte kullanıldıklarıyla ilgili çalışmalarda mevcuttur. Bununla beraber özellikle yerel halk tarafından likenlerden elde edilen boyalar sayesinde boya amaçlı da kullanılmışlardır. Bunlara ek olarak, likenler kıtlık zamanlarında insanlar tarafında besin olarak da değerlendirilmiştir. Ayrıca likenler çok değişik hayvan ve böceklerin yiyeceği olma özelliğini de taşımaktadır (Karamanoğlu 1971; Smith 1975; Zeyrek 1982; Tutel 1986).

Likenlerin günümüzde tıbbi olarak kullanım alanlarına bakıldığında; antibakteriyal, antiviral, antitümoral, antiprotozoal, antioksidan, antitumajenik, antienflamatuar,

analjezik, antipüretik, antiproliferatif, antiülserojenik, enzim inhibitör aktiviteleri, genler üzerine etkileri gibi değişik çalışmalar sayılabilir. Bunların dışında halk arasında ise; soğuk algınlıkları, kuduz hastalığı, barsak kurtlarının düşürülmesi, alerji, ateşli hastalıklar, sarılık, cilt hastalıkları, humma nöbetleri, boğmaca, öksürük ve solunum yolu hastalıkları ve kemik kırıklarının tedavi edilmesinde istifade edilmiştir. Diğer yandan balgam sokturucu olarak ve laksatif amaçlı, damar büzücü olarak kan akışının engellenmesinde, saçların dökülmesinin engellenmesinde ve saçların gürleştirilmesinde de kullanıldıkları kayıtlıdır (Vartia 1950; Vartia 1973; Raju *et al.* 1985; Yamamoto *et al.* 1995; Aslan vd 1998, 1999; Neamati *et al.* 1997, Huneck 1999; Müller 2001; Brodo 2001; Ingólfssdottir 2002; Tokat 2004; Boustie and Grube 2005; Behera *et al.* 2005).

16. yy'den itibaren dekoksasyon ve infüzyon şeklinde birçok hastalığın tedavisinde likenler kullanılmıştır. İnsanlar likenleri kullanırken yapılarında bulunan sekonder metabolitlerine göre değil morfolojik şekillerine bakarak değerlendirmiş, renklerine, morfolojik benzerliğine veya organlara benzerliklerine göre ilişkilendirerek tedavi amaçlı kullanmışlardır. Örneğin: Uzun iplikli bir yapıda olan *Usnea florida* (L.) Weber *ex* F.H. Wigg. saç uzatmak, saçların dökülmesini engellemek ve gürleştirmek için, loblu bir tallusa sahip olan ve akciğerin içyapısına benzetilen *Lobaria pulmonaria* L. (Hoffm.) akciğer hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Karamanoğlu 1971; Smith 1975; Zeyrek 1982; Tutel 1986; Galun 1988; Dilsizoğlu vd 2004; Boustie and Grube 2005). Benzer şekilde sarı renkli liken olan *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. sarılık hastalığının tedavisi için önerilmiştir. Tallus yapısı küçük siğile benzer tüberküllere sahip *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. pamukçuk hastalığına yakalanmış çocukların tedavisi için önerilmiştir. Kafatası likeni olarak isimlendirilen *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. veya diğer bazı türlerin epilepsi tedavisi için altın kadar değerli olduğu belirtilmiştir (Tokat 2004).

Kolombiya'da yaşayan Hesquiat halkı *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. likenini verem hastalığının tedavisinde kullandığına dair kayıtlar bulunmaktadır. Likenlerin bu tedavi edici etkisi, yapılarında oluşturdukları sekonder metabolitler olan stistik asit, giroforik asit ve norstistik asit gibi liken asitlerinden kaynakladığı düşünülmektedir (Asahina

1967). Günümüzde de liken asitlerinin kullanılması ile egzama, solunum ve dolaşım yolu hastalıkları (Biswas 1956; Huneck and Yoshimura 1996), ülkemizde ise kanamanın durdurulması ve yaraların tedavi edilmesi için kullanılmaktadır.

Hipokrat *Usnea barbata*'yı rahim hastalıkları için tavsiye etmiştir. *Usnea longissima* Ach.'dan Çin'de "Sun lo" adı altında karışım hazırlanarak balgam söktürücü olarak ve ülser tedavisi için ise pudra yapılarak tüketilmek suretiyle faydalanılmıştır. *Usnea*'nın türleri Malaya Adaları'nda tonik şeklinde ve soğuk algınlıklarında hala tüketilmektedir. Eski zamanlarda *Peltigera canina* (L.) Willd. kuduz hastalığına karşı, *Peltigera apthosa* (L.) Willd. barsak kurtlarını düşürmede ve ardıç kuşu kızartılarından ıstırap çekenlerde, *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. ise ateşli hastalıkların ve sarılık hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Tokat 2004).

*Cetraria islandica* (L.) Ach. ve *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar & Vězda öksürük ve solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve göğüs yumuşatıcı pastillerin yapımı için değerlendirilmiştir. Günümüzde birçok ilaç fabrikaları tarafından likenlerden elde edilen pastil ve şuruplar olduğu gibi bu likenlerin çayı dahi bulunmaktadır (Tokat 2004; Acar 2010).

Akciğer ve sinirsel hastalıkların tedavisinde *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. ve *Parmelia sulcata* Taylor likeninden (Dilsizoğlu vd. 2004; Boustie and Grube 2005; Mutlu 2008), Kuzey Kaliforniya halkı ise mide hastalıklarının tedavisinde *Letharia vulpina* (L.) Hue (L.) Hue. likeninden istifade etmişlerdir (Tokat 2004). Waorani çalışmasında halüsinasyonun engellenmesinde *Dictyonema*'nın bir türünü denemiştir (Davis and Yost 1983). *Alectoriausneoides splenomegali* Arabistan tıbbında dalak büyümesinin tedavisinde, *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zopf. ise solunum hastalıkları için Alfacar ve Viznar tarafından yoğunlaştırılmış içecek şeklinde tüketilmiştir.

*Ramalina bourgeana* Mont. Ex Nyl. ise idrar söktürücü ve taş eritme özelliklerinden dolayı tüketilmektedir (González-Tejero 1995). Polonya'da yaşamakta olan yerli halk

Qollahuaya Andeans'lar, *Flavocetraria nivalis*'i (L.) Kärnefelt ve Thell hazırladıkları liken çayıyla kalp krizi ve mide bulantısı tedavisi için kullanmaktadırlar (Bastien 1983).

Likenlerin kullanım alanlarında biri de besin olarak tüketilmesidir. İskandinavlıların *Cetraria islandica* (L.) Ach. (İzlanda likeni) türlerine verdikleri isimlerden biri "brodmose" yani ekmek yosunudur. Açlık ve kıtlık zamanında İskandinavlar bu likeni öğütürerek buğday unu veya patatese katmak suretiyle erzaklarının miktarını ve yiyecek kalitesini artırırlardı. Kutuplarda yaşamakta olan insanlar da *Cetraria islandica* (L.) Ach. 'dan iştah açıcı özelliğinden dolayı istifade etmişlerdir. Bununla beraber bu likenden ekmeğin yanı sıra çorbada yapmışlardır. *Cetraria islandica* (L.) Ach. likeninden elde edilen peltensi bir kıvam şeker, limon suyu, badem ve çikolata ile karıştırılarak bir tür şekerleme dahi yapmışlardır. *Cetraria islandica* (L.) Ach. laksatif olarak da kullanılmıştır. İkinci Dünya Savaşı sırasında Rusya'da *Alectoria ochroleuca*, *Cetraria islandica* (L.) Ach. ve *Cladina* cinsine ait liken türleri bir tür pekmez yapımı için de kullanılmışlardır. Ayrıca likenlerin meşrubat üretimi için de kullanıldıkları bilinmektedir (Anonim 2013a). Ekmek yapımında Mısırlılar da *Evernia prunastri* (L.) Ach.'yi nadir olarak da *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. 'yı kullanmışlardır (Anonim 2013a).

Çoğunlukla faydalı amaçlar için kullanılan likenlerden bazıları, içerdikleri sekonder metabolitlerden dolayı vücuda alındığında tahriş edici özelliği nedeniyle zehir etkisine sahiptir. Bu özellik bakımından en iyi bilinen liken türleri ise *Letharia vulpina* (L.) Hue ve *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai'dir. *L. vulpina* limon sarısı renge olup kuvvetli tahriş özelliğine sahip vulpinik asit içerir. *V. pinastri* ise turuncu veya altın sarısı renge olup yapısında pinastrik asit içermektedir. *L. vulpina* kuzey ülkelerinde kurtları zehirlenmek için kullanılmaktadır. Bu türlerden başka hiçbir liken türü öldürücü değildir. Fakat içerdikleri liken asitleri yönünden bağırsak bozukluklarına sebep olduğu bilinmektedir (Öztürk 1995).

Birkaç istisna dışında (*Letharia vulpina* (L.) Hue ve *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai) likenler zehirsiz bitkilerdir. Likenler içerdikleri asidik karakterli



(Liken asitleri) maddelerden dolayı tatları acımsıdır. Bundan dolayı likenler acı tada sahip olduklarından kuvvetlendirici olarak da kullanılmıştır. *Pertusaria* 'nın *Pertusaria amara* (Ach.) Nyl. gibi bazı acı türleri ateş nöbetleri için tavsiye edilmiştir. *Usnea* türleri ve *Pseudoevernia furfuracea* (L.) Zopf basur tedavisinde sıkılaştırıcı olarak yararlanılmıştır (Tokat 2004).

Hastalıkların tedavisi ve besin olarak kullanılmalarının dışında ekonomik bakımdan çevresel indikatör olmaları ve endüstriyel amaçla likenlerden başka alanlarda da istifade edilmiştir (Öztürk ve Aslan 1991). Örneğin; insanlar en önemli özellik olarak 19. yüzyılın son yarısına kadar geçen zaman aralığında, tıbbi kullanılmalarının yanı sıra yünlerin ve giysilerin boyanması işleminde likenlerden istifade etmişlerdir (Aslan 2000). Fakat bugün onların en önemli faydası çevresel indikatör olmalarıdır. Kumaş ve yünlerin boyanmasında kırmızıdan menekşe rengine kadar çok farklı renkler elde edilmekle beraber, kahverenginin değişik tonları da elde edilmiştir. Akdeniz ülkelerinde gelişen *Roccella tinctoria* DC., *Roccella fuciformis* (L.) DC. ve diğer *Roccella* türleri boya elde edilen liken türleri arasında birinci derecede önemlidir (Öztürk 1995). Afrika, Güney Amerika, Kalifornia kıyıları, Kanarya adaları, Madagaskar, Akdeniz ve Atlas okyanusu sahillerinde yayılış gösteren orchil liken türlerinden *Roccella fuciformis* (L.) DC., *Roccella arnoldi* Vain., *Ochrolechia tartarea* (L.) A.Massal., *Ochrolechia parella* (L.) A.Massal. gibi türlerden fermentasyon yoluyla orsey=orchil=Orseille, Percio, veya cudbear adı altında satılan bu maddelerden turnusol boya yapılmaktadır (Anonim 2013a).

20. yüzyılın sonlarına doğru gelindiğinde araştırmacıların likenlerle çalıştığı konulardan biri de “Likenin” maddesinin endüstride hidrolizi yapılarak glikoz ve alkol elde edilmesi olmuştur. Tallus yapısında bulunan likenin maddesi zayıf hidrojen sülfat ve hidrojen nitrat ile muamele edilerek glikoza dönüştürülmekte ve onun fermantasyonu ile de alkol oluşmaktadır (Öztürk 1995).

Likenlerin kullanım alanlarından bir diğeri de parfümeri ve kozmetik alanlarıdır. “Meşe yosunu” olarak isimlendirilen *Evernia prunastri* (L.) Ach.‘den Fransa’da son derece iyi

bir parfüm elde edilmekte, ayrıca *Ramalina calicaris* (L.) Fr. ve *R. fraxinea* (L.) Ach. türleri de parfüm yapımında kullanılmaktadır. Daha iyi bir parfüm ise *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.'dan elde edilmektedir. Bu likene “meşelerin tabanındaki yosun” adı verilmiştir. Az bulunduğundan dolayı *Evernia*'ya oranla daha az kullanılmaktadır. Günümüzde önemli bir endüstri kolu olan kozmetikte yaygın olarak değerlendirilen liken türleri *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf., *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.'dır, ender olarak kullanılanlar ise *Anaptychia ciliaris* (L.) Körb., çeşitli *Usnea* ve *Physcia* türleridir. Bu likenler bazen parfüm içinde tek başlarına değil bir karışım halinde kullanılabilirler. Bileşimine girdiği parfüme hoş bir koku ve kalıcılık sağlamaktadırlar (Tokat 2004, Anonim 2013a).

Geçmişten beri tıbbi amaçla kullanılmaları, hali hazırda aydınlatılmış bazı liken sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivitelere sahip olmalarından dolayı likenler günümüz araştırmacılarının dikkati çekmiştir. Şimdiye kadarki çalışmalar değişik liken türlerinin mutajenik etkiye sahip olmadığını fakat antimutajenik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Huneck 1999; Ağar vd 2010; Güllüce vd 2011). Araştırmacılar, likenlerin antimutagenik etkisinin yapılarında bulunan sekonder metabolitlerin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını tespit etmişlerdir (Gülçin vd 2002; Aslan vd 2006; Güllüce vd 2006; Ağar vd 2010; Aslan vd 2011; Kotan vd 2011,2013; Alpsoy vd 2011; Güllüce vd 2011; Nardemir vd 2013; Alpsoy vd 2013).

Likenlerin antioksidan aktiviteye sahip olmaları (Pietta *et al.* 1998) onların besin şeklinde alınmaları halinde ömür uzunluğunu ve antimutajenik aktiviteyi artırabileceğini düşündürmüştür. Bu noktadan hareketle antioksidan aktiviteye sahip olan *L. pulmonaria* (L.) Hoffm. likeninin metanol, kloroform ve su özütlerinin *Drosophila melanogaster*'in ergin bireylerinde ömür uzunluğu üzerine etkileri olduğu belirlenmiştir (Altun vd 2007; Uysal 2009; Altun 2010).

Antimutajenik ve antikarsinojenik özelliğe sahip kimyasal bileşikler araştırarak ve keşfetmek insanlarda artan kanser riski ve mutasyon oranlarındaki artışın beraberinde getirdiği istenmeyen sonuçlar nedeniyle günümüzde zorunlu hale gelmiştir (Hartman

and Shankel 1990) . Kanseri de içine alan çeşitli hastalıkların gelişmesine karşı bu metabolitlerin koruyucu olabileceğini gösteren *in vivo* ve *in vitro* deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; kimyasal olarak koruyucu etkiye sahip bitki metabolitleri üzerine antimutajenik ve antigenotoksik çalışmaların büyük ölçüde artmasını da sağlamıştır (Abdullaev *et al.* 2003).

Çeşitli maddelerin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerinin araştırılmasında asıl itibariyle canlı deney hayvanları ile yapılan yani *in vivo* çalışmalar akıllıca ve doğru çalışmalardır. Fakat *in vivo* çalışmalarda kullanılan maddelerin verilerinin elde edilmesi aşaması oldukça uzun, sıkıntılı ve maddi olarak da külfetli çalışma süreçlerinden oluşmaktadır. Bundan dolayı araştırmacılar daha kısa süreli, basit ve ucuz araştırma yöntemleri geliştirmeye çalışmışlardır. *In vitro* olarak da bilinen bu deneysel yöntemler; çok sayıdaki kimyasal madde ile yapılacak olan öncü testler için oldukça uygundur. Mutant *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* suşlarının kullanıldığı Ames ve *E. coli* WP2 bakteriyal test sistemleri, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerine örnek olarak verilebilir (Mortelmans and Zeiger 2000; Mortelmans and Riccio 2000; Abdullaev *et al.* 2003).

Ayrıca, MN yöntemi de, ökaryotik çalışmalarda sıkça başvurulan kolay, ucuz, aydınlatıcı ve fikir verici veriler sunan, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik ve antimutajenik potansiyellerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biridir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011; Üstüner 2011).

Yukarıda bahsi geçen test sistemlerinin sağlamış oldukları avantajlardan dolayı, bu çalışmada canlıların maruz kaldıkları mutasyonların önlenmesi ve likenlerin ürettikleri sekonder metabolitlerin antimutajenik özellikte olanlarının hangi türlerde bulduklarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bunun için çalışmamızda kullandığımız 10 farklı liken türlerinden elde edilen total (n-Hekzan, Dietileter, Aseton ve Metanol) liken özütlerinin mutajenik ve antimutajenik potansiyelleri;

1- *Escherichia coli* WP2uvrA, *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşları ve insan lenfosit kültüründe, mutajenite ve antimutajenitenin göstergesi olan mikronukleus (MN) yöntemi kullanılarak belirlenmesi,

2- İnsan lenfosit kültürlerinde (SOD, GPx, GSH ve MDA) total liken özütlerinin antioksidan özelliklerinin tespiti (enzimleri), etki derecelerinin belirlenmesi ve antimutajenik özelliklerinin antioksidan özelliklerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Aflatoksinler

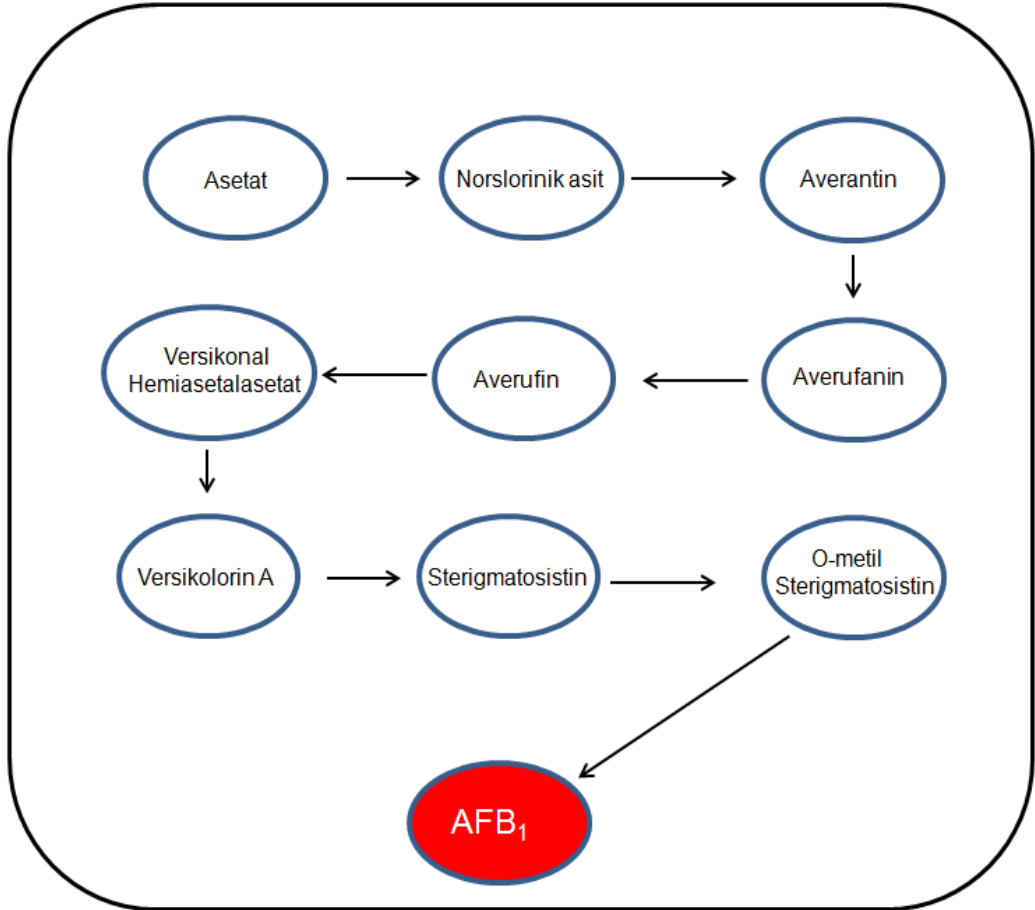
#### 2.1.1. Aflatoksinlerin ilk bulunuşu ve isimlendirilmesi

Funguslar genellikle kıymetli antibiyotik üretmelerinin yanında insan ve hayvanlar için toksik özellikli metabolitler de ürettikleri daha az bilinmektedir. En çok çalışılan mikotoksin olan aflatoksinler ilk olarak 1960-62 yılları arasında keşfedilmiştir (Özkaya ve Temiz 2003). İlk kez yer fıstığı ununda *Aspergillus flavus*'dan izole edilen aflatoksinleri *Aspergillus* ailesine ait 3 tür üretmektedir. *Aspergillus flavus* yalnızca aflatoksin B üretirken diğer türler ise *parasitikus* ve *Aspergillus nominus* ile *Penicillium* (*P.puberulum*) ve *Rhizopus* cinsi funguslar hem aflatoksin B hem de G üretirler (Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013). Aflatoksinler, yapısal olarak “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılan toksinlerdir. Bu fungus türlerinden *A.flavus* AFB<sub>1</sub> ve AFB<sub>2</sub>, *A.parasiticus*'da AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> toksinlerini üretirler. Bu toksik maddeler isimlerini üretilmiş oldukları *Aspergillus* cinsinin “A”sı *flavus*'un “fla”sı alınarak sonuna Yunancada zehir anlamına gelen “toksin” kelimesinin eklenmesiyle oluşturulmuşlardır. Aflatoksinler canlı hücrelerde son derece tehlikeli ve ciddi problemlere yol açan kimyasal kanserojenlerdir (Kurt ve Aksoy 2006; Alpsoy 2008; Kotan 2010; Çeker 2011; Çolakoğlu 2012; Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013).

#### 2.1.2. Aflatoksinlerin özellikleri

Aflatoksin kontaminasyonuna tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de rastlanılır. Aflatoksin düzeyindeki dalgalanma kuralıkla bağlantılıdır. Özellikle sıcak ve rutubetli yerlerde 3-4 gün gibi kısa sürede kontaminasyon gerçekleşir. Aflatoksinler normal şartlar altında 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklara dayanıklıdır. Bununla beraber, parçalanması için 300°C'nin üzerine kadar ısıtılması gerekmektedir. Bundan dolayı

kontamine buğdayla yapılan ekmekler ısıtılsa bile aflatoksinlerin %14-26'sı hala aktif olarak kalmaktadır (Polat 2013). Aflatoksinin doğal olarak sentez mekanizması şekil 2.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Aflatoksin B1'in doğal sentez mekanizması (Polat 2013).

AFB<sub>1</sub>, gıdalarda ve hayvan yemlerinde çokça karşılaşılan bir mikotoksindir. Yüksek dozları toksik etki göstermek suretiyle önemli sağlık sorunları ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Düşük dozları ise, güçlü hepatokarsinojen, mutajen ve teratojen olup ayrıca bağışıklık sistemini de baskılamaktadır. Ayrıca AFB<sub>1</sub> bağışıklık sistemini baskılamasının yanında bağırsak kanamaları ve sakat doğumlara da neden olmaktadır. Balıklar, kuşlar ve memelilerin birçok türü aflatoksinin etkilerine karşı hassastırlar (Akkaya 2011).

Aflatoksinler çeşitli gıda veya hayvan yemleri aracılığıyla alınır. Sindirim kanalından sınırlı miktarda emilerek dolaşım sistemin geçen aflatoksinler başlıca karaciğerde ve kaslarda olmak üzere tüm vücutta dağılım gösterirler. Aflatoksinler vücuda girdikten sonra 24 saat içinde %75'lik kısmı dışkı ile atılmaktadır. Geriye kalan kısmın %15-20 kadarı idrarla atılırken, diğer kalanı ise metabolitler halinde veya herhangi bir değişikliğe uğramadan sütle atılmaktadır. Bununla beraber aflatoksinlerin %5-6'lık bir kısmı karaciğerde tutulmaktadır (Alpsoy 2008; Kotan 2010; Stark 2010). Aflatoksinli besinler ile beslenmiş olan hayvanlarının (sığır, inek, tavuk vb.) et, süt ve yumurtalarında aflatoksinlere rastlanılmıştır. Bu durum insanlar için son derecede tehlike arz etmektedir. Çünkü aflatoksinli gıdalar ile beslenen insanlara bu toksinler sindirim yoluyla girmektedir (Kurt ve Aksoy 2006; Alpsoy 2008; Kotan 2010; Çeker 2011, Akkaya 2011; Çolakoğlu 2012; Polat 2013, Arslan 2013, Karapınar 2013).

Aflatoksinlerin canlı vücuduna toksik etki değerleri farklılıklar göstermektedir. Aflatoksinler içerisinde toksisitesi en güçlü olanı AFB<sub>1</sub>'dir. Bunu azalan sırayla AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> ve AFG<sub>2</sub> izlemektedir. Hayvanların çoğunda AFB<sub>1</sub>'in LD<sub>50</sub> değeri 0,5–10 mg/kg arasında değişmektedir (LD<sub>50</sub>: Aflatoksinin hayvanlara verildiğinde %50 oranında ölüme neden olan dozdur). Örneğin: kedi, köpek, alabalık, ördek ve hindi gibi hayvanlar duyarlılığı en fazla olan canlılardır. Bununla beraber keçi, koyun, sığır, at, rat, bildircin gibi hayvanlar orta derecede duyarlılık göstermektedir. Maymun ve fare gibi canlılar ise aflatoksine en az duyarlılığa sahip canlılardır (Alpsoy 2008; Kotan 2010; Çeker 2011; Akkaya 2011; Çolakoğlu 2012; Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013). Çeşitli hayvanlara ait LD<sub>50</sub> değerleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Çeşitli hayvanlara ait LD<sub>50</sub> değerleri (Akkaya 2011).

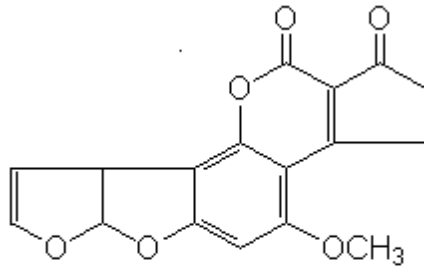
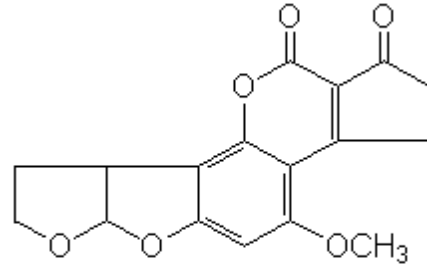
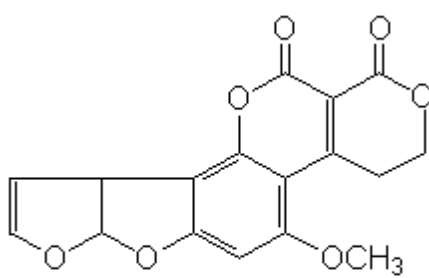
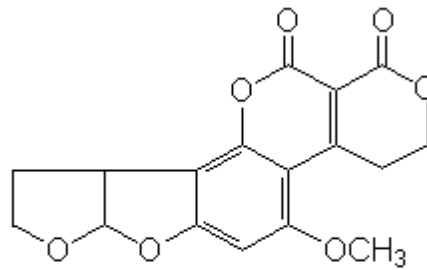
Toksin	Hayvan	Yaş/Ağırlık	LD <sub>50</sub> (mg/ kg)	
AFB <sub>1</sub>	Ördek	1 günlük	0.37	
AFB <sub>2</sub>			1.69 (84.8 µg/50 gm Ördek)	
AFG <sub>1</sub>			0.79	
AFG <sub>2</sub>			2.5 (172.5 µg/ Ördek)	
AFM <sub>1</sub>			0.8 (16.6 µg/ Ördek)	
AFB <sub>1</sub>	Tavşan		0.3-0.5	
	Kedi		0.55	
	Domuz	6-7 kg	0.62	
	Hindi		0.5-1.0	
	Köpek	yavru	0.5-1.0	
	İnek	genç	0.5-1.0	
	Kobay Domuz		1.4-2.0	
	At	genç	2.0	
	Koyun		2.0	
	Maymun		2.2	
	Piliç		6.5-16.5	
	Fare		9.0	
	Hamster		10.2	
	Fare, Erkek		21 günlük	5.5
	Dişi			7.4
Erkek	100 gm	17.9		

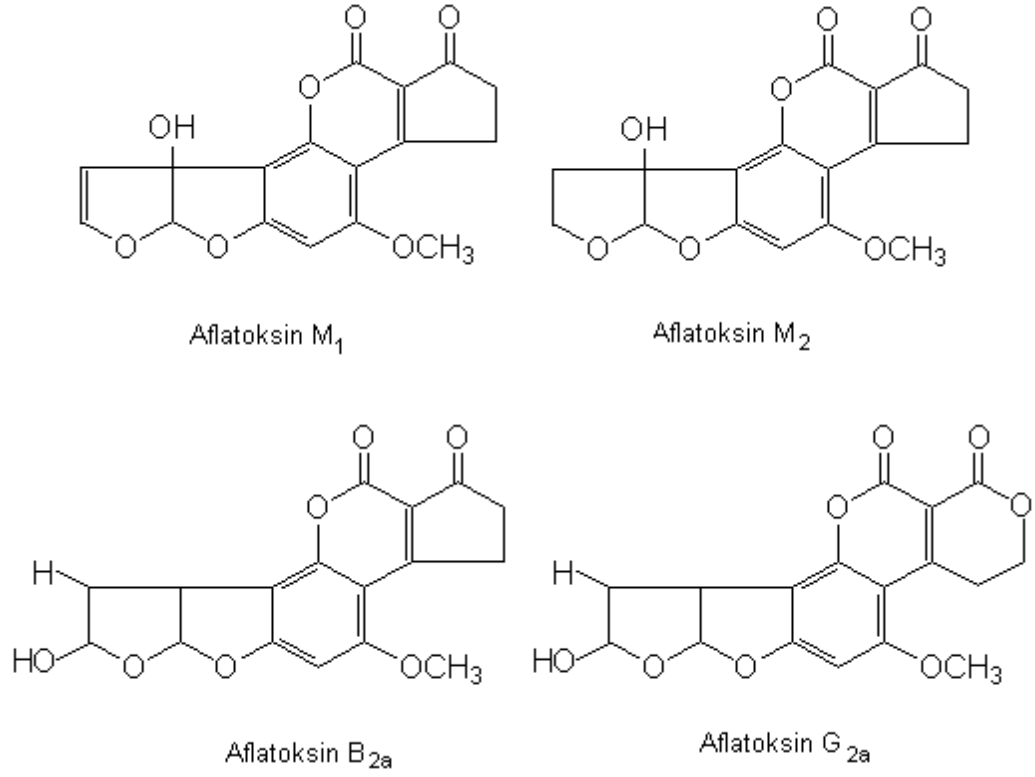
### 2.1.3. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı

Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmıştır. Ayrıca aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> olmak üzere dört ana gruba ayrılmış bulunmaktadır. Bu isimlendirme işlemi ince tabaka kromatografisinde (TLC), aflatoksin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> 'nin uzun dalga boylu UV ışığında mavi floresan renk, aflatoksin G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin ise yeşil floresan renk vermesiyle ilişkilidir (Alpsoy 2008; Güley 2008; Kotan 2010; Çeker 2011; Akkaya 2011; Canavar 2011; Sadıkoğlu 2011; Çolakoğlu 2012; Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013). Ayrıca B toksinlerinde kumarin yapıdaki lakton halkasına ekli siklopentenon halkası, G toksinlerinde ise ek olarak bir lakton halkası içermektedir (Özkaya ve Temiz 2003).



Kimyasal yapı olarak lakton bağı ve bifuran halkası içeren difurano kumarin türevi olan aflatoksinler Ultraviyole ışığı altında mavi ve yeşil renk vermelerine dayalı olarak ayrılırlar. Aflatoksinler, kloroform ve metanol gibi polar çözücülerde ve özellikle dimetilsülfoksitte çözünebilmektedir (Alpsoy 2008; Güley 2008; Kotan 2010; Çeker 2011; Akkaya 2011; Canavar 2011; Sadıkoğlu 2011; Çolakoğlu 2012; Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013). Metanol, kloroform gibi organik çözücülerde çözünebilen aflatoksinler diğer birçok kimyasal çözücülerde de çözünebilmektedirler. Ancak aflatoksinlerin sudaki çözünürlükleri ise azdır (10–30 µg/mL). Toksinler, UV ışığını (özellikle 362 nm’de) kuvvetlice absorbe etmektedirler. Aflatoksin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> 425 nm de; aflatoksin G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> ise 450 nm de floresan absorbansı oluşturmaktadırlar.

Aflatoxin B<sub>1</sub>Aflatoxin B<sub>2</sub>Aflatoxin G<sub>1</sub>Aflatoxin G<sub>2</sub>



**Şekil 2.2.** Aflatoksinlerin kimyasal yapısı (Özkaya ve Temiz 2003).

Aflatoksin çeşitlerinin moleküler formülleri, moleküler ağırlıkları, erime sıcaklıkları, floresan ve UV absorbanları Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Aflatoksinlerin formül ve özelliklerini gösteren çizelge (Wyllie and Morehouse 1977)

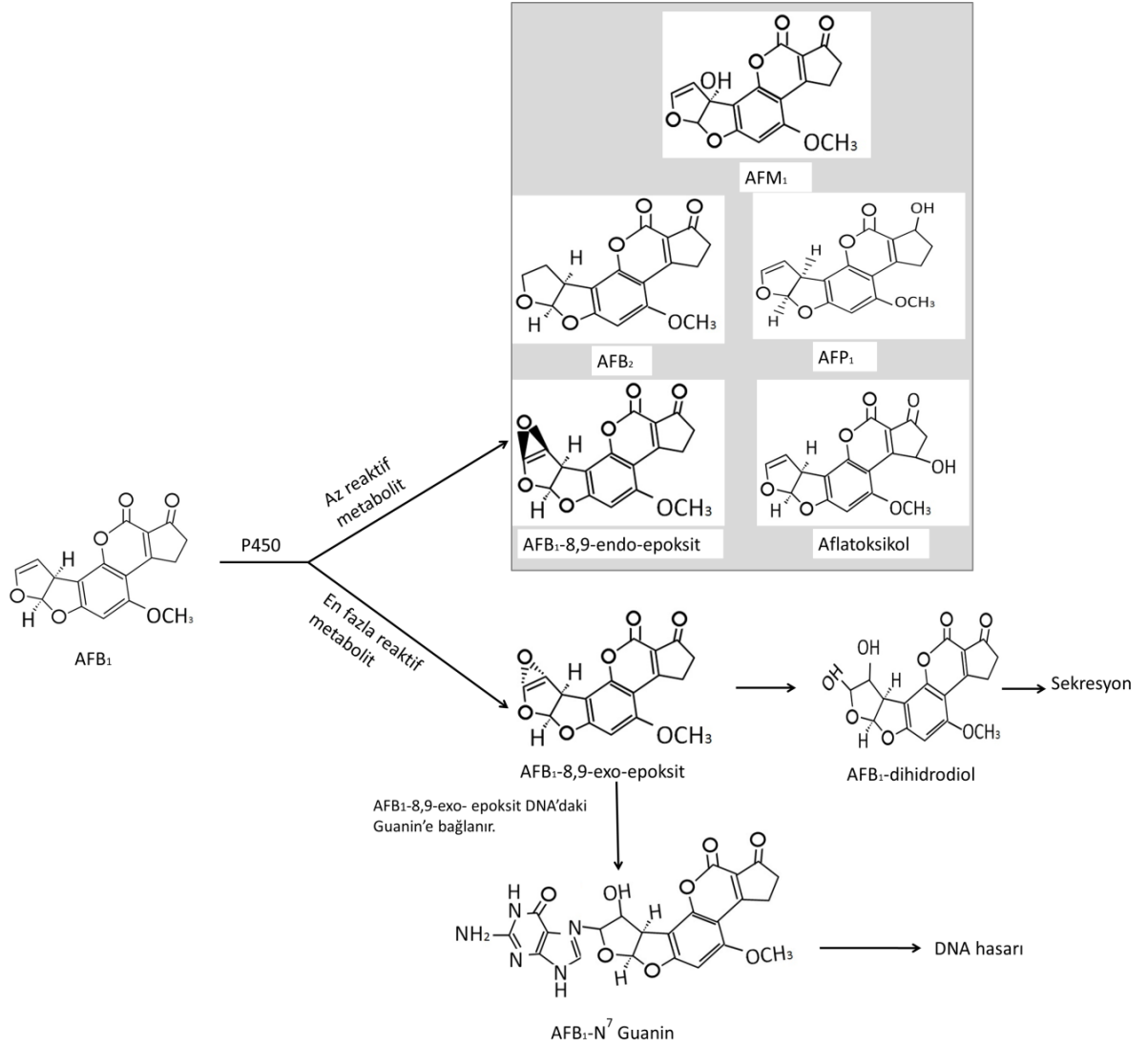
Aflatoksin	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı	Erime Noktası	Ultraviyole Emilimi	Floresans Emisyonu
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269	21.800	425
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	23.400	425
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	16.100	450
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240	21.000	450
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299	19.000(357 nm)	425
M <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293	–	–
B <sub>2A</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	240	20.400	–
G <sub>2A</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	346	190	18.000	–
R <sub>0</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	314	230-234	14.100	425
B <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	302	233-234	9.700	–
GM <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	344	276	12.000(358 nm)	–
P <sub>1</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	298	>320	14.900(342 nm)	–

Toksik etkiye sahip *A.flavus* kültürleri ve aflatoksin ile muamele edilerek kontamine edilen ürünlerdeki toksik etkileşim genel olarak AFB<sub>1</sub> ve daha az olarak da AFG<sub>1</sub>’den kaynaklanmaktadır. Bu hadise, her iki toksinin yapısındaki terminal furan halkasınının 8, 9 karbon pozisyonundaki bir doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Aflatoksin B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>’in, aflatoksin G<sub>2</sub> de G<sub>1</sub>’in dihidro türevleridir ve “*in vivo*” koşullarda metabolik olarak B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>’e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler (Özkaya ve Temiz 2003; Alpsoy 2008; Güley 2008; Kotan 2010; Çeker 2011; Akkaya

2011; Canavar 2011; Sadıkoğlu 2011; olakoğlu 2012; Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013).

#### **2.1.4. Aflatoksinlerin canlılar üzerine etkisi**

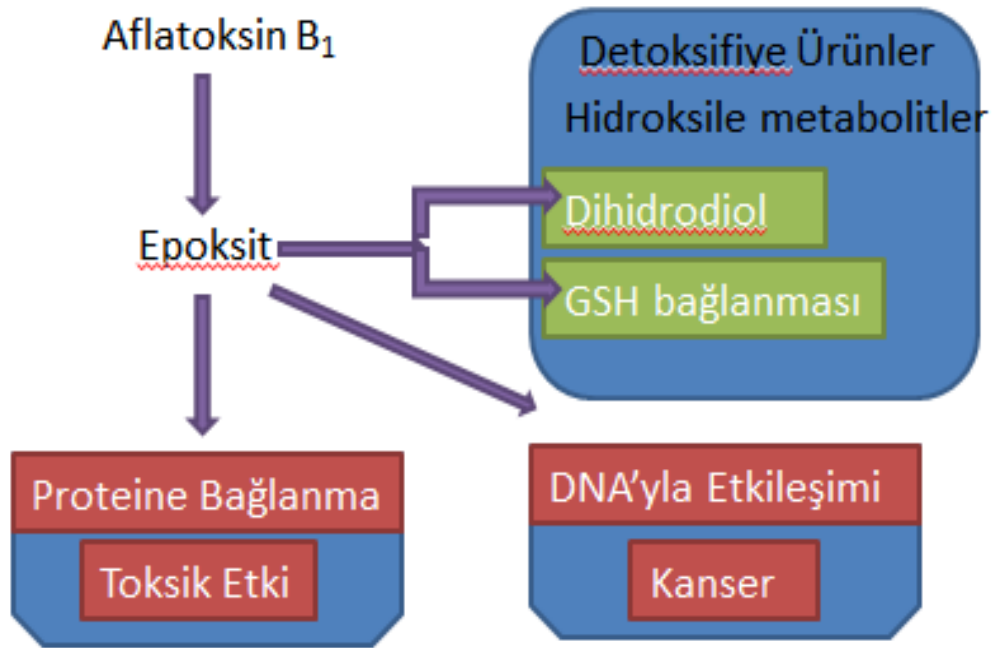
Aflatoksinler, yüksek dozlarda (0,5–10 mg/kg) akut, ölümcül dozun altındaki dozlarda ise kronik toksik etki göstermektedirler. Fakat düşük dozlarda da olsa aflatoksinlerin sürekli alınması karsinojen etki ile sonuçlanmaktadır. Aflatoksinlerin canlıları etkilemesi canlının yaşına, duyarlılık derecesine göre farklılıklar göstermektedir. Ayrıca toksik etkisi ise, aflatoksinin veya aflatoksinli gıdanın tüketilme miktarına, sıklığına, canlının cinsine, cinsiyetine, yaşına ve sağlık durumuna birde beslenmesine bağlı olarak değişmektedir (Özkaya ve Temiz 2003; Alpsoy 2008; Güley 2008; Kotan 2010; eker 2011; Akkaya 2011; Canavar 2011; Sadıkoğlu 2011; olakoğlu 2012; Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013).



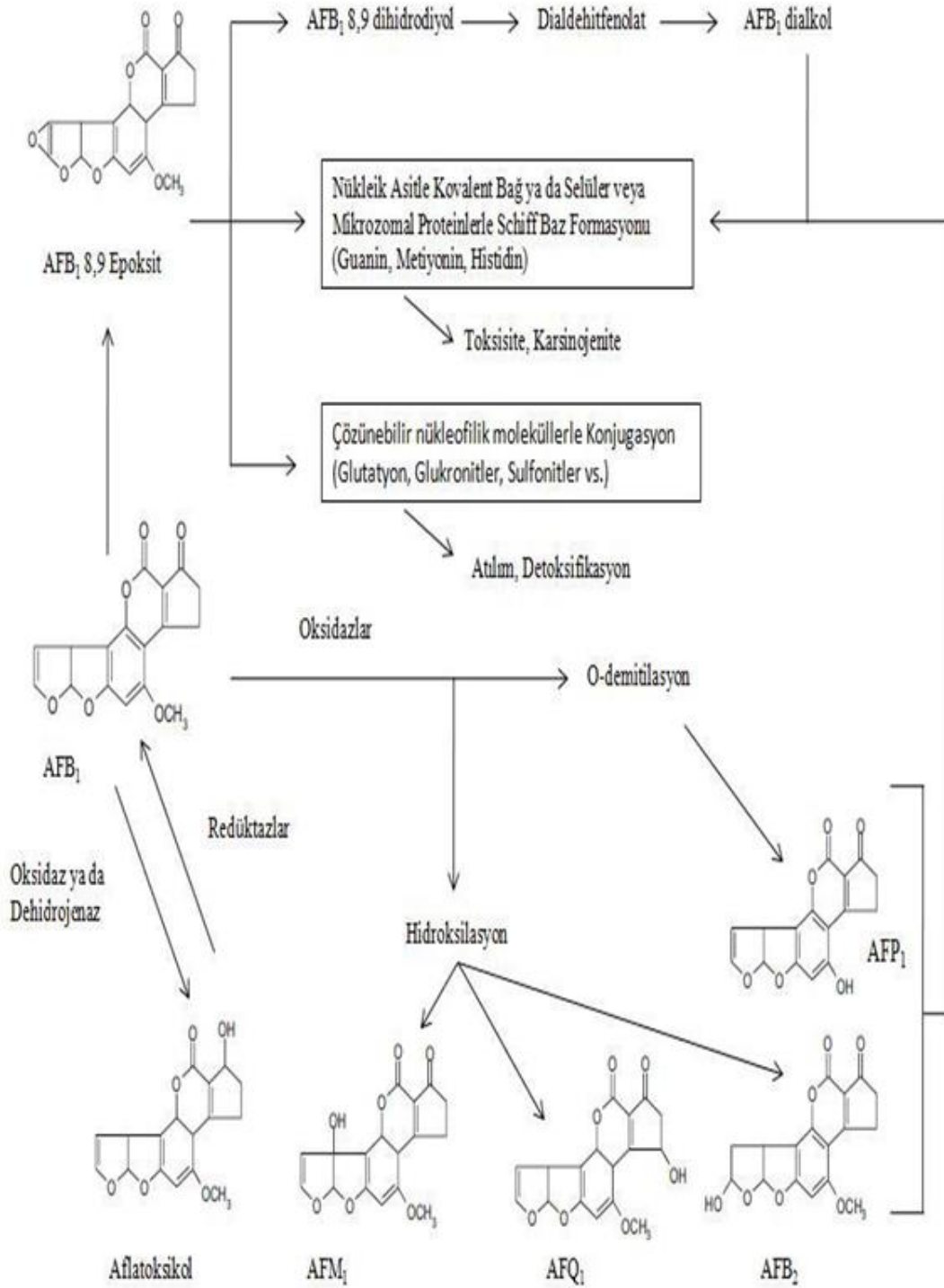
**Şekil 2.3.** Aflatoxin B<sub>1</sub>'in dönüştüğü metabolitler (Alpsoy and Yalvaç 2011).

Aflatoxinler içerisinde en kuvvetli toksik etkiyi AFB<sub>1</sub> göstermiştir. Bundan dolayı AFB<sub>1</sub>'in insan kromozomları üzerine toksik etkisi AFG<sub>1</sub>'e nazaran daha fazla olmuştur. Fakat AFB<sub>1</sub>'in kuvvetli toksikolojik etkisine rağmen insan kromozomlarından bazılarının AFB<sub>1</sub>'e karşı dirençli olduğu, bununla beraber bazı kromozomların ise daha dirençsiz olduğu tespit edilmiştir. Özellikle AFB<sub>1</sub>'in insan kromozomlarının 2, 11, 19 ve 20. kromozomları üzerine daha çok etkisinin olduğu, AFG<sub>1</sub>'in ise 1, 2, 3, 4 ve 5. Kromozomları üzerine daha çok etkili olduğu ortaya konulmuştur. Genel olarak bakıldığında da boyca uzun olan kromozomların aflatoxinlerden daha çok etkilendikleri tespit edilmiştir (El-Zawahri *et al.* 1977, 1990; Kotan 2010; Çeker 2011).

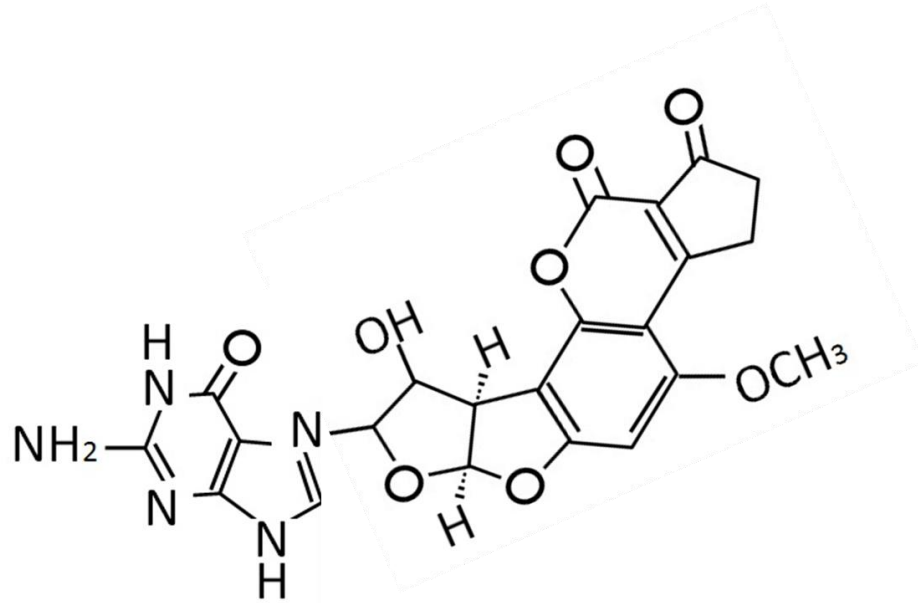
AFB<sub>1</sub>'in karsinojenik ve mutajenik etkisi vücutta metabolizmaya uğraması neticesinde ortaya çıkmaktadır. Hayvanlarda ilk olarak mikrozomal ve sitoplazmik oksijenaz enzim sistemlerince metabolize edilmektedir. Mikrozomal ve sitoplazmik oksijenaz enzim sistemleri, aslında karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda (E.R) bulunan, sitokromla ilişkili enzimlerle, O<sub>2</sub>'ye ve NADPH'a bağımlı enzimlerin kompleks bir organizasyonundan oluşmaktadır. Bu enzimler, çeşitli hidroksillenmiş türevlerin ve yüksek reaktif özelliğe sahip epoksid metabolitin oluşmasıyla sonuçlanan AFB<sub>1</sub>'in oksidatif metabolizmasını katalize etmektedir (Ueno 1985; Alpsoy 2008; Güley 2008; Kotan 2010; Çeker 2011; Akkaya 2011; Canavar 2011; Sadıkoğlu 2011; Çolakoğlu 2012; Polat 2013; Arslan 2013; Karapınar 2013;). Bu sistemler yardımıyla AFB<sub>1</sub>'in metabolizma yolları ve AFB<sub>1</sub>'in çeşitli metabolizma neticesinde çeşitli metabolitlere biyotransformasyonu Şekil 2.4-5'de görülmektedir.



**Şekil 2.4.** Aflatoxin B1'in metabolik yolları (Williams *et al.* 2004).



**Şekil 2.5.** AFB<sub>1</sub>'in farklı metabolitlere dönüştürülmesi ve etkileşimi (Özkaya ve Temiz 2003).

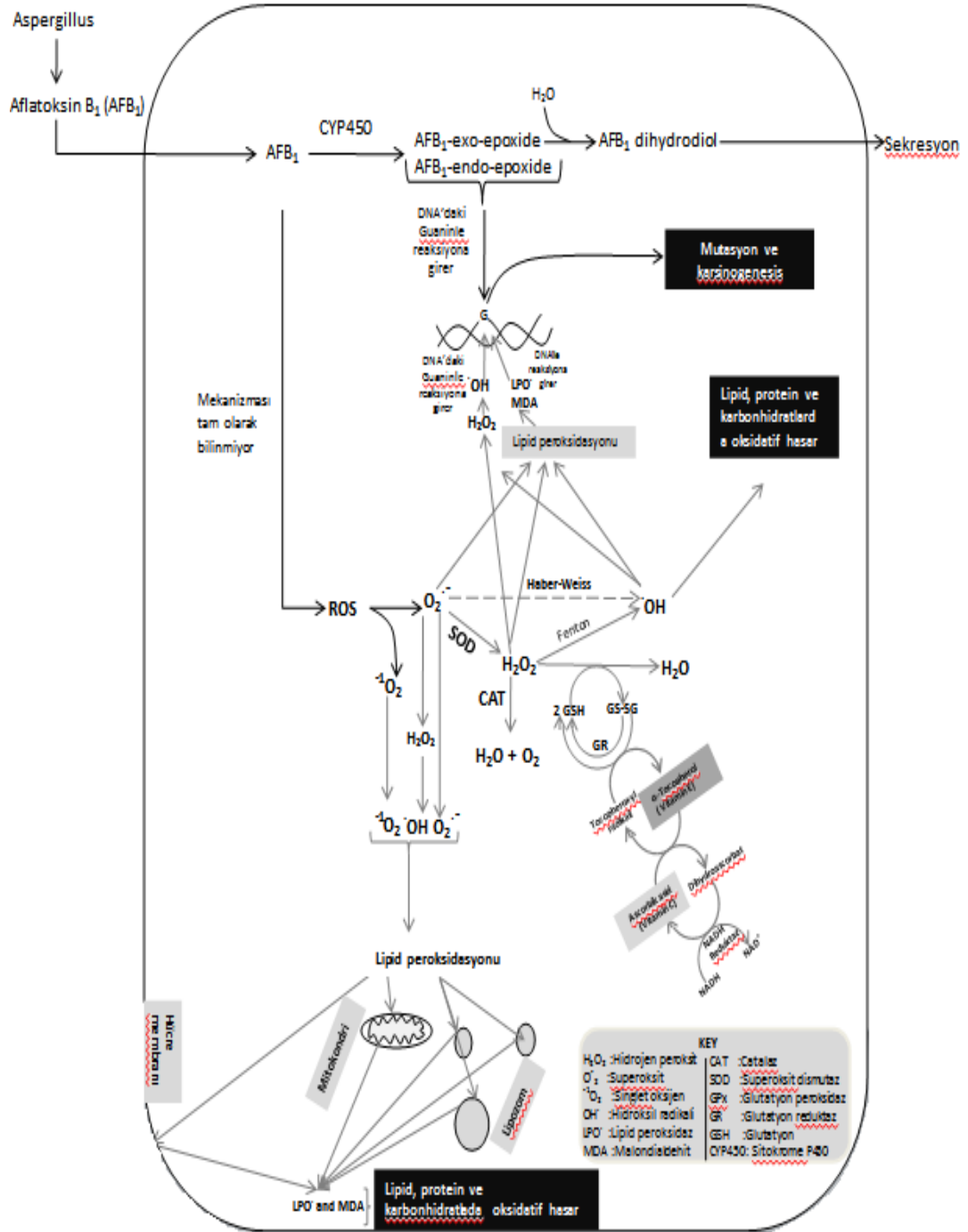


**Şekil 2.6.** AFB<sub>1</sub>-N7-Guanil kompleksi (Alpsoy and Yalvac 2011).

Bu biyotransformasyon olaylarındaki en önemli olan süreç AFB<sub>1</sub>'in epoksidasyon sürecidir. Burada, bifuran halkasında bulunan çift bağın epoksidasyonu neticesinde çok reaktif bir form ortaya çıkmaktadır. Bu elektrofilik epoksid DNA, RNA ve protein gibi hücresel makromoleküllerdeki çeşitli nükleofilik merkezlere kovalent olarak bağlanabilmektedir (Ueno 1985; Rawal 2011; Wu 2013; Eom *et al.* 2013). Bu bağlanmanın neticesinde de DNA sentezi, DNA'ya bağlı olarak gelişen RNA polimeraz aktivitesi, mRNA ve protein sentezi inhibe edilmektedir (McLean and Dutton 1995). Epoksi formunun bu olay neticesinde aktifleşmesiyle DNA ile birleşerek AFB<sub>1</sub>-N7-Gua kompleksini oluşturduğu bilinmektedir. Şekil 2.6'da AFB<sub>1</sub>-N7-Gua kompleksinin yapısı görülmektedir. Bu kompleks organizma veya hücreler için biyolojik bir tehlike oluşturmakta, karsinogenik ve genotoksik etkilerin sorumlusu olarak değerlendirilmektedir. AFB<sub>1</sub> alımı ile karaciğer kanseri arasındaki pozitif ilişki, Kenya'nın bir bölgesinde yaşayan hastalardan toplanan idrarlarda AFB<sub>1</sub>-N7-Gua kompleksinin bulunmasıyla belirlenmiştir (Ueno 1985; Rawal 2011; Wu 2013; Eom *et al.* 2013).



Sitokrom P450 enzimiyle insanlarda son derece reaktif bir form olan aflatoksin-exo-8,9-epoksite dntrlen AFB<sub>1</sub> DNA'ya ve serumda bulunan albminine baēlanabilir. Aflatoksinin endo epoksit formunun mutajenitesi exo formuna nazaran yaklaık olarak 1000 kat kadar daha azdır. AFB<sub>1</sub>-exo-8,9-epoxid formları DNA'nın yapısında guanin nkleotidine baēlanarak transversiyon tipi mutasyonlara neden olurlar. AFB<sub>1</sub>-N7-Guanin formu da 3 farklı reaksiyona uērar. Ya AFB<sub>1</sub>-8,9-dihydrodiol formuna dnr veya deprinasyona uērar ya da imidazol halkasının aēılması ile AFB<sub>1</sub>-formamidopyrimidine (AFB<sub>1</sub>-FAPY) minor ve major formlarına dnr (Bedard and Massey 2006; Rawal 2010).



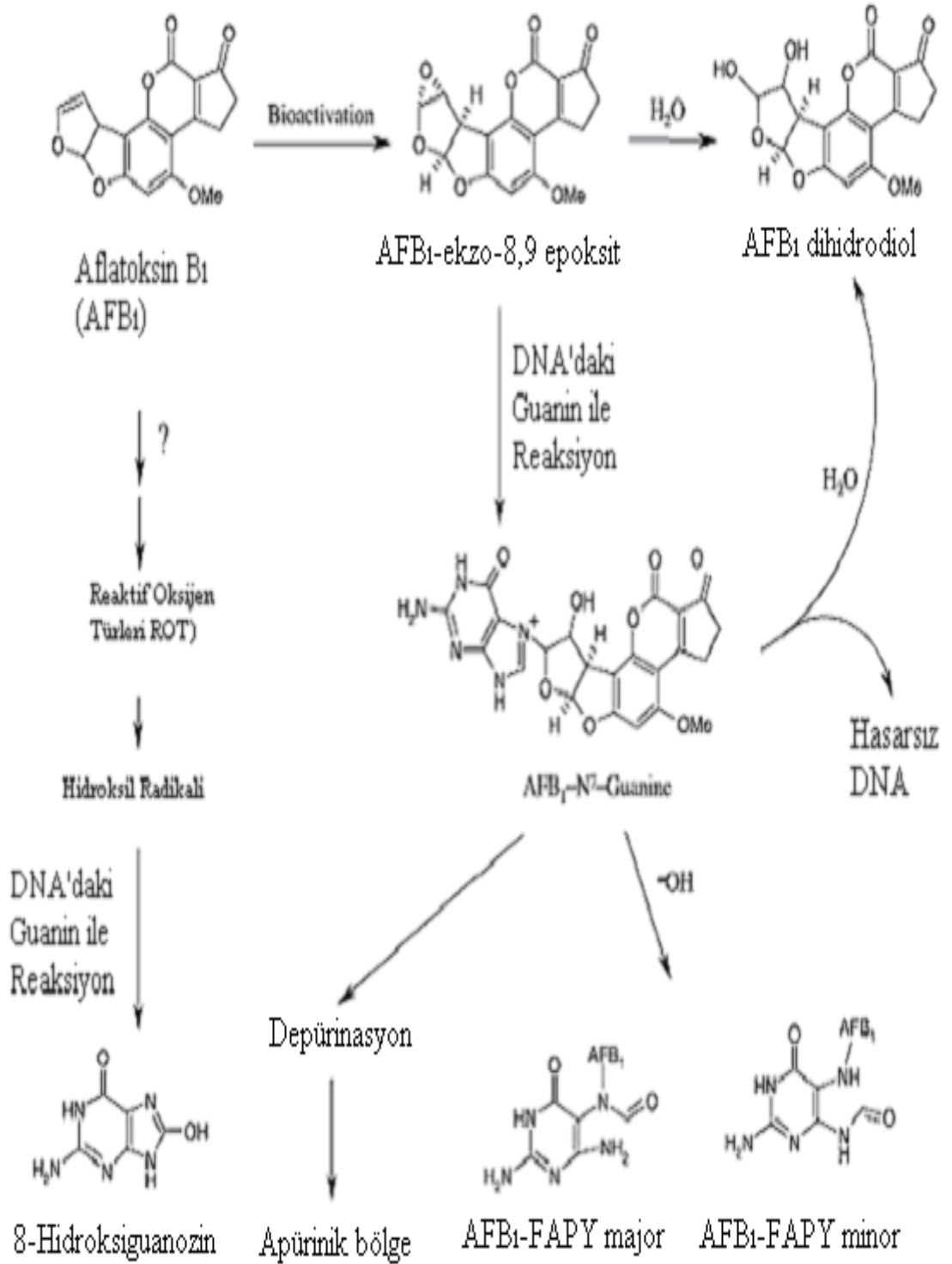
**Şekil 2.7.** AFB<sub>1</sub>'in metabolik yolları ve ürünleri (Alpsoy and Yalvaç 2011'den modifiye edilmiştir.)

AFB<sub>1</sub>'in karaciğer kanserine neden olmasının en önemli nedeni, DNA'daki N7-Guanine bağlanarak G-T transversiyona neden olmasıdır (Şekil 2.6). Özellikle bu mutasyonlar tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin 249. kodonunda meydana geldiğinde karaciğer

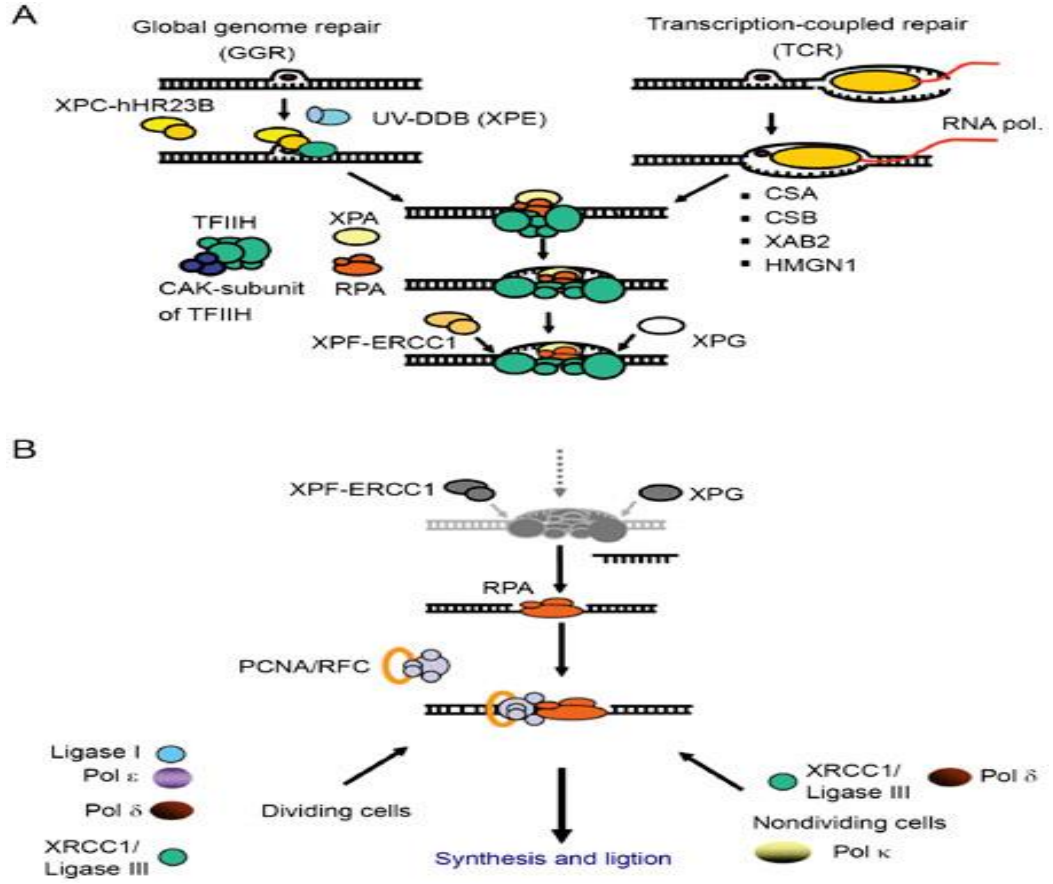
kanserine sebep olur. İnsanlardaki kanser sayısı ve çeşitleri ile p53 geni arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Tahmini olarak aflatoksinli besinlerin daha çok tüketildiği Çin'de karaciğer kanseri olan hastaların yaklaşık %50'sinde p53 geninin 249. kodonunda G-T transversiyon olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık tahmini olarak aflatoksinli besinlerin daha az tüketildiği Avrupa ve Japonya'da p53 geninin 249. kodonunda mutasyon tespit edilmemiştir (Hsu *et al.* 1991; Smela *et al.* 2001). Yapılan başka bir araştırmada da Çin'in Quidong bölgesinde karaciğer kanseri hastalardan aflatoksine yüksek oranda maruz kalan 20 hastanın 9'unda 249. kodonda mutasyonu görülürken, Shanghai bölgesindeki 18 hastanın 3'ünde (%17) 3'te 1 hastada da (%33) 249. kodon mutasyonu tespit edilmiştir (Li *et al.* 1993).

Tümör supressör geni olan p53 geni hücre siklusunun kontrol noktalarından DNA hasarı kontrol noktasında (G1/S) DNA'yı kontrol eder. Eğer DNA'daki hasar onarılabilecek düzeyde ise DNA tamir edilinceye kadar hücre döngüsünü durdurur, DNA tamir edilemeyecek düzeyde hasarlı ise apoptosise yönlendirir (Jin and Levine 2001).

AFB<sub>1</sub>'in canlıda neden olduğu DNA hasarları tamir edilebilir. Bunun için memelilerde hasar tamir mekanizması (nucleotide excision repair=NER) bulunmaktadır. AFB<sub>1</sub> DNA'ya bağlanarak hasara neden olduğunda hasarlı olan nükleotid DNA'dan çıkarılarak tamiri gerçekleştirilebilir. NER mekanizması iki şekilde gerçekleştirilir. İlki transkripsiyona bağlı olmadan DNA'da nükleotidlerdeki hasar tespit edilerek genel genom tamiri (global genome repair=GGR) mekanizması ile tamir edilebilir. İkincisi DNA'nın transkripsiyonu sırasında hasarlı bölge bir dizi reaksiyon ve çift transkripsiyon tamiri (transcription coupled repair=TCR) sonunda çıkarılır. Daha sonrada transkripsiyon tekrar başlatılır (Şekil 2.8) (Bedard and Massey 2006).



**Şekil 2.8.** AFB<sub>1</sub> in biyoaktivasyonu ve DNA ile etkileşimleri (Bedard and Massey 2006).



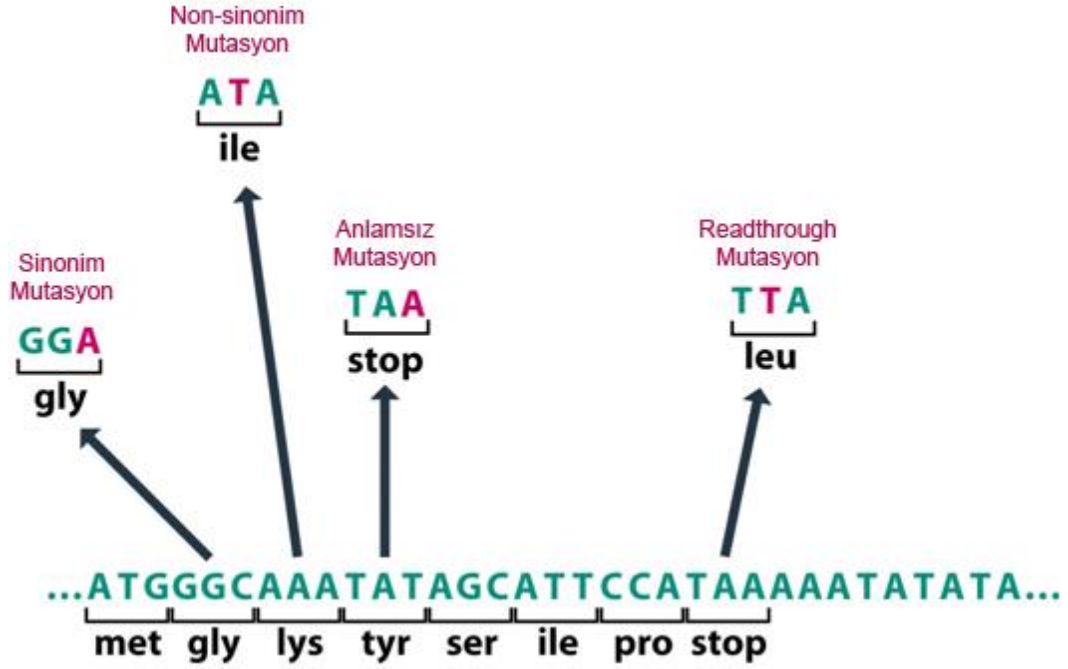
**Şekil 2.9.** Memeli hücrelerinde meydana gelen hasarların onarım mekanizması (Fousteri and Mullenders 2008).

## 2.2. Gen Mutasyonlarının Etkileri

### 2.2.1. Gen mutasyonlarının genom üzerine etkileri

DNA üzerindeki genlerin kodlanan bölümlerinde oluşan herhangi bir değişiklik veya mutasyonlar genomun fonksiyonlarında ciddi değişikliklere sebebiyet vermektedirler. Canlıda kodlanmakta olan gende meydana gelen baz değişimi nokta mutasyonları, genelde sessiz veya sinonimdir. Bununla beraber meydana geldiği genomun fonksiyonunu değiştirmeyen mutasyonlara neden olmaktadır (Şekil 2.10). Bu tür mutasyonda bir amino asidin sentezinden sorumlu kodon yine aynı amino asidi sentezletecek diğer bir kodona dönüşmektedir (Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009). Ayrıca bu tür mutasyonların diğer bir etkisi ise, anlamsız mutasyon (nonsense)

olarak tanımlanmaktadır. Böyle anlamsız mutasyonlarda amino asidin sentezinden sorumlu kodonda oluşan bir baz değişimi nokta mutasyonu, bu kodonun sonlanma (stop) kodonuna dönüşmesine neden olmaktadır (Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009).



**Şekil 2.10.** Baz değişimi nokta mutasyonlarının genom üzerine olan etkileri (Karadayı 2010).

### 2.2.2. Gen mutasyonlarının mikroorganizmalar üzerine olan etkileri

Mutasyonlar her canlıda olduğu gibi mikroorganizmalarda da meydana gelmekte ve üzerlerinde etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler canlının ya yeni bir özellik kazanması ya da var olan bir özelliğinin değişmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır (Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010). Mikroorganizmaların belirli gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar, mutasyona uğrayan genin ürettiği ürün bakımından dışarıya bağımlı hale dönüştürebilmektedir. Oksotrofluk denilen bu durumda, mutant mikroorganizma, bu ürününü büyüme ortamından hazır olarak almadığı takdirde yaşamını sürdüremez. Mikroorganizmalardaki oksotrofluk durumu için bu çalışmada

kullandığımız triptofan oksotrofu olan *Escherichia coli* WP2uvrA ile, histidin oksotrofları olan *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşları örnek olarak verilebilir.

### 2.3. Yaygın Olarak Kullanılan Mutajenite Yöntemleri

#### 2.3.1. Ames/Salmonella ve E. Coli WP2 test sistemleri

Dr. Bruce Ames ve Dr. Maron tarafından 1970'li yılların başında geliştirilen Ames /Salmonella test sistemine bulan kişinin ismine atfen kısaca Ames Testi denmektedir. Bu testin son yıllarda fazlaca kullanılmasının en önemli nedeni test sisteminin; DNA'ya zarar vermekte olan ajanların teşhis edilmesi ve yüksek hassasiyete sahip olduğundan mutajenik ve biyokimyasal mekanizmalarının açıklanma yeteneği ile ilişkilendirilmektedir. Bununla beraber uygulamadaki kolaylık, çabuk ve güvenilir sonuçlar vermesi, detayları en iyi bilinen ve karakterize edilmiş olması gibi diğer faktörlerde bu testin kullanılmasını yaygınlaştırmıştır (Maron and Ames 1983; Josephy *et al.* 1997; Mortelmans and Ziger 2000; Korkmaz 2005).

Bu test sistemi birçok ülkede ve Türkiye'de kullanılmaktadır. Bu test, *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonla histidin aminoasidini sentez edemeyen *Salmonella typhimurium* (his-) mutantlarının elde edilmesiyle yapılmaktadır. Bu test sisteminin temelinde; mutajen özelliğe sahip maddeler *Salmonella typhimurium* (his-) mutantlarının DNA'sını etkileyerek his operonunda geri mutasyonlara neden olmak suretiyle bu suşları (his+) mutant suşlar haline getirmesine dayanmaktadır. Bundan dolayı bu test sistemi aracılığıyla mutajen maddelerin mutant suşların DNA ile etkileşmesini önleyecek maddeleri çalışmak suretiyle antimutajen veya antikarsinojen maddelerin tayinini de yapmak mümkün olmaktadır (Rosin and Stich 1978, 1979; Shamberger *et al.* 1979; Alekperov *et al.* 1986; Victorin *et al.* 1987).

Geri mutasyon test sistemleri uygulamalarından bir diğeri de *Salmonella typhimurium* test sistemi ile aynı temele dayanan *Escherichia coli* 'nin bazı suşlarıdır. Bu bakteri

kültüründe de Ames'te olduğu gibi bir mutasyon bulunmaktadır. Bu mutasyondan dolayı *E. coli* bakterisi triptofan aminoasidini sentezleyememektedir. Bu mutasyon triptofan operonunun E lokusunda oluşturulmaktadır. Bu şekilde geliştirilen *E.coli* WP2 uvr A (pKM 101) ve E.Coli WP2 (pKM101) suşları A-T baz çifti mutasyonu taşımaktadır (Gatehouse 1990; Korkmaz 2005).

### 2.3.2. Mikronükleus (MN)

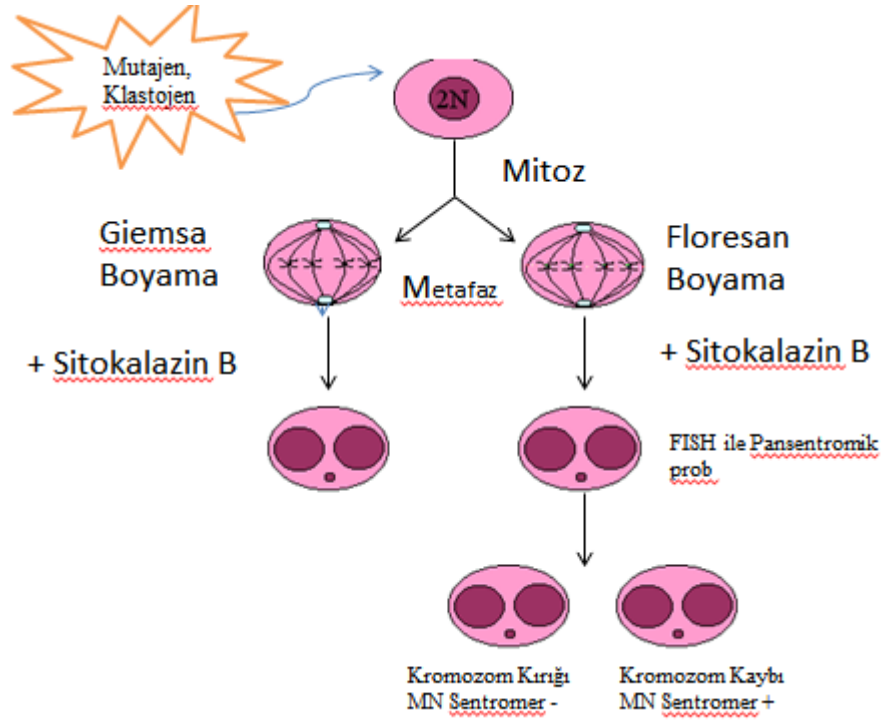
Howell ve arkadaşları tarafından ilk olarak eritrositlerde saptanan Mikronükleus (MN) oluşumu daha sonra Jolly tarafından tanımlanmıştır. Bundan dolayı MN' ye Howell-Jolly cisimciği adı da verilmektedir. Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmentinin ya da kromozomların ortamda varlığını sürdürmesidir. Bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer alan nükleer materyaldir (Vanparys *et al* 1990; Zijno *et al* 1994).

Mitoz bölünmenin anafaz evresinde geri kalan kromozomlardan dolayı ortaya çıkan, asıl çekirdeğe dahil edilmeyen tam veya asentrik kromozom fragmanlarından ortaya çıkan yapılardır. İnsan hücrelerinde özellikle eritrositlerde, DNA hasarlarının kromozom seviyesinde güvenilir olarak değerlendirilmesini sağlayan MN yöntemi genetik toksikoloji alanında çok yaygın ve yoğun olarak kullanılmaktadır (Fenech 1993; Lando *et al.* 1998). MN oluşumundaki artış çeşitli kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

13 Eylül 1987'de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın ardından genetik materyalde hasarların belirlenmesi için MN çalışmaları yapılmıştır. İyonize ışınların alınma dozlarına bağlı olarak MN frekansında çok önemli derecede artışlar gözlenmiştir. Bundan dolayı MN'nin biyolojik ölçüm aracı olarak kullanılması tavsiye edilmiştir. Goiânia kazası neticesinde iyonize ışınlarla maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler alkol tüketimi, sigara kullanımı gibi hayat tarzı ve yaş faktörleri



de göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir (Cruz *et al.* 1994; Jagetia and Jacob 1994; Jagetia *et al.* 2001; Yoshida *et al.* 2001).



**Şekil 2.11** MN oluşumu ve boyaması (Anonymous 2013c).

1950'li yıllardan beri kullanılmakta olan MN yöntemi, Fenech ve Morley (Fenech and Morley 1985, 1986) isimli araştırmacılar tarafından geliştirilerek bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve bu tekniğin (Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu) uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamışlardır. Bu yöntemde, küflerden elde edilen bir metabolit olan Cytochalasin-B (Cyt-B) aracılığıyla mitoz bölünme geçirmekte olan hücrelerde sitoplazma bölünmesini (sitokinezi) durdurma esasına dayanmaktadır. Plazma içerisinde bulunan, aktin polimerizasyonu ve dolayısıyla da mikrofilamentlerin bir araya geliş sürecini indükleyen moleküler ağırlığı yüksek olan kompleksler mevcuttur. Mikrofilamentlerin bir araya gelmesi plazmadaki ayrılmanın başlangıcı için gereklidir. Cyt-B mikrofilament aktivitesini inhibe ederek sitokinezisi durdurur. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda (1-6 µg/ml) Cyt-B maddesinin ilave edilmesiyle, karyokinezi tamamlamış, ancak sitokinezi gerçekleştirilmemiş çift

çekirdekli (binükleotid) hücreler oluşturulmakta ve MN bulunduran hücrelerin oranı tespit edilebilmektedir (Fenech 2000; Kutbay 2001; Demirel ve Zamani 2002). İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın (Heddle and Countryman 1976) kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman'ın kriterlerine göre:

1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. MN'lerin asıl çekirdeğe bağlı veya bitişik olmaması,
4. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır.

MN testi sigara, pestisid ve parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için kolaylıkla kullanılmaktadır.

Yenidoğan bebeklerde ve 18-25 yaş grubu bireylerde yapılan iki ayrı çalışmada (Çora vd 1992; Acar vd 1995). MN frekansının erkek ve dişi cinsiyete bağlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Ancak yaşlılarda yapılan bir diğer çalışmada (Richard *et al.*1994) kadınlarda MN sıklığının yaşlanma ile artış gösterdiği anlaşılmış; ayrıca FISH tekniği ile MN oluşturan kromozomların kimliği belirlenerek; yaşlı kadınlarda X kromozomlarının otozomal kromozomlardan daha sık olarak MN oluşumuna katıldığı gösterilmiştir. X kromozom kaybı, aynı zamanda monozomik hücrelerde karyotip analizleriyle de doğrulanmıştır. Bu çalışma, MN oluşumu ile karyotip analizlerinde saptanabilen kromozom düzensizlikleri arasındaki paralelliği açıkça ortaya koymaktadır.

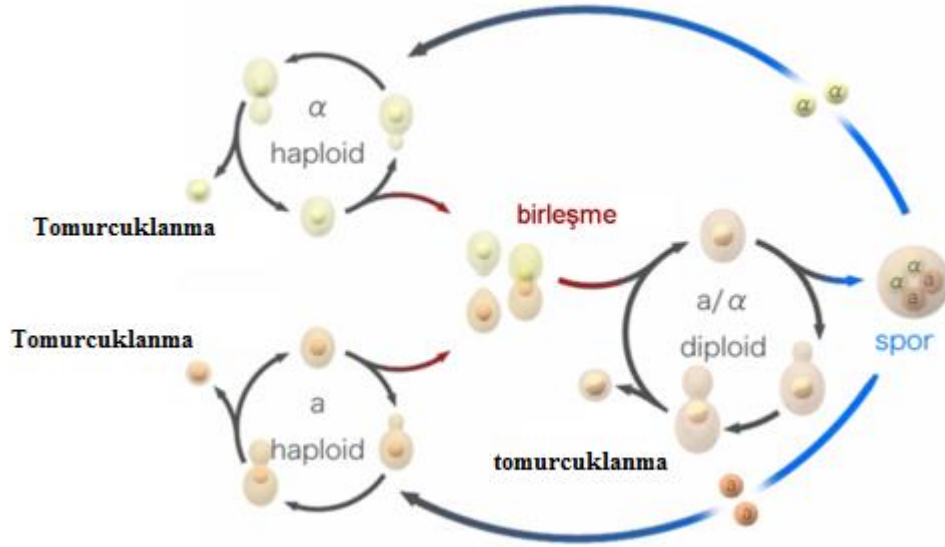
Sonuç olarak; sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama

çalışmalarında güvenle kullanılabilir bir test olarak kabul edilmiştir (Demirel ve Zamani 2002).

### **2.3.3. Maya delesyon test sistemi**

Bunların dışında mikrobiyal olarak kullanılan bir diğer mutajenite antimutajenite test sistemi de “Maya Delesyon” test sistemidir. Bu sistem Ames’e göre biraz daha karmaşık olmakla birlikte sıkça kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Maya ve küf olmak üzere iki temel formu bulunan funguslar, çok değişik besi yerlerinde yaşayabilmektedirler. Maya ve benzeri funguslar genelde katı besi yerlerinde düz, nemli, sarı, pembe, yapışkan gibi çok çeşitli ve değişik koloniler oluşturmaktadırlar (Karadayı 2010).

Maya hücrelerinde genel olarak iki üreme şekli gözlenir. Bunlardan haploid üremede, mitoz bölünmeler ve bunun peşi sıra basit yaşam döngüsü gözlemlenmektedir. Haploid çoğalan maya hücreleri yüksek stres oluşturan durumlarda genelde yaşamlarını devam ettirememektedirler. Diploid üremede ise, önce haploitte üremede olduğu gibi peşi sıra mitoz bölünmeler meydana gelmektedir. Fakat stres durumunda maya hücreleri spor üreterek mayoz bölünmeye gittiğinden dolayı farklı sporlar meydana getirmektedirler. Daha sonra bu sporlar birleşerek yeni bir diploid canlı oluşturmaktadır (Karadayı 2010).



**Şekil 2.12.** *S. cerevisiae*'nin yaşam döngüsü (Anonymous 2013b).

Moleküler biyoloji, hücre biyolojisi ve mikrobiyal çalışma alanlarında en çok kullanılan prokaryotik canlı olan ve model organizma olarak ele alınan *Escherichia coli*'ye benzer şekilde, ökaryotik canlılar arasında modelleme olarak en çok çalışılmış model organizma ise *S. cerevisiae*'dir (Anonymous 2013b).

Günümüzde hızla gelişmekte olan moleküler ve hücre biyolojisi gibi çalışmalarda *Saccharomyces cerevisiae*'nin genomunun insana uyarlanabileceği anlaşılmıştır. *S. cerevisiae* suşları haploid ve diploid formları birçok mikroorganizmaya nazaran çok çeşitli markırlar içermektedirler. Bundan dolayı çekinik mutasyonların haploid suşlar üzerinde, bütünlük testlerinin ise diploid suşlar üzerinde yapılabilineceği araştırmacılarca gösterilmiştir. Günümüz imkanlarının ve DNA transformasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle beraber mayalar, gen klonlama ve genetik mühendislik teknikleri için sıkça kullanılır canlılardan olmuşlardır (Sherman 2002). Mayaların kullanım alanlarına bakıldığında örnek olarak; insan genomuna ait interferon, hepatit B virüs antijeni, biyosensör olarak toksik kimyasalların tespiti, tümör nekroz faktörü, Hiv-1 aşılarının üretimi gibi son derece önemli ve değerli çalışmalar verilebilmektedir (Hitzeman *et al.*

1981; Miyano-hara *et al.* 1986; Caumont *et al.* 1996; Hollis *et al.* 2000; Jeong and Jue 2000).

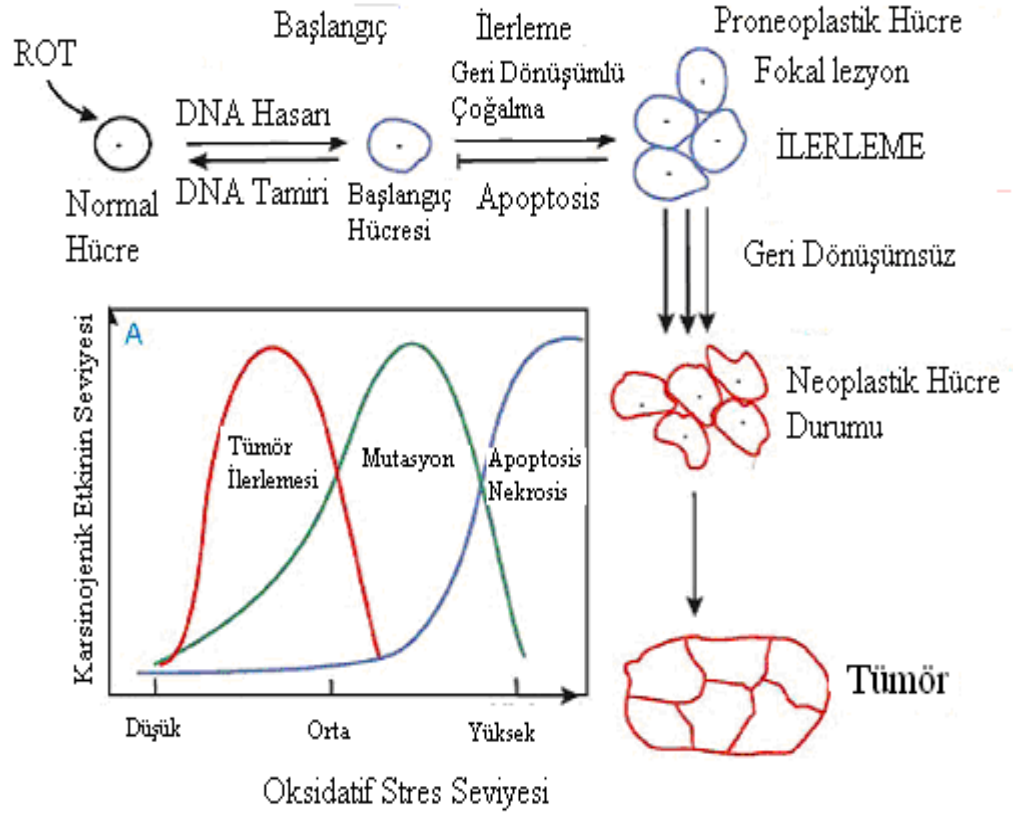
Netice itibariyle, kısa süreli mikrobiyal test sistemlerinden birisi olan maya delesyon test sistemi; hem ucuz hem de kromozomal hasar tespiti başta olmak üzere karsinojen kimyasalların tespitinde kullanılabilinen ve araştırmacılar tarafından geliştirilmiş hızlı testlerden biri olarak sıkça kullanılmaktadır (Aubrecht *et al.* 1999).

#### **2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres**

Son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron çifti içeren atom veya moleküle “Serbest radikaller” denir (Woods *et al.* 2002). Paylaşılmamış elektronlara sahip bu atom veya moleküller kararsız olduğundan bu radikaller hızlı bir şekilde diğer moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar. Bu reaksiyonlar neticesinde oluşan en etkili serbest radikaller “Serbest Oksijen Radikalleri”dir (ROT) (Basu 1999; Woods *et al.* 2002).

Canlılardaki en aktif ROT üreticileri fagositoz hücreleridir. Çeşitli metabolik yollarla uyarıldıklarında, bu fagositik hücreler oksijeni indirgemek suretiyle hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve superoksit (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) gibi ROT’ları oluşturmaktadırlar. Bunların dışında bulunan diğer ROT kaynakları; oksijenin kullanıldığı mitokondriyal elektron taşıma zinciri, doymamış yağ asitlerinin ve katesolaminlerin oksidasyonu ile NADPH bağımlı oksidazlardır (Basu 1999; Thannickal and Fanburg 2000).

ROT üretimi hem endojenik hem de ekzojenik kaynaklı olabilmektedir. Ekzojenik kaynaklar; alkol, birçok hava kirleticileri, ilaçlar, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen), iyonize ve iyonize olmayan radyasyonlar, patojenik bakteri ve virüslerdir (Halliwell and Gutteridge 2001). Endojenik kaynaklar ise nükleer, mitokondriyal ve endoplazmik elektron taşıma sistemleri (Sitokrom P450), peroksizomlar, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar esnasında da canlı hücrelerinde bol miktarda oluşan serbest radikallerdir (Akkuş 1996).



**Şekil 2.13.** Oksidatif stres seviyesinin hücrelerde meydana getirdiği etkiler (Kotan 2010).

Şekil 2.13 incelendiğinde dikkat edilmesi gereken husus, oksidatif stresin düşük seviyede olması tümör oluşumunu teşvik ederken, orta seviyede olması mutasyonlara neden olmakta, yüksek seviyedeki oksidatif stres ise hücre ölümlerine neden olmaktadır (Valko *et al.* 2006).

**Çizelge 2.3.** Papas (1999)'a göre ROT nin oluşumu (Turna 2008).

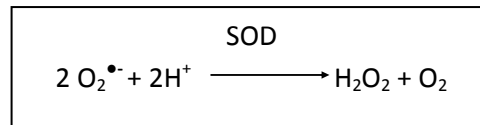
<b>Aktif oksijen türleri</b>	<b>Oluşum</b>
Süperoksit( $O_2^{\bullet-}$ )	Oksijenin, enzimatik veya nonenzimatik yolla bir elektron redüksiyonu
Hidroksil radikali ( $HO^{\bullet}$ )	Suyun radyolizi, $H_2O_2$ 'in metal-katalizli parçalanması, NO ve $O_2^-$ etkileşmesi
Alkoksil ve peroksil radikalleri ( $LO^{\bullet}$ ), ( $LO_2^{\bullet-}$ )	Hidroperoksitleri metal-katalizli parçalanması
Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )	Süperoksitin dismutasyonu, şekerlerin oksidasyonu
Demir-oksijen kompleksi	Hemoglobin, Miyoglobin, vb.
Singlet oksijen ( $^1O_2$ )	Fotosensitizasyon ile oksidasyon, peroksil radikalleri arasındaki biyomoleküler etkileşimler, hipoklorit ve hidrojen peroksit reaksiyonu
Lipit ve protein hidroperoksitler	Lipit ve proteinlerin oksidasyonu
Nitrojen dioksit ( $NO_2^-$ )	Peroksil radikali ve NO reaksiyonu, hava kirliliği ve sigara
Nitrik oksit ( $NO^-$ )	Nitrik oksit sentaz, nitrozo tiyol ve hava kirliliği
Tiyil radikalleri ( $RS^-$ )	Tiyollerden hidrojen atomu transferi
Protein radikalleri	Proteinlerden hidrojen atomu transferi

ROT'lerinin başlıcaları şunlardır: Süperoksit radikalleri, singlet oksijenler, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitler, peroksil ve alkoksil radikalleridir.

### 2.4.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ )

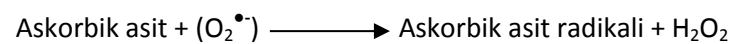
Nordberg and Arner (2001)'e göre süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) moleküler oksijenin indirgeyici ajandan bir elektron alması sonucu oluşur. Normal olarak süperoksit radikali çok reaktif bir serbest radikal değildir. Süperoksit nötral çözeltilerde negatif yüklüdür, lipit membranlara tutunma olma özelliği bulunmamaktadır. Biyolojik membranları sadece anyon kanalları vasıtasıyla aşabilmektedir ve bu nedenle üretildiği kısımda kalmaktadırlar (Turna 2008).

Süperoksit radikali oluştuğu yerden fazla uzaklaşamaz. Süperoksitler, bir serbest radikal olmakla birlikte doğrudan ciddi hasarlara neden olmayıp,  $H_2O_2$  kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasından dolayı ciddi hasarların oluşumuna kaynaklık etmektedir. Süperoksit radikali sulu çözeltilerde  $H_2O_2$  oluşturmaktadır. Süperoksitlerden biri elektronlarını diğerine verir, böylece birinci süperoksit  $O_2$ 'ye okside olurken ikinci süperoksit  $H_2O_2$ 'e redükte olur. Bu reaksiyon dismutasyon olayı olarak adlandırılır (Gutteridge and Halliwell 1994).



Süperoksitler genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde ortamın pH' ına bağlı olarak protonlanmak suretiyle katyon haline dönüşebilirler. Bundan dolayı peroksit radikali ( $HO_2$ ) ismini alırlar (Cherubini *et al.* 2005).

Süperoksit radikalının kimyasal davranışı nerede çözüldüğüne göre değişmektedir. Su içerisinde süperoksit çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak okside edici ajan olarak davranabilmektedir. Buna örnek olarak askorbik asidin oksitlenmesi verilebilir (Gutteridge and Halliwell 1994).





Süperoksit düzeyleri SOD enzimleri aracılığıyla  $H_2O_2$  ve oksijene dönüştürülerek azaltılmaktadır. Bu sayede hücrel süperoksit düzeyi sıkı kontrol altına alınmış bulunmaktadır (Cherubini *et al.* 2005).

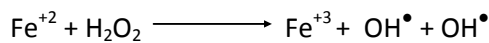
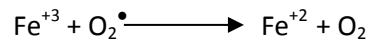
#### 2.4.2. Singlet oksijen ( $^1O_2$ )

Moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formuna “Singlet oksijen” denilmektedir. Oksijenin enerjistik olarak uyarılan bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijenin molekül yapısında iki adet eşlenmemiş elektron bulunmaktadır. Bundan dolayı taşımış olduğu yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi halinde vererek yeniden oksijene dönüşebilmekte ya da kovalent bağ tepkimelerine girmektedirler (Stahl and Sies 2002).

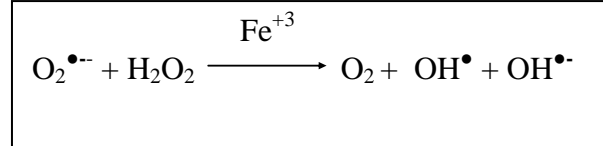
#### 2.4.3. Hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ )

Biyolojik sistemler içerisinde yer alan en reaktif tür olan hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ), suda dahil, ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girmektedir. Bütün bu tepkimeler aslında  $OH^\bullet$ 'ın yapısında bulunan eşlenmemiş elektron içeren dış orbitaline elektron alma isteğinden kaynaklanmaktadır (Halliwell and Gutteridge 1984). Hidroksil radikali organik asitler, nükleik asitler, aminoasitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğuyla reaksiyona girebilmektedir. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısa olup göç edecek kadar uzun bir ömrü bulunmamaktadır (Gutteridge and Halliwell 1994; Cherubini *et al.* 2005).

Biyolojik sistemlerde hidroksil radikali birçok reaksiyon ile oluşabilmektedir.  $Fe^{+3}$ 'ün süperoksitle indirgenip  $Fe^{+2}$  olması ve  $Fe^{+2}$  'nin  $H_2O_2$  ile reaksiyona girerek  $OH^\bullet$  oluşturması fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir (Gutteridge and Halliwell 1994).



Canlı vücudunda doğal olarak bulunan enzimler ve glutatyon yetersiz seviyede iseler süperoksit ve hidrojen peroksit ortamda serbestleşmiş halde bulunan  $\text{Fe}^{+3}$  veya  $\text{Cu}^{+2}$  katalizörlüğünde birbirleriyle reaksiyona girerek en güçlü radikal olan  $\text{OH}^{\bullet}$  molekülünü oluşturmaktadır. Bu reaksiyona Haber-Weis reaksiyonu denilir (Aruoma *et al.* 1991).



Hidroksil radikali yüksek enerjili iyonize radyasyon ile suyun muamele edilmesi neticesinde oluşabilmektedir (Gutteridge and Halliwell 1994). Ayrıca, UV ile indüklenen hidrojen peroksitin O-O bağlarının homolitik kırılması neticesinde de oluşmaktadır (Halliwell and Gutteridge 1996). Canlıda hidroksil radikalının neden olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen “Serbest Radikal Zincir” reaksiyonudur. Hücre zarında su bulunmadığından dolayı  $\text{OH}^{\bullet}$ ’ın başlıca hedefi hücre zarının yapısında bulunmakta olan yağ asitleridir. Hücre zar lipidlerinin peroksidasyonu hücre zarın yapısını bozarak geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Nishiyama *et al.* 1998).

#### 2.4.4. Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oksijenin enzimatik olarak iki elektron indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyonu tepkimeleri neticesinde oluşmaktadır. Yapısında ortaklaşmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımamaktadır (Halliwell and Gutteridge 1984). Üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine membranları geçen, hücre sitoplazması içerisine dağılan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinmektedir. Bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı ve membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilmektedir. Burada süperoksitle reaksiyona girmesiyle en reaktif ve ciddi zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilmektedir (Cherubini *et al.* 2005). Aslında hidrojen peroksitin oksitleyici bir ajan olarak bilinmesinin nedeni demir, bakır gibi metal

iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü gibi davranış göstermesidir (Halliwell and Gutteridge 1984).

#### **2.4.5. Peroksil (ROO<sup>•</sup>) ve alkoksil (RO<sup>•</sup>) radikalleri**

Karbon merkezli radikaller, karbonhidratlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi çok değişik biyolojik moleküllerin hidroksil grubu ile reaksiyona girmesiyle oluşmaktadır. Bunlar hızlı bir şekilde O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek peroksi radikalini (ROO<sup>•</sup>) oluşturmaktadırlar. Peroksi radikalinden de alkoksil radikali (RO<sup>•</sup>) oluşabilmektedir. Peroksil radikalleri askorbat ve NADH'ı okside ederek oksijenin varlığında NADH'ın oksidasyonu ise süperoksit oluşumuna yol açmaktadırlar. Ayrıca peroksil radikalleri, singlet oksijen oluşturmak üzere birbirleriyle de reaksiyona girebilmektedirler (Halliwell and Gutteridge 1996).

Genel olarak bakıldığında, canlı hücreesindeki ROT'ların oluşumu ve oluşan bu ROT'ların canlıda hasar meydana getirdiği hücre yapıları ile bunları etkisiz hale getiren antioksidan sistemler Şekil 2.9'da gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan özelliğe sahip SOD, GPx, GR gibi enzimlerle GSH'ın ROT'lar ile etkileşimi ve Fe atomlarının etkisi de şekil 2.14'de gösterilmiştir.

#### **2.5. Antioksidanlar**

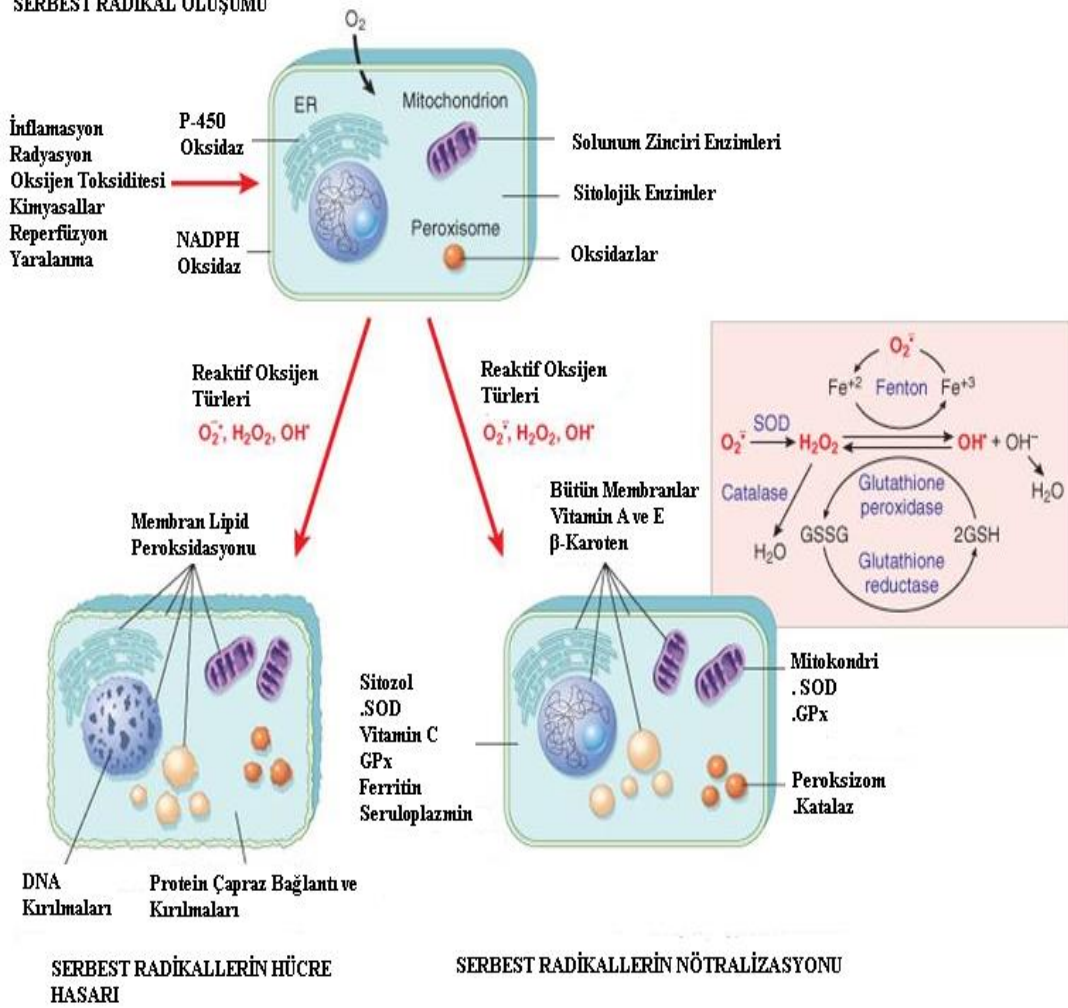
Canlıların yapısında meydana gelen hasar veya zararları önlemede ya da yok etmede birçok mekanizma bulunmaktadır. Özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için canlı vücudunda birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalardan birisi de antioksidan sistemdir. Antioksidanlar, genel itibariyle serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır. Bu maddeler genelde bir elektrona ihtiyaç duyarlar ve bundan dolayı da bağlanma potansiyelleri olarak yüksek derecede reaktiftirler. Antioksidanlar aynı zamanda serbest radikal oluşumunu engelleyen ve hali hazırda bulunan radikalleri etkisizleştirenler olarak da ikiye ayrılırlar. Bununla beraber genel olarak bakıldığında

ise enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılmışlardır. Antioksidanlar hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunurlar. Bunların dışında antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır.

a) Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPx'tir. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bağlanabilen  $\alpha$ -tokoferol ve  $\beta$ -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir (Woods *et al.* 2002).

b) Hücre dışı savunma sistemi ise; metallothionin gibi serbest radikal yokedicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur (Armstrong 1998).

#### SERBEST RADİKAL OLUŞUMU



Şekil 2.14. ROT ve antioksidanlar (Kotan 2010).

Canlı sistemler için son derece önem sahip olan antioksidan sistemlerin en önemli elemanı olan antioksidanların bazı özelliklerinin bulunması gerekmektedir. İyi bir antioksidanın taşınması gereken özellikler; ortamdaki serbest radikalleri giderebilmesi, antioksidan sistemdeki diğer antioksidanlarla etkileşimler yapabilmesi, redoks metallerinin ayarlayıcısı olarak görev yapabilmesi, dokulardaki ve biyolojik sıvılardaki yoğunluklarının fizyolojik açıdan uygun seviyelerde olması, gen ekspresyonu üzerinde olumlu etkileri olması, emiliminin oldukça hızlı olması ve hem membran hem de su içeren ortamlarda işlevsel olması olarak sıralanabilir (Valko *et al.* 2006).

Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu son yörüngesinde ortaklaşmamış iki elektron bulunmaktadır. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlamaktadır. Oksijen atomu, yörüngesindeki elektronların farklı dizilimi ile de süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna da neden olmaktadır. Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları da yer almaktadır. Oksijenli (aerobik) solunum yapan canlılar aldıkları besin maddelerini oksijeni kullanmak suretiyle parçalayarak enerjiye dönüştürürler. Bundan dolayı oksijenli solunum yapan canlılar serbest radikallerin en fazla olduğu canlı grubudur. Bu yüzden oksijenli solunum yapan canlılar serbest radikallerin etkilerine daha fazla maruz kalmaktadırlar.

Cherubini *et al.* (2005)'a göre biyolojik sistemlerde bulunan oksidanların yapımı ve yıkımı arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğü ile canlılığının devamlılığının sürdürülmesinde önemlidir. Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Temizleme (Scavenging) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından gerçekleştirilir.
2. Baskılama (Quencher) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.

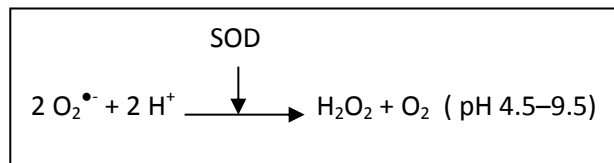
3. Onarma etkisi: Serbest radikallerin meydana getirdiği zararlı etkinin onarılmasıdır.
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (Turna 2008).

### 2.5.1. Enzimatik antioksidanlar

En önemli enzimatik antioksidantlar SOD ve GPx'tir.

#### 2.5.1.a. Süperoksit dismutaz (SOD)

Hücre içi enzimatik olan antioksidanların en önemlilerinden birisi süperoksit dismutazdır. Antioksidan bir enzim olan SOD  $O_2^{\bullet-}$  yi  $O_2$ 'ye ve ondan daha az reaktif olan  $H_2O_2$ 'ye katalizlemektedir. 1939'ların başlarında izole edilmiş olan SOD' un antioksidan aktivitesi 1969'da McCord ve Fridovich tarafından tespit edilmiştir (McCord and Fridovich 1969). İnsanlarda SOD enziminin 3 formu bulunmaktadır. Sitoplazmada bulunan Cu ve Zn-SOD, mitokondride bulunan Mn-SOD ve ekstraselular sıvı içerisinde yer alan SOD (EC-SOD) dur (Landis and Tower 2005).



Cu-Zn SOD: Genellikle sitoplazmada ve lizozom organellerinde bulunmaktadır. Cu-Zn SOD enzimi 32 kDa molekül ağırlığında olup iki alt üniteden oluşmaktadır. Her bir alt ünite bakır ve çinkodan oluşan küme halinde iki çekirdekli aktif bölge bulundurmaktadır. Enzim aktivitesi için pH'ın 5–9.5 aralığında olması gerekmektedir. Cu ve Zn atomları arasındaki köprü histaminle sağlanmaktadır. Bundan dolayı Cu-Zn SOD'un antioksidan savunma siteminde ilk sırada yer aldığına inanılmaktadır (Mates *et al.* 1999).

Mn-SOD (Mitokondrial SOD): Mitokondride bulunduğundan dolayı mitokondriyal SOD olarak da adlandırılan bu enzimin kofaktörü mangandır. Mn-SOD'lar bakterilerden yüksek yapılı organizmalar kadar, pek çok kaynaktan izole edilmiştir. Yüksek yapılı organizmalardan elde edilen tüm Mn-SOD'lar tetramerdir ve her alt üniteye bir  $Mn^{+2}$  iyonu içerirler (Fridovich 1985) ve Mn-SOD'un molekül ağırlığı 96 kDa'dır (Mates *et al.* 1999). Antioksidan savunma mekanizması içerisinde Mn-SOD en etkili antitümör aktiviteye sahip enzimdir (Behrend *et al.* 2003).

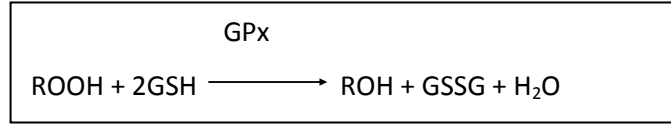
Ekstraselüler SOD (EC-SOD) tetramerik bir protein olup hücre dışı bölümlere salgılanmaktadır. Heparin bir domaine sahiptir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir. Cu-Zn SOD enzimi gibi EC-SOD enziminin de kofaktörleri çinko ve bakırdır (Mates *et al.* 1999).

Bu üç çeşit SOD enziminin dışında son zamanlarda *Streptomyces*'lerde keşfedilen Ni-SOD enzimi de bulunmaktadır. 117 aminoasitlik küçük bir proteine sahip bulunan bu enzim diğer SOD enzimleri ile sekans homolojisi göstermemektedir (Barondeau *et al.* 2004).

#### **2.5.1.b. Glutatyon peroksidaz (GPx)**

GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanlarından. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumlu enzimdir (Armstrong 1998).  $H_2O_2$ 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller (Kalaycıoğlu vd 1998) ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korumaktadır. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GPx ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyumu yapısında bulundurmaktadır. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Brigelius-Flohe and Traber 1999; Karagül vd 2000; Alpsoy 2008; Kotan 2010; Çeker 2011).

GPx ilk olarak 1957'de Mills adlı araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. Glutatyon sisteminin ilk enzimi olan GPx, lipit peroksitlerini daha az zararı olan toksik yağ



asitlerine indirgemektedir ve bunu yaparken de GSH'ı kofaktör olarak kullanmaktadır (Bukan 1999; Alpsoy 2008; Kotan 2010; Çeker 2011).



Mates (1999)'e göre üç peptidli glutasyonu (GSH) kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken sitoplazmadaki ve mitokondrideki SOD'lar tarafından üretilmiş olan hidrojen peroksidi de ortadan kaldıracak özelliğine sahiptir. GPx'ın selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Ayrıca farklı substratları kullanmaktadırlar. Selenyuma bağımlı formu sitoplazmada bulunur ve düşük bir kapasiteye sahiptir. Selenyuma bağımsız formu ise organik hidrojen peroksitlerini kullanmakta ve daha yüksek bir aktiviteye sahip bulunmaktadır. Glutasyon metabolizması antioksidan savunma sistemleri içerisinde büyük öneme sahip enzimlerden biridir. İnsan dokuları majör peroksit uzaklaştırıcı enzim olarak GPx içermektedir. İnsanlarda selenyuma bağlı 4 farklı GPx vardır (Turna 2008; Çeker 2011).

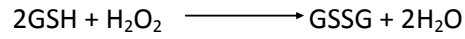
CAT ve SOD başlıca membranın hidrofilik bölgelerinde etki göstermektedir. Glutasyon peroksidaz ise hidrofobik membran komponentlerinde lipid peroksidasyonuna karşı dolaylı olarak koruyucu etkisi bulunmaktadır. Dolayısıyla glutasyon peroksidaz, CAT ve SOD'un kombine bulunduğu durumlarda serbest radikal ataklarına karşı hücre bütünlüğünün korunmasında daha etkili olmaktadır (Mates 1999). E vitamini yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı GPx korumaktadır. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır (Chao *et al.* 2002; Alpsoy 2008; Kotan 2010; Çeker 2011).



## 2.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

### 2.5.2.a. Glutatyon (GSH)

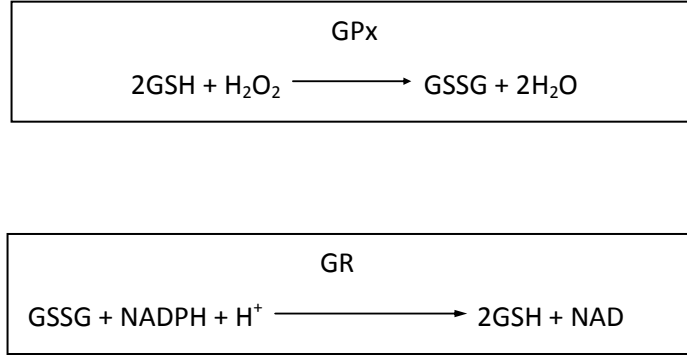
İntraselüler yapı içerisinde yer alan GSH önemli bir antioksidandır. Okside edilmiş şekliyle, serbest radikallerinin inhibisyonunda (Boehme *et al.* 1992), indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevi bulunmaktadır (Armstrong 1998). Ayrıca GPx'in kofaktörü olarak da görev yapmaktadır (Boehme *et al.* 1992).



Glutatyon sitoplazma içerisinde bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca GSH sitoplazmada içerisinde (1–11 mM), çekirdekte (3–15 mM) ve mitokondride (5–11 mM) bulunmakta olup suda çözünebilmektedir (Masella *et al.* 2005). Tabiatta yaygın olarak bulunmakta olan bu sülfürlü bileşik GSH, 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş ve glutamilsisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Ancak 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmıştır (Gözükara 1997).

Glutatyon sistein içeren bir tripeptid olup glutamat, sistein ve glisinden sentezlenmektedir. Glutatyon hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tioldür. Dokuda GSH düzeyi sadece senteze katılan enzimler tarafından düzenlenmez, tiol içeren aminoasitlerin yeterince olması da oldukça önem arz etmektedir (Parcell 2002). GSH'nin antioksidan özelliği bulundurduğu –SH grubuyla veya koenzim veya kofaktör olarak görev yaptığı enzimlerin ROT'lerini etkisizleştirmelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Janssen *et al.* 1993). *In vivo* sentezlenebilen ve ince bağırsaktan kısmen emilebilen GSH endojen ve eksojen bir antioksidandır. Glutatyon, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrat olup ksenobiyotik ve ROT'nin detoksifikasyonuna katılmaktadır. Ayrıca, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde orta düzeyde koruyucu etkiye sahip bulunmaktadır (Parcell 2002). GPx GSH'nin GSSG'ye oksitlenme

reaksiyonunu katalizleyerek GSH ile GSSG arasındaki dinamik dengenin korunabilmesi için glutatyonun oksitlenmiş formu (GSSG) glutatyon redüktaz (GSSG-red) enzimi ile GSH'a indirgenmekte ve kofaktör olarak NADPH kullanılmaktadır (Luberda 2005).



GSH eksikliği hücre ölümüne yol açabilmektedir. Karaciğerde iki GSH havuzu bulunmaktadır. Birincisinin yarı ömrü 2–4 saat ve sitoplazmik olup, ikincisinin yarı ömrü 30 saattir ve mitokondriyaldir. Ökaryotik hücrelerde GSH'nin %90'ı sitoplazmada, %10'u mitokondride, çok azı da endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. GSH oksidasyonu, apoptozis sürecinin erken belirtisidir ve metabolik sinyal gibi davranabilir. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Masella *et al.* 2005).

### 2.5.2.b. Malondialdehit (MDA)

Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yolla parçalanarak yıkılması olayına “Lipid peroksidasyonu” (LPO) denilmektedir. Hücre membranlarında bulunan yağ asitlerinin ve kolesterolün doymamış bağları, hızlıca ve kolaylıkla serbest radikaller ile tepkimeye girerek peroksidasyon ürünlerini meydana getirmektedir. Başka bir deyişle çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yolla parçalanarak yıkılması olarak bilinir ve son derece zararlıdır. Çünkü LPO sonucunda meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüz bir olaydır. Bu olayın (LPO) zararlı olmasının nedeni, kendi kendisini

devam ettiren zincir reaksiyonu olarak devam etmesi ya da ilerlemesidir (Heath and Packer 1968; Girotti 1985; Akkuş ve Kalak 1996; Long and Halliwell 2000).

Biyolojik sistemlerdeki LPO olayını başlatan durum serbest radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Bahsi geçen bu serbest radikallerin etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun koparılıp uzaklaştırılmasıyla, bu yağ asidinin radikal özellik kazanmasına neden olmaktadır. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesiyle birlikte değişikliğe uğramış olan kararsız lipid radikallerinin moleküler oksijenle tepkimeye girmesi neticesinde lipidperoksit radikalleri meydana gelmektedir ve bu lipid radikalleri dayanaksız bileşiklerdir (Spiteller 2001; Bahçekapılı ve Üzüm 2007).

Lipid hidroperoksitlerinin yıkılmasıyla oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilmektedirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından difüze edilerek hücrenin diğer bölümlerine hasarı yaymaktadırlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu neticesinde, malondialdehit (MDA) denilen metabolit meydana gelmektedir (Heath and Packer 1968; Girotti 1985; Yılmaz ve Ozan 2003). Bu metabolit (MDA) yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir indikatörü olmamakla birlikte lipid peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon göstermektedir. Bundan dolayı organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiobarbitürik asidi ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO' nun derecesi saptanmaktadır.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Deney Bitkilerinin Temini ve Teşhisi

Bu araştırmada kullanılan çalışma materyalleri bölgemizde bulunan *Dermatocarpon miniatum* Eschw., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Letharia vulpina* (L.) Hue, *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Parmelia sulcata* Taylor, *Ramalina farinacea* (L.) Ach., *Usnea articulata* (L.) Hoffm., *Usnea filipendula* Stirt., *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai ve *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. liken türlerinden oluşmaktadır. Tezde kullanılan liken türlerine ait örnekler, 2008–2010 yılları arasında Haziran-Ağustos ayları içerisinde farklı zaman dilimlerinde Erzurum, Artvin ve Giresun illeri ve çevrelerinden toplanmıştır. Likenler toplandıktan sonra yabancı bitki ve otlardan arındırılarak temizlenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin ardından likenler çeşitli uluslararası teşhis yöntemleri ve flora kitapları kullanılarak Prof. Dr. Ali ASLAN tarafından türlerin teşhisi yapılmıştır (Purvis *et al.* 1992; Aslan 2000; Aslan vd 2002). Teşhisi yapılan liken türleri blender yardımı ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen likenlerin birer parçaları da saklanmıştır. Ayrıca liken türlerinin birer herbaryum örnekleri de Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Herbaryumu'nda numaralandırıldıktan sonra (ATA-KKEF-1855 *Dermatocarpon miniatum* Eschw., ATA-KKEF-1856 *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, ATA-KKEF-1857 *Letharia vulpina* (L.) Hue, ATA-KKEF-1858 *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., ATA-KKEF-1859 *Parmelia sulcata* Taylor, ATA-KKEF-1860 *Ramalina farinacea* (L.) Ach., ATA-KKEF-1861 *Usnea articulata* (L.) Hoffm., ATA-KKEF-1862 *Usnea filipendula* Stirt., ATA-KKEF-1863 *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai ve ATA-KKEF-1864 *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.) uygun koşullarda saklanarak muhafazası yapılmıştır.

### 3.2. Bitki Türlerinin Ekstraksiyonu ve Total Ekstrenin Elde Edilmesi

Liken örnekleri toplanma işleminden sonra yabancı maddelerden temizlenerek ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan liken örnekleri blenderdan geçirildikten sonra bir havanda sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Her bir liken türünün 20 g örneği soxholet cihazına ekstraksiyonu kapları içerisinde yerleştirilerek ayrı ayrı sırasıyla n-Hekzan, dietileter, aseton ve metanol çözeltileri ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra her çözücüden elde edilen ekstreler evapore edilerek bir kaptan toplanmıştır. Toplanan liken ekstraterinden elde edilen pellet kıvamındaki total ekstre +4°C'ta muhafaza edilmiştir.

Ames/*Salmonella typhimurium* test sistemi için literatür taramasından sonra tezde kullanılacak olan dozlar 20 µg/petri, 40 µg/petri, 60 µg/petri, 80 µg/petri ve 100 µg/petri olacak şekilde belirlenmiştir. 0.010 gr liken %10'luk 10 mL DMSO'da çözülmüştür.

MN çalışması için likenlerimizin tezde kullanılacak olan dozları yapılan literatür taramalarından sonra 5µg/ml, 10µg/ml ve 20µg/ml olacak şekilde belirlendi. 0.012 gr liken %10'luk 10 mL DMSO'da çözülmüştür. Hazırladığımız bu stoktan 250 µl kültür ortamına katılınca medium ortamında son konsantrasyon 5µg/ml olmuştur. Sonra bu stoktan 500 µl kültür ortamına katılınca medium ortamında son konsantrasyon 10 µg/ml olmuştur. En son olarak stoktan 1000 µl kültür ortamına katılınca medium ortamında son konsantrasyon 20 µg/ml olmuştur.

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Mutant Bakteri Suşları, Kimyasallar ve Cihazlar

#### 3.3.1. Çalışmada kullanılan mutant bakteri suşları

Bu çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA1535 (ATTC® Numarası: 29629) ve TA1537 (ATTC® Numarası: 29630) mutant bakteri suşları ATTC® (The American Type Culture Collection – Georgetown University, Bacteria Department, Washington,

U.S.A.)’den; *Escherichia coli* WP2uvrA (ATTC® Numarası: 49979) mutant bakteri suşu da LGC Standarts (Middlesex, U.K.)’tan sağlanmıştır.

### 3.3.2. Çalışmada kullanılan pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler

#### 3.3.2.a. Ames/Salmonella ve E. Coli WP2 test sistemleri için

Sodyum Azid ( $\text{NaN}_3$ ) Sigma-Aldrich®

9-Aminoakridin (9-AA) Merck®

N-Metil-N’-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) ABCR GmbH & Co. KG®

Dimetil Sülfoksit (DMSO) ise Merck®

D-glukoz (dekstroz) Oxoid®

Nutrient Broth No.2 Oxoid®

Nutrient Agar Difco®

Bacto Agar Difco®

L-triptofan Merck®

Magnezyum Sülfat ( $\text{MgSO}_4$ ) Merck®

Potasyum Fostaf Dibasic ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) Merck®

Amonyum Sodyum Fosfat Dibasic Tetrahidrat ( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich®

D-Biyotin Sigma-Aldrich®

L-Histidin HCl Sigma-Aldrich®

Kristal Viyole Sigma-Aldrich®

Sitrik Asit Monohidrat ( $\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich®

Sodyum Klorür ( $\text{NaCl}$ ) Sigma-Aldrich®

Sodyum Fosfat Monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) Sigma-Aldrich®

Sodyum Fosfat Dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) Sigma-Aldrich®

#### 3.3.2.b. Mikronükleus test sistemi için

RPMI-1640

Fitohemaglutinin (FHA)

Fetal Bovine Serum (FBS)  
L-Glutamin  
Karyotyping Medium Peripheral Blood (Biological Industries)  
Penisilin-Streptomisin (PS)  
Potasyum Klorür (KCl) Merck®  
Potasyum fosfat monobazik (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Merck®  
Sodyum fosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) Merck®  
Giemsa boyası Merck®  
Asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) Merck®  
Metanol (CH<sub>3</sub>OH) Merck®  
Aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) Sigma-Aldrich®  
Dimetil sülfoksit (DMSO)  
Sitokalazin B Sigma-Aldrich®

### 3.3.3. Çalışmada kullanılan aletler ve cihazlar

Buzdolabı: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF  
Çalkalamalı İnkübatör: Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B  
Derin Dondurucu: Nuaire, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK  
Hassas Terazi: Mettler Toledo, CHINA, AL204  
İnkübatör: Binder, GERMANY, BD53  
Manyetik Karıştırıcı : Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083  
Otoklav: Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253  
Saf Su Cihazı: GFL, GERMANY, 2004  
Sıcak Su Banyosu: Memmert, GERMANY, 854  
Steril Kabin: Esco, SINGAPORE, AC2-4E1  
Spektrofotometre: Shimadzu, JAPAN, RC 232C  
pH Metre: Hanna, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202  
Vortex: IKA, U.S.A., MS2  
Elektronik terazi (Precisa 160 M)  
Santrifüj (nüve CN180, NF048)

Mikroskop ( Olympus BX2)  
 Mikroskop ( Nikon)  
 Mikronükleus Görüntüleme (Nikon)  
 Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica)  
 Cam erlen mayer  
 Cam mezür  
 Cam şale  
 Plastik pastör pipeti  
 Kültür tüpleri  
 Etüv

### 3.4. Ames/Salmonella ve E. Coli WP2 Test Sistemleri

#### 3.4.1. Çözeltiler ve besiyerleri

Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50×): Minimal glukoz agar (bottom = alt agar) besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> )	8,7 g
Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat (NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> + 4H <sub>2</sub> O)	175 g
Potasyum fostaf dibasic (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	500 g
Sitrik asit monohidrat (HOC(COOH)(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O)	100 g

Çözeltinin hazırlanmasında, önceden sıcaklığı 50°C'ye ayarlanmış olan 650 ml distile su içerisine yukarıdaki maddeler belirtilen miktarlarda sırasıyla eklenir. Manyetik karıştırıcı yardımıyla maddenin tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra bir maddenin ardından diğerinin eklenmesi suretiyle hazırlanan çözeltinin son hacmi, distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlanır. Bu işlem tamamlandıktan sonra 20 ml'lik hacimlerde cam deney tüplerine aktarılan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir ve



daha sonra karanlıkta oda ısısında saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**%10'luk D-glukoz çözeltisi: Minimal glukoz agar (bottom=alt agar) besiyelerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
D-glukoz (Dekstroz)	100 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 100 g D-glukoz 700 ml distile su içerisine konularak manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldükten sonra son hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Bu işlemten sonra elde edilen çözelti 50 ml'lik hacimlerde cam şişelere aktarılarak 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve +4°C'de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**Minimal glukoz agar:** Tez çalışmasında mutajenite ve antimutajenite deneylerinde temel alt (bottom) besiyeri olarak kullanılmıştır. Ayrıca minimal glukoz agar besiyeri modifiye edilerek, test organizmalarının biyotin, histidin ve triptofan oksotroforlerini araştırmak için de kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Vogel-Bonner (VB tuzlar.) medyum E (50 X)	20 ml
%10'luk D-glukoz çözeltisi	50 ml

Kullanılan bu besiyeri hazırlanmasında 15 g agar 930 ml distile su içerisine konular ve oluşan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir. Sterilizasyon işleminden sonra sıcaklık 45-65°C'ye kadar düşürülür ve çözeltiliye daha önceden hazırlanmış ve steril edilmiş Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50X) ve %10'luk D-glukoz çözeltisi eklenerek steril kabin içerisinde hafifçe çalkalamak suretiyle iyice karıştırılır. Çözelti uygun dökme sıcaklığına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde

petrilere dökülür. Petrilere dökülen bu besiyeri oda sıcaklığında, steril ortamlarda muhafaza edilmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**Histidin/Biyotin çözeltili top agar:** *S. typhimurium* suşlarıyla yapılan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde kullanılan test materyalinin, test bakterilerinin ve diğer kimyasal maddelerin homojen olarak etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 g
Sodyum klorur (NaCl)	6 g
0,5 mM Histidin/Biyotin cozeltisi	100 ml

Tez çalışmasında kullanılan bu çözeltinin hazırlanışında 6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine katılır ve oluşan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir. Sterilizasyon işleminden sonra oda sıcaklığında saklanır. Hazırlanmış olan bu çözelti deneyde kullanılmadan önce mikrodalga fırında ısıtılarak çözülür ve içerisine 100 ml 0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi eklenir (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**Triptofan çözeltili top agar:** *E. coli* bakteri suşuyla yapılan mutajenite ve antimutajenite deneylerinde uygulanan test materyalinin, test bakterilerinin ve diğer kimyasalların homojen olarak etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 g
Sodyum klorur (NaCl)	6 g
0,5 mM Triptofan cozeltisi	100 ml

Tez çalışmasında kullanılan bu çözeltinin hazırlanışında 6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine katılır ve elde edilen bu çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir. Sterilizasyon işleminden sonra oda sıcaklığında saklanır. Deneyde

kullanılmadan önce ise bu çözelti, mikrodalga fırında ısıtılmak suretiye çözülür ve içerisine 100 ml 0,5 mM triptofan çözeltisi eklenir (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

**0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi:** *S. typhimurium* suşları ile yapılan mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında; histidin ve biyotin oksotrofu olan *S. typhimurium* suşlarının birkaç defa bölünmesine olanak sağlayarak, bu bakterileri mutajen ve antimutajen ajanlara karşı daha duyarlı hale getirmek amacıyla kullanılmaktadır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
D-Biyotin	124 mg
L-Histidin	96 mg

Tezde kullanılan bu çözeltinin hazırlanmasında D-Biyotin ve L-Histidin maddeleri kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile iyice karıştırılmak suretiyle çözülür. 0,45 µM membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C’de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**0,5 mM Triptofan çözeltisi:** Kullanılan bu çözelti *E. coli* suşu kullanılarak yapılan mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında; triptofan oksotrofu olan test bakt *E. coli* suşunun birkaç defa bölünmesine olanak sağlayarak, bu bakterileri mutajen ve antimutajen ajanlara karşı daha duyarlı hale getirmek amacıyla kullanılmaktadır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
L-Triptofan	102 mg

Bu çözeltinin hazırlanmasında 102 mg L-Triptofan kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözülür. 0,45 µM membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C’de saklanır (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

**0,1 mM Sodyum fosfat tamponu (pH: 7,4):** Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında reaksiyon ortamının pH dengesini sağlamak, kullanılan test materyaliyle mutajen madde ve bakteri hücreleri arasındaki etkileşimi kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
<b>A Çözeltisi:</b> 1000 ml distile su içerisinde 11,9 g sodyum fosfat monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) çözülmesiyle hazırlanır.	120 ml
<b>B Çözeltisi:</b> 1000 ml distile su içerisinde 12,6 g sodyum fosfat dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) çözülmesiyle hazırlanır.	880 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında A ve B çözeltileri belirtilen miktarlarda karıştırılır. Daha sonra pH: 7,4 değerine ayarlanır. Eğer pH istenilen değerde değışi ise ortama A çözeltisi ilave edilerek pH istenilen değere ayarlanır. Bu pH ayarlama işleminin ardından 20 ml'lik hacimlerde cam deney tüplerine çözelti aktararak 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir ve karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**Nutrient broth:** Tezde kullanılan test bakterilerinin canlandırılması ile gecelik kültürlerinin hazırlanması işleminde kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Oxoid nutrient broth No:2	23 g

Nutrient broth çözeltisinin hazırlanışında 23 g madde kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine aktararak manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözülür. Elde edilen çözelti 10 ml'lik hacimlerde cam tüplere aktarıldıktan sonra 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir ve +4°C'de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000).

**Nutrient agar:** Bu çözelti canlandırılan test bakterilerinden tek kolonilerin elde edilmesi ve *E. coli* mutant bakterileri irkinin *uvrA* mutasyonu ile *S. typhimurium* mutant bakterilerinin *rfa* ve *uvrB* mutasyonlarının genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Difco nutrient agar	28 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 28 g Nutrient agar kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine aktarılarak manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözülür. Elde edilen bu çözelti 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edilir. Sterilizasyon işleminden sonra dökme sıcaklığına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülür. Bu besiyerleri de oda sıcaklığında steril ortamlarda muhafaza edilmelidir (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**%0,1’lik Kristal viyole çözeltisi:** *rfa* mutasyonu taşıyan mutant *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
Kristal viyole	100 mg

Bu çözelti 100 mg kristal viyolenin 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanır. Elde edilen çözelti ışık geçirmeyen şişelere konularak +4°C’de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**%0,01’lik Biotin çözeltisi:** Biotin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
D-Biotin	10 mg

Bu çözelti 10 mg D-biyotinin kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanır. Elde edilen çözelti 0,45  $\mu$ M membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**%0,5'lik Histidin çözeltisi:** Histidin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
L-Histidin	500 mg

Bu çözelti 500 mg L-Histidin'in kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanır. Elde edilen çözelti 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

**%0,4'luk Triptofan çözeltisi:** Triptofan oksotrofu olan *E. coli* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
L-Triptofan	400 mg

Bu çözelti 500 mg L-triptofanın kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanır. Elde edilen çözelti 0,45  $\mu$ M membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanır (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

### **3.5. Mikronükleus Analizleri**

#### **3.5.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

##### **Tespit solüsyonunun hazırlanışı**

1/3 asetik asit metanol çözeltisi hazırlanmıştır.

#### **Hipotonik solüsyonun hazırlanışı**

0.560 gr KCl 100 mL distile suda çözülerek 0.0075M KCl çözeltisi hazırlanmıştır.

#### **Boya solüsyonunun hazırlanışı**

9.08 gr/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14.8 gr/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  hazırlanmıştır. 30 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  alınarak üzerine 40 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solüsyonu eklenerek pH 6.8'e ayarlanmıştır.

#### **Lenfosit besi yerlerinin hazırlanışı ve saklanması**

100 mL RPMI-1640

20 mL FBS

5 mL FHA

2 mL L-Glutamine

1 mL PS

Karyotyping Medium Peripheral Blood Biological Industries

Hazırlanan solüsyon 7.5 mL olacak şekilde steril hücre kültür tüplerine paylaştırılarak kullanım zamanına kadar  $-20^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.5.2. Donör seçimi**

Sağlık sorunu olmayan, yaşları 24 ile 28 arasında bulunan 4 erkek ve 4 bayandan oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 8 donör seçilmiştir. Donörler sigara kullanmayan (ayrıca pasif içici olmadıkları da belirlenerek), herhangi kalıtsal, akut veya kronik rahatsızlıkları olmayan sağlıklı kişiler arasından seçilmiştir. Ayrıca donörler son

6 ay içerisinde her hangi bir nedenle antibiyotik, X-Ray almadıkları, tanımlanan akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanlarına dayanılarak kabul edilmiştir. Donörlerden çalışmaya başlanacağı saatte heparinize kan numuneleri alınmıştır.

### 3.5.3. Deney düzeneğinin oluşturulması

Daha önce hazırlanmış olan besi yerleri  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen besi yerine aşağıda belirtilen kimyasallar, belirlenen oranlarda steril (filtre) edilerek ve steril şartlar altında eklenmiştir. Bu işlemler sonrasında belirlenen donörden alınan kan örneklerinden her bir tüp içerisine 1 mL eklenmiştir. Bu deney düzeneği toplam 8 donör için tekrarlanmıştır. Hazırlanan bu deney düzeneği her bir liken örneği için tekrar edilerek dozlar aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

Kültür 1: Sadece besi yeri + Kan (1 ml)

Kültür 2: Besi yeri + Kan (1 ml) + 5  $\mu\text{M}$  AFB<sub>1</sub>

Kültür 3: Besi yeri + Kan (1 ml) + 10  $\mu\text{g/ml}$  liken

Kültür 4: Besi yeri + Kan (1 ml) + 5  $\mu\text{M}$  AFB<sub>1</sub> + 5 $\mu\text{g/ml}$  liken

Kültür 5: Besi yeri + Kan (1 ml) + 5  $\mu\text{M}$  AFB<sub>1</sub> + 10 $\mu\text{g/ml}$  liken

Kültür 6: Besi yeri + Kan (1 ml) + 5  $\mu\text{M}$  AFB<sub>1</sub> + 20 $\mu\text{g/ml}$  liken

### 3.5.4. Lenfosit kültürü

Donörlerden alınan heparinize periferik kan örnekleri ve ilgili kimyasallar ile hazırlanan 8 mL'lik hücre kültür tüpleri 72 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de kapalı hücre kültürüne alınmıştır. Kültürün 44. saatinde her bir tüpe 6 $\mu\text{g/ml}$  Cytochalasin B ilave edilmiştir.

72. saatte kültüre edilen tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı biyokimyasal analizler için ayrılmıştır.



Pellet üzerine hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) eklenmiş ve tüpler 20 dakika 37°C'lik etüvde bekletilmiştir.

1200 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı atılmış ve pellet üzerine 1:3 oranında soğuk asetik asit metanol karışımı eklenerek tespit işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tespit işleminden sonra tüpler 24 saat +4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra çıkarılan tüplere tespit işlemi toplam üç kez tekrarlanmıştır. Tespit işlemi sonunda süpernatantın 1-1.5 mL'lik alt kısmı hariç diğer bölümü atılmıştır.

Dipte kalan pellet çalkalanarak tekrar süspansiyon edildikten sonra soğuk tespit içinde bekleyen lamaların her birine 10-12 damla bu süspansiyondan damlatılarak her doz için 5 çift lam hazırlanmıştır.

Hazırlanan preparatlar üç gün oda sıcaklığında bekletilerek kurumaya ve yaşlanmaya bırakılmıştır.

Bu 3 günlük sürenin sonunda her bir preparat giemsa boyası ile boyanarak sayıma hazır hale getirilmiştir.

### **3.5.5. Giemsa ile boyama işlemi**

Bu işlem sırası ile şu şekilde tatbik edilmiştir;

Üç gün oda ısısında kurutulan preparatlar Giemsa boyası ile 10 dk boyanarak ve kuruduktan sonra incelemeye alınmıştır. İnceleme işleminde elde edilen veriler her doz için ayrı ayrı not alınarak verilerin elde edilmesi sağlanmıştır.

### 3.6. SOD, GSH, GPx, MDA Ölçümü

SOD, GSH, GPx, MDA, ölçümü için 72 saat kültüre edilen tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı analiz için kullanılmıştır.

#### 3.6.1. Superoksit dismutaz (SOD) ölçümü

##### **Kullanılan reaktifler:**

\* Deney reaktifi (Ksantin 0.3 mM; EDTA 0.6 mM; NBT 150 µM; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4 M; BSA 1 gr/L)

\* Ksantin oksidaz 167 U/L

Cu,Zn-SOD aktivitesi hücre kültürü süpernatantında Sun ve arkadaşlarının tarif ettiği metod kullanılarak ölçülmüştür (Sun *et al.* 1988). 100 µl numune üzerine 2.45 mL assay reaktifi (0.3 mM xanthine, 0.6 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.15 mM NBT, 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sodyum karbonat), 1 g/L bovine serum albumin (BSA) katılmıştır. Ksantin oksidaz (50 µl, 167 U/L) ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksit anyon radikalleri tarafından NBT'nin indirgenmesi ile oluşan absorbans değişimi 560 nm de ölçülmüştür. NBT'nin indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesi 1 enzim ünitesi olarak tanımlanmıştır. Cu, Zn-SOD aktivitesi mg proteinde SOD ünitesi olarak ifade edilmiştir.

#### 3.6.2. Glutasyon peroksidaz (GPx) ölçümü

##### **Kullanılan Reaktifler:**

Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5 mM EDTA'lı)

Glutasyon (GSH) (150 mM)

Glutasyon redüktaz (30 U/mL)

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) (8 mM)

Sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ) (0.12 M)

Hidrojen peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (2 mM)

GPx aktivitesi, hücre kültürü süpernatantında Paglia ve Valentine metodu ile ölçülmüştür (Paglia and Valentine 1967). Kısaca, bir küvet içerisine 50  $\mu\text{l}$  numune, 100  $\mu\text{l}$  NADPH (8 mM), 100  $\mu\text{l}$  redükte glutatyon (150 mM), 20  $\mu\text{l}$  glutatyon redüktaz (30 U/mL), 20  $\mu\text{l}$  sodyum azid çözeltisi (0.12 M) ve 2.65 mL potasyum fosfat tamponu (50 mM) (pH 7.0, 5 mM EDTA) birleştirildikten sonra 30 dk. 37°C'de inkübe edilmiştir. 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM) ilave edilerek alt üst yapmak suretiyle karıştırılmış ve reaksiyon başlatılmıştır. NADPH'ın NADP'ye dönüşümü 5 dk. 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Enzim aktivitesi, 340 nm dalga boyundaki NADPH'ın molar absorbtivite katsayısı ( $6.22 \times 10^{-6}$ ) kullanılarak hesaplanmış ve ünite/gr protein olarak ifade edilmiştir.

### 3.6.3. Glutatyon (GSH) ölçümü

#### **Kullanılan Reaktifler:**

10mM 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi

100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

5 mM  $\text{Na}_2$  EDTA

GSH-RD, 625 U/L

1.47mM  $\beta$ -NADPH

Glutatyon (GSH) (150 mM)

GPx aktivitesi, hücre kültürü süpernatantında Paglia ve Valentine metodu ile ölçülmüştür (Paglia and Valentine 1967). Kısaca, bir küvet içerisine 100  $\mu\text{l}$  numune, 3 ml'lik küvete konulduktan sonra 750  $\mu\text{L}$  10mM 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit

(DTNB) çözeltisi ile 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 5 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ilave edilmiştir. Daha sonra 625 U/L GSH-RD eklenerek pH 7.5'e ayarlanmıştır. 3 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 150  $\mu\text{L}$  1.47mM  $\beta\text{-NADPH}$  eklenerek ters çevirerek hızlıca karıştırılmıştır. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş GSH miktarı oranında 5-thio-2-nitrobenzoik asit oluşumu 2 dk. 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Enzim aktivitesi, 412 nm dalga boyundaki NADPH'nin molar absorbtivite katsayısı ( $6.22 \times 10^{-6}$ ) kullanılarak hesaplanmış ve ünite/ $\mu\text{mol}$  gr protein olarak ifade edilmiştir.

#### **3.6.4. Malondialdehit (MDA) ölçümü**

##### **Kullanılan Reaktifler:**

%8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS)

%20 asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

n-bütanol/piridin (15:1, v/v)

EDTA 0.1 M

Tiobarbutirik asit (TBA) çözeltisi %1

Sodyum hidroksit (NaOH) 0.05 N

MDA seviyesi hücre kültürü süpernatantında Ohkawa tarafından tanımlanan metoda göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Ohkawa 1979). Toplam hacim 4 mL olacak şekilde %8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), %20 asetik asit, %0.9 tiobarbiturik asit karışımına 0.2 mL numune eklenerek 1 saat  $95^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve üzerine 1 mL distile su ile 5 mL n-butanol/piridin (15:1, v/v) eklenmiştir. Numuneler 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 532 nm'de absorbansı ölçülmüş ve standart grafik yardımı ile MDA konsantrasyonu hesaplanmıştır. 1.1.3.3-Tetraetoksipropan standart olarak kullanılmıştır. MDA konsantrasyonu  $\mu\text{mol/L}$  olarak ifade edilmiştir.

Protein konsantrasyonu hücre kültürü süpernatantında Bradford metoduna göre belirlenmiştir (Bradford 1976). Fotometrik ölçümler, DU 530 spektrofotofmetre (Beckman Instruments, Fullerton, CA) ile kuartz küvetler kullanılarak ölçülmüştür.

### 3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen Ames/*Salmonella* ve *E. Coli* WP2 verileri, ortalama ve standart hatalar ( $\bar{x} \pm SE$ ) hesaplanmıştır. Mutajen maddelerin etkisi ve liken ekstraktlarının nasıl bir ilişki içerisinde olduğu SPSS 16.0 analiz programında T-Testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçların  $p < 0.05$  olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Elde edilen MN verileri ile sayı, ortalama ve standart hatalar ( $\bar{x} \pm SE$ ) hesaplanmıştır. AFB<sub>1</sub>'in MN üzerine etkisi ve liken ekstraktlarının nasıl bir ilişki içerisinde olduğu SPSS 16.0 analiz programında Duncan's ile değerlendirilmiştir. Sonuçların  $p < 0.05$  olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

Biyokimyasal parametrelerin ortalama değişimlerinin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Sonuçların  $p < 0.05$  olması durumunda önemli kabul edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yaptığımız tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar mikrobiyal mutajenite testi olan AMES-*Salmonella* ve ökaryotik mutajenite testi olan Mikronukleus (MN) ile, ayrıca biyokimyasal analizlerden olan SOD, GPx, GSH ve MDA için üç ayrı başlık altında verilmiştir. Her bir parametre içinde kontrol ve deney grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 4.1. Mutajenite ve Antimutajenite Araştırmalarında Kullanılan Mutant Bakterilerin Genetik Özelliklerinin Kontrolü

#### 4.1.1. Histidin/Biyotin gereksinimi

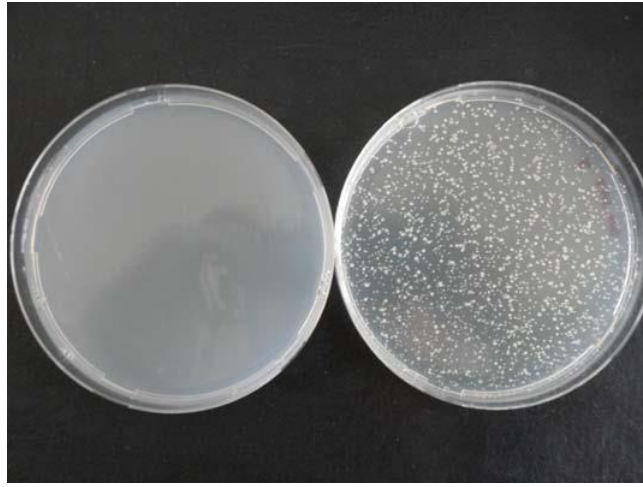
*S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 bakteri suşları ile histidinli, biyotinli ve histidin/biyotinli minimal glukoz agar petrileri kullanılarak yapılan deneyler sonucunda yalnızca histidin/biyotinli minimal glukoz agar petrilerinde üreme görülmesi kullanılan test bakterilerinin histidin/biyotin oksotrofu olduğunu kanıtlamıştır.



**Şekil 4.1.** *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında üreme için histidin/biyotin gereksiniminin gösterilmesi

#### 4.1.2. Triptofan gereksinimi

*E. coli* WP2*uvrA* bakteri suşu ile triptofansız ve triptofanlı minimal glukoz agar petrileri kullanılarak yapılan deneyler sonucunda yalnızca triptofanlı minimal glukoz agar petrilerinde üreme görülmesi kullanılan test bakterisinin triptofan oksotrofu olduğunu kanıtlamıştır.



**Şekil 4.2.** *E. coli* WP2*uvrA* suşunda üreme için triptofan gereksiniminin gösterilmesi

#### 4.1.3. *uvrA* ve *uvrB* mutasyonları

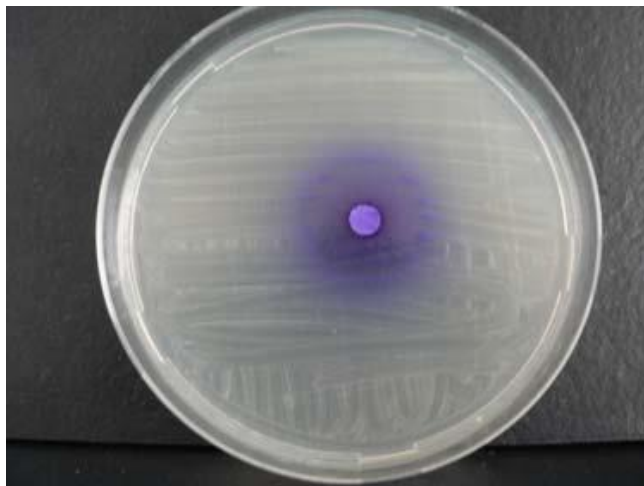
*E. coli* WP2 ve *S. typhimurium* bakteri suşlarının nutrient agar besi yeri içeren petrilere ekilme ve kısmen U.V. ışığa maruz bırakma esasına dayanan testler sonucunda U.V. ışınlarından korunan bölgelerde üreme olmasına karşın bu ışınlara maruz kalan bölgelerde bakteri üremesinin görülmemesi; test suşlarından *E. coli* WP2'nin *uvrA* ve *S. typhimurium* bakteri suşlarının *uvrB* mutasyonu taşıdığını kanıtlamıştır.



**Şekil 4.3.** Test suşlarının *uvrA* ve *uvrB* mutasyonlarını taşıdıklarının gösterilmesi

#### **4.1.4. *rfa* mutasyonu**

*S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 bakteri suşlarının nutrient agar besi yeri içeren petrilere ekilme ve kısmen kristal viyoleye maruz bırakma esasına dayanan testler sonucunda boya bulunan bölgelerde bakteri üremesinin olmadığı şeffaf alanların oluşması test bakterilerinin *rfa* mutasyonu taşıdıklarını kanıtlamıştır.



**Şekil 4.4.** *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında *rfa* mutasyonunun gösterilmesi



#### 4.2. Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayılarının Belirlenmesi

Yapılan kontrol testleri ile mutant bakteri suşlarında meydana gelen spontan mutasyonların göstergesi olan kendiliğinden geri dönen koloni sayıları her bir suş için belirlenmiştir. Ayrıca bu testlere ilaveten yapılan tüm deneylerde kendiliğinden geri dönen koloni sayılarını belirleyen negatif kontroller kullanılmıştır.

**Çizelge 4.1.** Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları

Mutant Bakteri Suşu	Kendiliğinden Geriye Dönen Koloni Sayısı (Ortalama $\pm$ S.H.)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	22,44 $\pm$ 1,34
<i>S. typhimurium</i> TA1535	20,10 $\pm$ 2,14
<i>S. typhimurium</i> TA1537	20,34 $\pm$ 2,03

#### 4.3. Pozitif Mutajenlerin ve Test Materyallerinin Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Pozitif mutajenlerin uygun konsantrasyonlarını belirleme amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda bu maddelerin uygulama konsantrasyonları *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) için 1  $\mu$ g/petri, sodyum azid (NaN<sub>3</sub>) için 1  $\mu$ g/petri ve 9-Aminoakridin (9-AA) için 40  $\mu$ g/petri olarak belirlenmiştir.

Test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarını belirlemek için yapılan sitotoksik etki belirleme çalışmaları sonucunda yan etkilerin görülmediği en üst limitler liken ekstraktları için 100  $\mu$ g/petri olarak belirlenmiştir.

#### 4.4. Liken Özütlelerinin Mutajenik ve Antimutajenik Özellikleri

*Dermatocarpon miniatum* Eschw., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Letharia vulpina* (L.) Hue, *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Parmelia sulcata* Taylor, *Ramalina farinacea* (L.) Ach., *Usnea articulata* (L.) Hoffm., *Usnea filipendula* Stirt., *Vulpicida pinastris*

(Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai ve *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. liken türlerinden elde edilen total liken ekstraları ile yapılan mutajenite deneylerinin hiçbirinde uygulanan konsantrasyonlarda (20 µg/petri, 40 µg/petri, 60 µg/petri, 80 µg/petri ve 100 µg/petri) mutajenik etkiye rastlanmamıştır (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Ames-*Salmonelle typhimurium* (TA 1535, TA1537) ve *E. Coli* WP2uvrA mutajenite test sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon (µg/plate)	<i>E. coli</i> WP2uvrA		<i>S. typhimurium</i> TA1535		<i>S. typhimurium</i> TA1537	
		Ort. ± S.H.	%Mut.	Ort. ± S.H.	%Mut.	Ort. ± S.H.	%Mut.
<i>D. miniatum</i>	25	21,50±02,14	-	21,75±02,03	-	23,75±01,34	-
	50	23,25±01,03	-	22,00±01,89	-	23,25±01,96	-
	100	23,25±01,99	-	23,00±01,01	-	25,00±01,03	-
<i>F. caperata</i>	25	22,75±02,01	-	28,50±00,96	-	24,50±01,32	-
	50	23,00±01,10	-	27,75±01,34	-	28,00±01,08	-
	100	22,75±02,00	-	29,50±02,00	-	29,00±02,00	-
<i>L. vulpina</i>	25	22,25±02,05	-	28,50±01,66	-	23,50±02,02	-
	50	23,00±02,08	-	26,25±01,85	-	22,50±01,85	-
	100	23,25±02,10	-	27,75±01,44	-	24,00±01,96	-
<i>P. saxatilis</i>	25	25,00±01,63	-	23,25±01,03	-	25,25±01,87	-
	50	27,25±01,44	-	23,50±02,09	-	26,50±01,98	-
	100	23,75±01,03	-	22,50±01,56	-	25,75±02,23	-
<i>P. sulcata</i>	25	30,25±02,00	-	25,50±01,69	-	30,00±01,97	-
	50	30,75±02,01	-	27,00±02,01	-	28,75±01,57	-
	100	31,00±02,13	-	27,25±02,14	-	29,25±01,92	-
<i>R. farinacea</i>	25	25,00±01,63	-	27,75±00,95	-	28,50±01,80	-
	50	22,75±01,38	-	26,50±02,06	-	26,75±02,00	-
	100	25,25±02,75	-	24,50±01,32	-	29,25±01,83	-
<i>U. articulata</i>	25	26,75±02,02	-	27,50±01,45	-	22,75±01,76	-
	50	24,75±01,59	-	25,75±01,23	-	25,00±01,22	-
	100	24,00±01,96	-	26,25±01,51	-	23,75±01,34	-
<i>U. filipendula</i>	25	24,50±01,66	-	25,75±01,88	-	25,25±02,05	-
	50	22,75±01,56	-	26,75±01,82	-	23,25±02,01	-
	100	25,00±01,11	-	26,75±01,78	-	25,75±01,98	-
<i>V. pinastri</i>	25	30,00±01,89	-	25,20±01,91	-	25,00±01,48	-
	50	27,75±01,76	-	25,25±02,01	-	26,75±01,56	-
	100	28,00±01,65	-	25,50±02,00	-	25,50±01,97	-
<i>X. parietina</i>	25	25,00±01,70	-	26,25±01,83	-	23,25±01,65	-
	50	26,75±01,89	-	26,50±01,77	-	25,75±02,01	-
	100	27,25±02,00	-	26,00±02,09	-	25,25±01,97	-
MNNG**	1	235,50±3,97					
NaN <sub>3</sub> **	1			318,00±7,92			
9-AA**	40					241,00±4,49	
DMSO**	100			6,50±0,76		4,50±0,42	
µl/plate		25,00±0,57					

Aynı liken türlerinin total ekstraları ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğrıtılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine *Dermatocarpon miniatum* Eschw. total ekstresinin (D.M.T.E) 100 µg/petri ve 20 µg/petri dozlarında sırasıyla **%42,25** ve **%40,13** ile yüksek, 60 µg/petri dozunda ise **%32,06** ile orta dereceli antimutajenik etki göstermiştir.

Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğrıtılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde D.M.T.E'nin 80 µg/petri dozunun **%13,67** ile zayıf bir antimutajenik etkisi gözlenirken 60 µg/petri dozunda ise zayıf mutajenik etki gözlenmiştir.

9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğrıtılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde D.M.T.E'nin 20 µg/petri, 80 µg/petri ve 100 µg/petri dozlarında sırasıyla **%58,50**, **%43,98** ve **%52,28** ile kuvvetli antimutajenik etki, 60 µg/petri dozunda **%26,76** ile orta düzeyde antimutajenik etki ve 40 µg/petri dozunda ise %16,80 ile zayıf antimutajenik etki gözlenmiştir.

*Flavoparmelia caperata* (L.) Hale liken türünün total ekstresi (F.C.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğrıtılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine F.C.T.E'nin 100 µg/petri dozu ile 20 µg/petri'lik dozu **%40,98** ile en yüksek oranda antimutajenite göstermektedir. Ayrıca 40 µg/petri dozu ile 80 µg/petri'lik dozları da **%32,91**, **%29,51** ile yüksek düzeyde antimutajenite göstermiştir. 60 µg/petri'lik dozu ise **%24,42** ile diğer dozlara nazaran en az düzeyde antimutajenite göstermesine rağmen antimutajenik etkinliğinin yüksek olduğu görülmüştür.

Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğrıtılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde F.C.T.E'nin 100 µg/petri dozunun **%17,13** ile 80 µg/petri'lik dozun ise **%15,88** ile orta seviyede antimutajenite gösterdiği, bununla beraber 60 µg/petri dozu ise **%8,49** ile zayıf seviyede antimutajenik etki

göstermiştir. Ayrıca F.C.T.E'nin 20 µg/petri ve 40 µg/petri'lik dozları sırasıyla **%5,03** ve **%13,83** ile zayıf mutajenite göstermiştir.

9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde F.C.T.E'nin 20 µg/petri'den 100 µg/petri'ye kadar ki tüm dozları yüksek antimutajenik özellik göstermiştir. Tabloya bakıldığında dozun artmasıyla paralel olarak antimutajenik özelliğinin de arttığı görülmüştür. Sırasıyla 20 µg/petri'den 100 µg/petri'ye kadar olan dozları **%45,85**, **%48,75**, **%50,86**, **%57,67** ve **%62,65** oranında antimutajenik inhibisyon oranına sahip olduğu görülmüştür.

*Letharia vulpina* (L.) Hue liken türünün total ekstresinin (L.V.T.E) antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine 100 µg/petri ve 80 µg/petri'lik dozları **%33,33** ve **%29,09** ile kuvvetli antimutajenik etki gösterdiği görülmüştür. 20 µg/petri, 40 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozlar ise zayıf antimutajenite göstermekle beraber en düşük etkiye sahip doz **%11,89** ile 20 µg/petri'lik dozun olduğu görülmüştür. 40 µg/petri ve 60 µg/petri dozları **%15,07** ve **%19,75** ile orta düzeyde antimutajenik inhibisyon oranına sahip oldukları görülmüştür.

*Letharia vulpina* (L.) Hue liken türünün total ekstresinin (L.V.T.E) Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde L.V.T.E'nin 100 µg/petri dozunun **%32,86** oranında en yüksek düzeyde antimutajenik etkinlik gösterdiği görülmüştür. L.V.T.E'nin 40 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozları ise **%20,44** ve **%21,38** oranında orta düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. Fakat L.V.T.E'nin 20 µg/petri dozu **%6,28** ile zayıf mutajenik etki göstermiştir.

Aynı türün 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde 20 µg/petri dozu **%65,76** 100 µg/petri dozu, 80 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozu sırasıyla **%35,26**, **%32,36** ve

**%25,72**'lik yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. 40 µg/petri'lik dozu ise **%17,01** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

Tezde kullanılan bir diğer liken türlerinden olan *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. türünün total ekstraları ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. total ekstresinin (P.S.T.E) 80 µg/petri'lik dozu en yüksek seviyede **%43,52** ile antimutajenik etki göstermiştir. P.S.T.E'nin 100 µg/petri, 60 µg/petri ve 20 µg/petri'lik dozları da sırasıyla **%39,70**, **32,06** ve **27,81** ile yine yüksek seviyede antimutajenik etki göstermiştir. Aynı türün 40 µg/petri'lik dozu ise **%11,91** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

P.S.T.E'nin Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde P.S.T.E'nin 20 µg/petri dozu diğer dozlara nazan en yüksek antimutajenik etki göstermekle beraber **%24,52** ile antimutajenik etkisi orta düzeydedir. Yine P.S.T.E'nin 100 µg/petri, 80 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozlarının antimutajenik etkisi orta düzeyde olmakla beraber sırasıyla etki yüzdeleri **%24,05**, **%16,82** ve **%16,66** olarak göstermiştir. Bu liken türünün *S. typhimurium* TA1535 suşu üzerine en düşük seviyede zayıf antimutajenik etki gösteren dozu **%9,43** ile 40 µg/petri'lik doz olmuştur.

Ayrıca 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde P.S.T.E'nin 100 µg/petri dozu **%22,82** ile en yüksek etki göstermesine rağmen bu dozun antimutajenik etkisi orta düzeyde olmuştur. Bununla beraber 80 µg/petri, 60 µg/petri ve 40 µg/petri'lik dozların etkisi **%22,19**, **%15,97** ve **%11,82** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. Son olarak, 20 µg/petri'lik dozun antimutajenik etkisi **%8,50** ile zayıf etki göstermiştir.

Tez çalışmasında kullanılan diğer liken türü *Parmelia sulcata* Taylor'nın total ekstresi (P.S.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine P.S.T.E'nin

100 µg/petri'lik dozu ve 80 µg/petri'lik dozu en yüksek antimutajenik inhibisyon göstermiş olup antimutajenite yüzdeleri **%32,48** ve **%25,90** olarak görülmüştür. 60 µg/petri'lik dozun **%22,29** ile orta düzeyde antimutajenik özellik göstermiştir. 40 µg/petri ve 20 µg/petri'lik dozlar ise **%13,16** ve **%16,99**'luk zayıf düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

*Parmelia sulcata* Taylor'nın total ekstresi (P.S.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde P.S.T.E'nin 100 µg/petri'lik dozu **%40,25**'lik etki düzeyi ile yüksek düzeyde antimutajenik özellik göstermiştir. 80 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozlar ise **%28,30** ve **%26,10**'luk antimutajenik etki göstermiştir. Diğer dozlar dan 40 µg/petri ve 20 µg/petri'lik dozların **%16,03** ve **%9,11**'lik zayıf düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

*Parmelia sulcata* Taylor'nın total ekstresi (P.S.T.E) 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde P.S.T.E'nin 100 µg/petri, 60 µg/petri ve 20 µg/petri'lik dozları **%36,51** ve **%32,36** oranında yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. Burada 60 µg/petri ve 20 µg/petri'lik dozların aynı düzeyde etki yüzdesini gösterdiği görülmüştür (Tablo 4.4). 40 µg/petri dozu da **%26,97** ile yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. Son olarak 80 µg/petri dozu ise **%23,85** oranında orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

*Ramalina farinacea* (L.) Ach. liken türünün total ekstresi (R.F.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine R.F.T.E'nin 60 µg/petri dozu **%39,92** ile en yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. Bununla beraber 40 µg/petri ve 20 µg/petri'lik dozlar da **%35,46** ve **%34,61** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etki göstermiştir. 80 µg/petri ve 100 µg/petri'lik dozlar ise **%24,48** ve **%24,84** ile orta düzeyde antimutajenik inhibisyon etki göstermiştir.

*Ramalina farinacea* (L.) Ach. liken türünün total ekstresi (R.F.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde R.F.T.E'nin 20 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozlar **%35,84** ve **%35,22** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon göstermiştir. Ayrıca 40 µg/petri, 80 µg/petri ve 100 µg/petri'lik dozlar da sırasıyla **%30,18**, **%33,64** ve **%32,38** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etki göstermiştir.

*Ramalina farinacea* (L.) Ach. liken türünün total ekstresi (R.F.T.E) 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde R.F.T.E'nin 100 µg/petri dozu **%25,72** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon göstermiştir. 80 µg/petri dozu ise **%18,67** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. R.F.T.E'nin 60 µg/petri dozu ise **%0,41** ile neredeyse hiç antimutajenik inhibisyon göstermemiştir. Fakat 80 µg/petri ve 100 µg/petri'lik dozlar sırasıyla %5,80 ve %12,86 ile zayıf mutajenik etki göstermiştir.

*Usnea articulata* (L.) Hoffm. liken türünün total ekstresi (U.A.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine U.A.T.E'nin 100 µg/petri dozu en yüksek düzeyde **%41,40** ile antimutajenik etki göstermiştir. 80 µg/petri, 60 µg/petri ve 40 µg/petri'lik dozlar da sırasıyla **%39,92**, **%35,03** ve **%26,40** ile yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. Son olarak 20 µg/petri dozu ise **%13,38** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

*Usnea articulata* (L.) Hoffm. liken türünün total ekstresi (U.A.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde U.A.T.E'nin 100 µg/petri dozu en yüksek düzeyde **%63,65** ile antimutajenik etki göstermiştir. 20 µg/petri, 40 µg/petri, 60 µg/petri ve son olarak 80 µg/petri'lik dozlarda sırasıyla **%38,05**, **%36,16**, **%34,27** ve son olarak **%27,67** ile yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

*Usnea articulata* (L.) Hoffm. liken türünün total ekstresi (U.A.T.E) ) ile 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde U.A.T.E'nin 100 µg/petri dozu **%45,64** ile yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. 80 µg/petri dozu **%22,82** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. 60 µg/petri dozu ise **%3,31** ile zayıf etki göstermiştir. Fakat U.A.T.E'nin 40 µg/petri'lik dozu %6,63 ile zayıf mutajenik etki göstermekle beraber 20 µg/petri'lik dozu ise %17,84 ile orta düzeyde mutajenik etki göstermiştir.

Tezde kullanılan diğer bir *Usnea* cinsine ait olan *Usnea filipendula* Stirt. liken türünün total ekstresi (U.F.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine U.F.T.E'nin 100 µg/petri dozu en yüksek düzeyde **%37,15** ile antimutajenik etki göstermiştir. 80 µg/petri, 60 µg/petri ve 40 µg/petri'lik dozlar sırasıyla **%36,31**, **%31,85** ve **%25,27** ile yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

*Usnea filipendula* Stirt. liken türünün total ekstresi (U.F.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde U.F.T.E'nin 80 µg/petri dozu en yüksek düzeyde **%55,34** ile antimutajenik etki göstermiştir. 20 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozlar ise **%30,81** ve **%27,04** ile yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. 100 µg/petri dozu ise **%23,58** ile 40 µg/petri dozu ise **%18,23** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.

*Usnea filipendula* Stirt. liken türünün total ekstresi (U.F.T.E) ile 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde U.F.T.E'nin 100 µg/petri dozu **%58,09** ile en yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. Yine 80 µg/petri dozu **%33,19** ile yüksek düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. 60 µg/petri dozu ise 40 µg/petri'lik dozla beraber sırasıyla **%22,40** ve **%19,50** ile orta düzeyde antimutajenik etki göstermiştir. 20 µg/petri dozu ise **%5,39** ile zayıf düzeyde antimutajenik etki göstermiştir.



*Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai liken türüne ait total ekstresi (V.P.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine V.P.T.E'nin 20 µg/petri dozu **%60,08** ile en yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. 100 µg/petri dozu ise yine **%51,59** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. V.P.T.E'nin 40 µg/petri ve 60 µg/petri'lik dozları da **%49,89** ve **%49,45** ile yine yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. Son olarak V.P.T.E'nin 80 µg/petri dozu **%36,73** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir.

*Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai liken türüne ait total ekstresi (V.P.T.E) ile yapılan antimutajenite çalışmalarında Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde V.P.T.E'nin 20 µg/petri dozu **%49,68** ile en yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. 40 µg/petri dozu **%48,42** ile yine yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. 100 µg/petri dozu da **%43,71** ile yine yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. 60 µg/petri dozu **%38,99** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. Son olarak 80 µg/petri dozu da **%36,47** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir.

*Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai liken türüne ait total ekstresi (V.P.T.E) ile 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimutajenite deneylerinde U.F.T.E'nin 100 µg/petri dozu **%56,43** ile en yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. 80 µg/petri dozu da **%51,86** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. 60 µg/petri ve 40 µg/petri'lik dozlarda sırasıyla yine **%43,98** ve **%31,53** ile yüksek düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir. Son olarak U.F.T.E'nin 20 µg/petri dozu **%20,33** ile orta düzeyde antimutajenik inhibisyon etkisi göstermiştir.

Tezde kullanılan ve son liken türü olan *Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr. liken türünün total ekstresi (X.C.T.E) ile yapılan antimitajenite çalışmalarında *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine X.C.T.E'nin 100 µg/petri dozu **%49,04** ile en yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. 40 µg/petri doz ise **%48,62** ile yine yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. 20 µg/petri dozu da **%47,35** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. 80 µg/petri doz da **%46,92** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. Bu türün en düşük etki göstermesine rağmen 60 µg/petri'lik dozu da **%44,80** ile düzeyde antimitajenik etki göstermiştir.

*Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr. liken türünün total ekstresi (X.C.T.E) ile yapılan antimitajenite çalışmalarında Sodyum azid (1 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1535 suşu kullanılarak yapılan antimitajenite deneylerinde X.C.T.E'nin 100 µg/petri dozu **%55,03** ile en yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. Yine X.C.T.E'nin 80 µg/petri dozu **%40,25** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. 20 µg/petri dozu ise **%37,42** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. 60 µg/petri dozu **%36,47** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. Son olarak 40 µg/petri dozu da **%26,41** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir.

*Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr. liken türünün total ekstresi (X.C.T.E) ile 9-Aminoakridin (40 µg/petri) ile mutasyona uğratılan *S. typhimurium* TA1537 suşu kullanılarak yapılan antimitajenite deneylerinde 40 µg/petri dozu **%54,35** ile en yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. 100 µg/petri dozu da **%48,96** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. X.C.T.E'nin 20 µg/petri dozu da **%48,13** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. X.C.T.E'nin 80 µg/petri dozu da **%40,24** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir. Son olarak X.C.T.E'nin 60 µg/petri dozu da **%31,95** ile yüksek düzeyde antimitajenik etki göstermiştir.

Likenlere ait total ekstrelerin Tablo 4.4'e göre verilen sonuçlara bakıldığında bu türler içerisinde en yüksek antimitajenik özelliğin *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson &

M.J.Lai ve *Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr. türlerine ait oldukları belirlenmiştir. Yine diğer türlere bakıldığında *Usnea* cinsine ait türler ile *Dermatocarpon miniatum* Eschw., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale ve *Letharia vulpina* (L.) Hue türlerinin de yüksek düzeyde antimutajenik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Tezde kullanılan liken türlerinden zayıf antimutajenik etkiye sahip olanlar ise tamamen zayıf antimutajenik özellikte olmadıkları çalışılan bakteri suşuna göre değişik antimutajenik etkisine sahip oldukları belirlenmiştir.

**Çizelge 4.3.** Ames-*Salmonelle typhimurium* (TA 1535, TA1537) ve *E. Coli* WP2uvrA test sonuçları

Test materyali	Konsantrasyon (µg/plate)	<i>E. coli</i> WP2uvrA		<i>S. typhimurium</i> TA1535		<i>S. typhimurium</i> TA1537	
		Ort. ± S.H.	%Mut.	Ort. ± S.H.	%Mut.	Ort. ± S.H.	%Mut.
MNNG**	1	235,50±3,97					
NaN <sub>3</sub> **	1			318,00±7,92			
9-AA**	40					241,00±4,49	
DMSO**	100	25,00±0,57		6,50±0,76		4,50±0,42	
<i>D. miniatum</i>	20	141,00±3,40	<b>40,13</b>	285,00±4,40	10,37	100,00±5,11	<b>58,50</b>
	40	143,50±4,84	<b>39,07</b>	300,50±1,77	5,66	200,50±6,10	16,80
	60	160,00±4,69	<b>32,06</b>	334,50±4,97	-5,18	176,50±7,86	26,76
	80	158,00±5,15	<b>32,91</b>	274,50±5,20	13,67	147,00±11,58	<b>43,98</b>
	100	136,00±2,47	<b>42,25</b>	319,50±5,50	2,35	115,00±5,25	<b>52,28</b>
<i>F. caperata</i>	20	139,00±3,22	<b>40,98</b>	334,00±14,99	-5,03	130,50±13,54	<b>45,85</b>
	40	158,00±6,62	<b>32,91</b>	362,00 ±3,65	-13,83	123,50±8,02	<b>48,75</b>
	60	178,50±2,66	24,42	291,00 ±5,66	8,49	172,00±10,37	<b>50,86</b>
	80	166,50±5,74	<b>29,51</b>	267,50 ±7,35	15,88	102,00±6,11	<b>57,67</b>
	100	139,00±8,08	<b>40,98</b>	263,50 ±3,09	17,13	90,00±4,64	<b>62,65</b>
<i>L. vulpina</i>	20	207,50±3,76	11,89	338,00±6,85	-6,28	82,50±5,07	<b>65,76</b>
	40	200,00±8,88	15,07	276,50±3,60	13,05	200,00±7,78	17,01
	60	189,00±5,92	19,75	250,00±13,95	21,38	179,00±4,53	<b>25,72</b>
	80	167,00±7,55	<b>29,09</b>	253,00±5,99	20,44	163,00±10,60	<b>32,36</b>
	100	157,00±5,58	<b>33,33</b>	213,50±4,40	<b>32,86</b>	156,00±6,96	<b>35,26</b>
<i>P. saxatilis</i>	20	170,00±5,11	<b>27,81</b>	240,00±6,88	24,52	220,50±5,05	8,50
	40	207,00±8,01	11,91	288,00±2,97	9,43	212,50±4,86	11,82
	60	160,00±4,13	<b>32,06</b>	265,00±6,39	16,66	202,50±2,32	15,97
	80	133,00±2,93	<b>43,52</b>	264,50±2,94	16,82	187,50±4,97	22,19
	100	142,00±3,07	<b>39,70</b>	241,50±2,41	24,05	186,00±5,93	22,82
<i>P. sulcata</i>	20	195,50±7,88	16,99	289,00±6,34	9,11	163,00±5,37	<b>32,36</b>
	40	204,50±4,31	13,16	267,00±8,09	16,03	176,00±7,61	<b>26,97</b>
	60	183,00±4,08	22,29	235,00±5,49	<b>26,10</b>	163,00±7,26	<b>32,36</b>
	80	174,50±4,69	<b>25,90</b>	228,00±5,42	<b>28,30</b>	183,50±5,51	23,85
	100	159,00±11,01	<b>32,48</b>	190,00±6,49	<b>40,25</b>	153,00±7,53	<b>36,51</b>

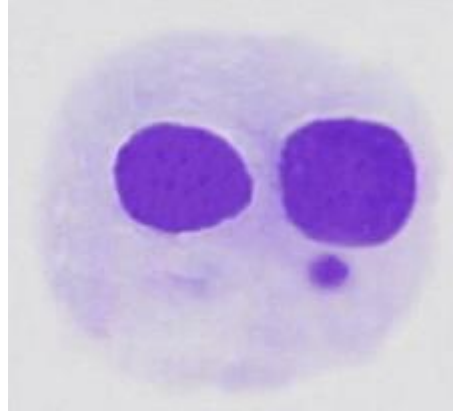
Çizelge 4.3 (devam)

	20	154,00±6,83	<b>34,61</b>	204,00±7,47	<b>35,84</b>	272,00±3,86	-12,86
	40	152,00±5,34	<b>35,46</b>	222,00±4,83	<b>30,18</b>	255,00±7,24	-5,80
	60	141,50±3,72	<b>39,92</b>	206,00±5,25	<b>35,22</b>	240,00±5,85	0,41
<i>R. farinacea</i>	80	175,50±7,32	24,48	211,00±6,30	<b>33,64</b>	196,00±4,01	18,67
	100	177,00±7,39	24,84	215,00±9,11	<b>32,38</b>	179,00±4,76	<b>25,72</b>
	20	204,00±1,91	13,38	197,00±4,87	<b>38,05</b>	284,00±7,09	-17,84
	40	173,33±9,35	<b>26,40</b>	203,00±5,62	<b>36,16</b>	257,00±10,15	-6,63
	60	153,00±7,40	<b>35,03</b>	209,00±7,65	<b>34,27</b>	233,00±5,80	3,31
<i>U. articulata</i>	80	141,50±1,56	<b>39,92</b>	230,00±4,68	<b>27,67</b>	186,00±5,85	22,82
	100	138,00±5,42	<b>41,40</b>	116,00±4,31	<b>63,52</b>	131,00±5,69	<b>45,64</b>
	20	182,66±8,92	22,27	220,00±6,49	<b>30,81</b>	228,00±7,51	5,39
	40	176,00±8,71	<b>25,27</b>	260,00±4,74	18,23	194,00±3,18	19,50
<i>U. filipendula</i>	60	160,50±10,52	<b>31,85</b>	232,00±5,57	<b>27,04</b>	187,00±7,03	22,40
	80	150,00±4,08	<b>36,31</b>	142,00±6,77	<b>55,34</b>	161,00±6,35	<b>33,19</b>
	100	148,00±5,73	<b>37,15</b>	243,00±8,06	23,58	101,00±2,12	<b>58,09</b>
	20	94,00±2,93	<b>60,08</b>	160,00±6,46	<b>49,68</b>	192,00±3,72	20,33
	40	118,00±3,54	<b>49,89</b>	164,00±6,65	<b>48,42</b>	165,00±5,70	<b>31,53</b>
<i>V. pinastri</i>	60	119,00±3,67	<b>49,45</b>	194,00±2,28	<b>38,99</b>	135,00±5,26	<b>43,98</b>
	80	149,00±3,28	<b>36,73</b>	202,00±8,50	<b>36,47</b>	116,00±4,66	<b>51,86</b>
	100	114,00±2,86	<b>51,59</b>	179,00±6,30	<b>43,71</b>	105,00±2,62	<b>56,43</b>
	20	124,00±5,87	<b>47,35</b>	199,00±3,05	<b>37,42</b>	125,00±5,40	<b>48,13</b>
	40	121,00±3,38	<b>48,62</b>	234,00±8,02	<b>26,41</b>	110,00±3,89	<b>54,35</b>
<i>X. parietina</i>	60	130,00±4,33	<b>44,80</b>	202,00±3,25	<b>36,47</b>	164,00±7,24	<b>31,95</b>
	80	125,00±4,22	<b>46,92</b>	190,00±4,87	<b>40,25</b>	144,00±5,01	<b>40,24</b>
	100	120,00±3,27	<b>49,04</b>	143,00±5,10	<b>55,03</b>	123,00±5,40	<b>48,96</b>

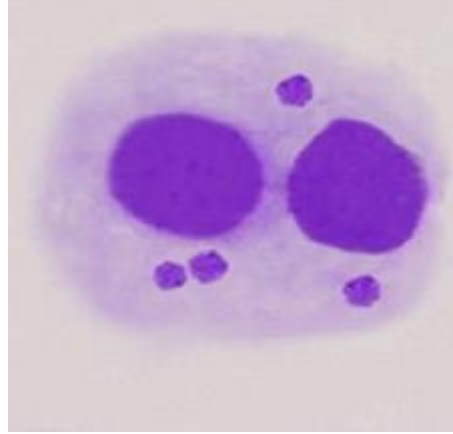
#### 4.5. MN Bulguları

Deney gruplarının her biri için ortalama MN frekansları hesaplanmış, donörlere ait MN frekansları üzerine AFB<sub>1</sub> (5µM), liken total ekstraktı (10µM), ve AFB<sub>1</sub> ile beraber *Dermatocarpon miniatum* Eschw., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Letharia vulpina* (L.) Hue, *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Parmelia sulcata* Taylor, *Ramalina farinacea* (L.) Ach., *Usnea articulata* (L.) Hoffm., *Usnea filipendula* Stirt., *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai ve *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. liken türlerinden elde edilen total ekstraktı uygulanarak Çizelge 4.1- 4.10'da sunulmuştur.

Donör kanlarından elde ettiğimiz bazı MN görüntüleri aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.5.** Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre



**Şekil 4.6.** Sitokinezi bolke edilmiş dört mikronükleus bulunan hücre



**Şekil 4.7.** Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre.

AFB<sub>1</sub>'in 5 µM'lık dozu çalışılan tüm liken gruplarında insan kanı kültürlerine verildiğinde MN frekansını artmış (5,77±1,12) ve bu değer istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Liken gruplarında kan kültürlerine verilen AFB<sub>1</sub>'in değerinin gruplarda farklı çıkması kullanılan donörlerin farklı kişiler olmasıyla ve farklı günlerde çalışılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Sadece D.M.T.E'in 10 µg/ml'lik dozu verildiğinde MN sayısı kontrol grubuna nazaran bir miktar artmış olsada bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. AFB<sub>1</sub> ile beraber D.M.T.E'in 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lık dozları verildiğinde MN frekansları karşılaştırılmış sırası ile 4,87±0,15, 4,35±0,15, 3,85±0,15 olarak bulunmuştur. Bu değerler bakıldığında D.M.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in MN'yi arttırıcı etkisini engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, D.M.T.E'in 20µg/ml dozunun istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ve D.M.T.E'in 5µg/ml'lık uygulamasının ise en az ekiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** *Dermatocarpon miniatum* Eschw. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).

	<b>Binükleus Sayısı</b>	<b>MN Sayısı</b>	<b>MN/Hücre</b>
<b>Kontrol</b>	1012	35	3,45±0,13 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	1005	58	5,77±1,12 <sup>e</sup>
<b><i>Dermatocarpon miniatum</i> (10 µg/ml)</b>	1006	39	3,87±0,12 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+D.M.T.E (5 µg/ml)</b>	1005	49	4,87±0,15 <sup>d</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+D.M.T.E (10 µg/ml)</b>	1010	44	4,35±0,15 <sup>c</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+D.M.T.E (20 µg/ml)</b>	1009	39	3,85±0,15 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrole göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ D.M.T.E (20 µg/ml ) Kontrole göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ D.M.T.E (5 µg/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ D.M.T.E (10 µg/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5 µg/ml )'a göre

Kullanılan diğ er bir tür olan F.C.T.E'in 10 µg/ml'lik dozu kan kültürlerine uyguland ığında MN sayısında bir miktar artış olmakla beraber bu artma istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. Daha sonra sırasıyla AFB<sub>1</sub> ile beraber F.C.T.E'in 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları verilerek MN frekansları karşılaştırılmış olup değerler 5,63±0,15, 4,63±0,18, 3,95±0,15 olarak bulunmuştur. Bu değerler ile F.C.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisinden dolayı neden olduğu MN frekansındaki arttırıcı etkisinin engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, F.C.T.E'in 20 µg/ml dozunun istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ve F.C.T.E'in 5µg/ml'lik uygulamasının ise en az ekiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale total ekstraktı uyguland ığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).

	Binükleus Sayısı	MN Sayısı	MN/Hücre
<b>Kontrol</b>	1018	37	3,63±0,21 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	1011	62	6,13±1,42 <sup>e</sup>
<b><i>Flavoparmelia caperata</i> (10 µg/ml)</b>	1014	42	4,14±0,18 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+F.C.T.E (5 µg/ml)</b>	1011	57	5,63±0,15 <sup>d</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+F.C.T.E (10 µg/ml)</b>	1013	47	4,63±0,18 <sup>c</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+F.C.T.E (20 µg/ml)</b>	1011	40	3,95±0,15 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrole göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ F.C.T.E (20 µg/ml ) Kontrole göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ F.C.T.E (5 µg/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ F.C.T.E (10 µg/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5 µg/ml )'a göre

Çalışmada kullanılan diğ er bir liken türü olan *Letharia vulpaina*'dan elde edilen total ekstrenin 10 µg/ml'lik dozu tek olarak deney ortamına verildiğinde MN frekansında artışa neden olsa da bu durum istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. Kan kültürlerine AFB<sub>1</sub> ile beraber L.V.T.E'in önce 5 µg/ml, 10 µg/ml ve son olarak ta 20 µg/ml'lik dozları verildiğinde MN frekansları sırası ile 6,40±0,19, 5,42±0,19, 4,83±0,19 olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler neticesinde insan lenfosit kültürlerinde

L.V.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in MN'yi arttırıcı mutajenik etkisinin engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı mutajenik etkisini engellemesi açısından kullanılan doz sonuçları değerlendirildiğinde, L.V.T.E'in 20 µg/ml dozunun istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ve L.V.T.E'in 5µg/ml'lik uygulamasının ise en az ekiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** *Letharia vulpina* (L.) Hue total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).

	Binükleus sayısı	MN Sayısı	MN/Hücre
<b>Kontrol</b>	1012	48	4,74±0,19 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	1011	73	7,22±0,52 <sup>ef</sup>
<b><i>Letharia vulpina</i> (10 µg/ml)</b>	1013	49	4,83±0,19 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+L.V.T.E (5 µg/ml)</b>	1015	65	6,40±0,19 <sup>de</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+L.V.T.E (10 µg/ml)</b>	1014	55	5,42±0,19 <sup>cd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+L.V.T.E (20 µg/ml)</b>	1014	49	4,83±0,19 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrolle göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ L.V.T.E (20 µg/ml ) Kontrolle göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ L.V.T.E (5 µg/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ L.V.T.E (10 µg/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5 µg/ml )'a göre

AFB<sub>1</sub>'in 5 µM'lık dozu insan periferal kan kültürlerine verildiğinde MN frekansı AFB<sub>1</sub>'e bağlı olarak artmış (5,18±1,02) ve bu değer istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Periferal kan kültürlerine yalnızca P.S.T.E'in 10 µg/ml'lik dozu verildiğinde MN sayısındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. AFB<sub>1</sub> ile beraber kültüre P.S.T.E'in 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları verildiğinde MN frekansları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma neticesinde P.S.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisinden kaynaklanan MN frekansındaki artış P.S.T.E'sinin koruyucu etkisi neticesinde engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, P.S.T.E'in 20 µg/ml dozunun



5µg/ml'lık doza nazaran daha etkili olduğu ve istatistiksel olarak daha anlamlı sonuç verdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları (±SE).

	Binükleus Sayısı	MN Sayısı	MN/Hücre
<b>Kontrol</b>	1004	33	3,28±0,32 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	1002	52	5,18±1,02 <sup>ef</sup>
<b><i>Parmelia saxatilis</i> (10 µg/ml)</b>	1004	35	3,48±0,38 <sup>bc</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+P.S.T.E (5 µg/ml)</b>	1008	49	4,86±0,35 <sup>de</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+ P.S.T.E (10 µg/ml)</b>	1007	42	4,17±0,38 <sup>cd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5µM)+ P.S.T.E (20 µg/ml)</b>	1007	34	3,37±0,35 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrole göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ P.S.T.E (20 µg/ml ) Kontrole göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ P.S.T.E (5 µg/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ P.S.T.E (10 µg/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5 µg/ml )'a göre

Mutajenik etkisi olan AFB<sub>1</sub> bu çalışma grubunda da MN frekansını istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır. Bununla beraber uygulanan P.S.T.E'in 10 µg/ml'lik dozu verildiğinde MN frekansındaki değişiklik istatistiksel açıdan anlamlı bir fark oluşmamıştır. AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'in 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları verildiğinde MN frekansları karşılaştırılmış sırası ile 5,90±0,25, 5,22±0,28, 4,63±0,25 olarak bulunan bu değerler kendi aralarında değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Bu değerler ile P.S.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisinin kullanılan P.S.T.E sayesinde engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in insan lenfositleri üzerinde neden olduğu MN frekansındaki artış bakımından dozların etkisi karşılaştırıldığında, P.S.T.E'in 20 µg/ml dozunun etkisinin P.S.T.E'in 5µg/ml'lik dozuna kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı bir fark oluşturduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı düşük dozun en az ekiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8.** *Parmelia sulcata* Taylor total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları ( $\pm$ SE).

	<b>Binükleus Sayısı</b>	<b>MN Sayısı</b>	<b>MN/Hücre</b>
<b>Kontrol</b>	1011	41	4,05 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 <math>\mu</math>M)</b>	1010	66	6,53 $\pm$ 0,42 <sup>ef</sup>
<b><i>Parmelia sulcata</i> (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1014	44	4,33 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+P.S.T.E (5 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1016	60	5,90 $\pm$ 0,25 <sup>e</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+ P.S.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1014	53	5,22 $\pm$ 0,28 <sup>d</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+ P.S.T.E (20 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1014	47	4,63 $\pm$ 0,25 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrole göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ P.S.T.E (10  $\mu$ g/ml )Kontrole göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ P.S.T.E (5  $\mu$ g/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ P.S.T.E (10  $\mu$ g/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ml )'a göre

R.F.T.E'in 10  $\mu$ g/ml'lik dozu kan kültürlerine verildiğinde MN sayısında bir miktar artma olmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır. AFB<sub>1</sub> ile beraber kan kültürlerine R.F.T.E'in üç farklı dozu (5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml) verildiğinde MN frekansları 6,06 $\pm$ 0,18, 5,17 $\pm$ 0,18, 4,58 $\pm$ 0,18 olarak bulunmuştur. Bu değerler AFB<sub>1</sub> ile karşılaştırıldığında R.F.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisini engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını artırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, R.F.T.E'in 20  $\mu$ g/ml dozunun istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** *Ramalina farinacea* (L.) Ach. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları ( $\pm$ SE).

	Binükleus Sayısı	MN Sayısı	MN/Hücre
<b>Kontrol</b>	1002	42	4,19 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 <math>\mu</math>M)</b>	1001	68	6,79 $\pm$ 0,72 <sup>ef</sup>
<b><i>Ramalina farinacea</i> (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1003	43	4,29 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+R.F.T.E (5 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1005	61	6,06 $\pm$ 0,18 <sup>de</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+R.F.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1004	52	5,17 $\pm$ 0,18 <sup>cd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+R.F.T.E (20 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1004	46	4,58 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrolle göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ R.F.T.E (20  $\mu$ g/ml )Kontrolle göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ R.F.T.E (5  $\mu$ g/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ R.F.T.E (10  $\mu$ g/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ml )'a göre

Tez çalışmasında kullanılan diğer bir tür olan *Usnea articulata*'nın 10  $\mu$ g/ml'lik dozu tek olarak insan kan kültürüne verildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bunun yanı sıra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.A.T.E'in 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml'lik dozları verildiğinde MN frekansları sırası ile 6,33 $\pm$ 0,22, 5,44 $\pm$ 0,21, 4,75 $\pm$ 0,21 olarak bulunmuştur. Bu değerler kendi aralarında karşılaştırıldığında U.A.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in MN'yi arttırıcı etkisinin engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, U.A.T.E'in 20  $\mu$ g/ml dozunun istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ve U.A.T.E'in 5 $\mu$ g/ml'lik uygulamasının ise en az ekiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

**Çizelge 4.10.** *Usnea articulata* (L.) Hoffm. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları ( $\pm$ SE).

	<b>Binükleus Sayısı</b>	<b>MN Sayısı</b>	<b>MN/Hücre</b>
<b>Kontrol</b>	1007	45	4,69 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 <math>\mu</math>M)</b>	1005	72	7,16 $\pm$ 0,59 <sup>e</sup>
<b><i>Usnea articulata</i> (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1011	48	4,74 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+U.A.T.E (5 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1010	64	6,33 $\pm$ 0,22 <sup>d</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+U.A.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1011	55	5,44 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+U.A.T.E (20 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1010	48	4,75 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrole göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ U.A.T.E (20  $\mu$ g/ml )Kontrole göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ U.A.T.E (5  $\mu$ g/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ U.A.T.E (10  $\mu$ g/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ml )'a göre

AFB<sub>1</sub> insan periferel kan kültürüne verildiğinde mutajenik etki göstermiş ve bundan dolayı da MN sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (p<0,05). Fakat yalnız U.F.T.E'in 10  $\mu$ g/ml'lik dozu kültüre verildiğinde MN sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Periferel kan kültürlerine AFB<sub>1</sub> ile beraber U.F.T.E'in üç farklı konsantrasyonu verildiğinde ise MN frekansları sayısal olarak sırasıyla 5,95 $\pm$ 0,26, 5,05 $\pm$ 0,21, 4,28 $\pm$ 0,22 olarak bulunmuştur. U.F.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisine karşı antimutajenik etki gösterdiği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, U.F.T.E'in 20  $\mu$ g/ml dozunun istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ve U.F.T.E'in 5 $\mu$ g/ml'lik uygulamasının ise en az etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

**Çizelge 4.11.** *Usnea filipendula* Stirt. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları ( $\pm$ SE).

	<b>Binükleus Sayısı</b>	<b>MN Sayısı</b>	<b>MN/Hücre</b>
<b>Kontrol</b>	1004	41	4,09 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 <math>\mu</math>M)</b>	1001	69	6,89 $\pm$ 0,52 <sup>d</sup>
<b><i>Usnea filipendula</i> (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1006	43	4,27 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+U.F.T.E (5 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1008	60	5,95 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+U.F.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1009	51	5,05 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+U.F.T.E (20 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1005	43	4,28 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrolle göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ U.F.T.E (20  $\mu$ g/ml )Kontrolle göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ U.F.T.E (5  $\mu$ g/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ U.F.T.E (10  $\mu$ g/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ml )'a göre

Kan kültürüne V.P.T.E'in 10  $\mu$ g/ml'lik dozu tek olarak verildiğinde MN sayısında bir miktar artma olmakla beraber bu durum istatikselsel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. Kan kültürlerine AFB<sub>1</sub> ile beraber V.P.T.E'in 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml'lik dozları verildiğinde MN frekanslarındaki değişiklikler 5,82 $\pm$ 0,20, 4,93 $\pm$ 0,20, 4,33 $\pm$ 0,20 olarak bulunmuştur. Bu değerler incelendiğinde V.P.T.E'in mutajenik etki özelliği olan AFB<sub>1</sub>'in MN'yi arttırıcı etkisine ket vurduğu görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, V.P.T.E'in 20  $\mu$ g/ml dozunun antimutajenik etkisinin istatistiksel olarak V.P.T.E'in 5 $\mu$ g/ml'lik dozunun antimutajenik etkisinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).

**Çizelge 4.12.** *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları ( $\pm$ SE).

	<b>Binükleus sayısı</b>	<b>MN Sayısı</b>	<b>MN/Hücre</b>
<b>Kontrol</b>	1009	42	4,16 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 <math>\mu</math>M)</b>	1010	65	6,43 $\pm$ 0,42 <sup>ef</sup>
<b><i>Vulpicida pinastri</i> (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1011	44	4,35 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+V.P.T.E (5 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1013	59	5,82 $\pm$ 0,20 <sup>de</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+V.P.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1014	50	4,93 $\pm$ 0,20 <sup>cd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+V.P.T.E (20 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1014	44	4,33 $\pm$ 0,20 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>p<0,001 Kontrole göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ V.P.T.E (20  $\mu$ g/ml )Kontrole göre,

<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ V.P.T.E (5  $\mu$ g/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ V.P.T.E (10  $\mu$ g/ml )'a göre,

<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ml )'a göre

Tez çalışması kapsamında kullanılan son liken türü olan *Xanthoria parietina* liken türünden elde edilen total ekstrenin sadece kendisi (10  $\mu$ g/ml) insan periferik kan kültürüne verildiğinde mutajenik etki göstermemekle beraber MN sayısında bir miktar artmaya neden olmuş fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. AFB<sub>1</sub> ile beraber kan kültürlerine verilen X.P.T.E'in 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml'lik dozları karşılaştırılmış 5,22 $\pm$ 0,48, 4,44 $\pm$ 0,39, 4,03 $\pm$ 0,38 değerleri bulunmuştur. Bu değerler ile kendi aralarında karşılaştırma yapılarak X.P.T.E'in AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisine karşı antimutajenik etki göstererek MN'yi arttırıcı etkisini engellediği görülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, X.P.T.E'in 20  $\mu$ g/ml dozunun istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ve X.P.T.E'in 5 $\mu$ g/ml'lik uygulamasının ise en az ekiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13).

**Çizelge 4.13.** *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. total ekstraktı uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen MN Frekansları ( $\pm$ SE).

	Binükleus Sayısı	MN Sayısı	MN/Hücre
<b>Kontrol</b>	1018	39	3,83 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub> (5 <math>\mu</math>M)</b>	1009	59	5,85 $\pm$ 1,01 <sup>de</sup>
<b><i>Xanthoria parietina</i> (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1013	41	4,04 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+X.P.T.E (5 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1015	53	5,22 $\pm$ 0,48 <sup>cd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+X.P.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1012	45	4,44 $\pm$ 0,39 <sup>bc</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>(5<math>\mu</math>M)+X.P.T.E (20 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1015	41	4,03 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>

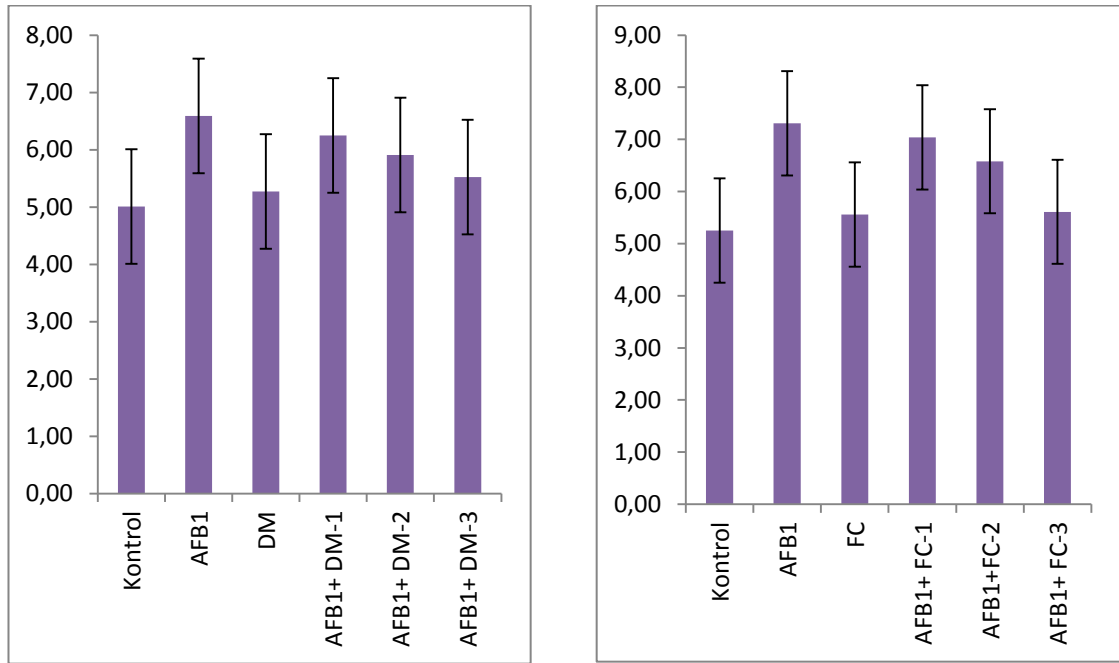
<sup>a</sup>p<0,001 Kontrolle göre,

<sup>b</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ X.P.T.E (20  $\mu$ g/ml )Kontrolle göre,

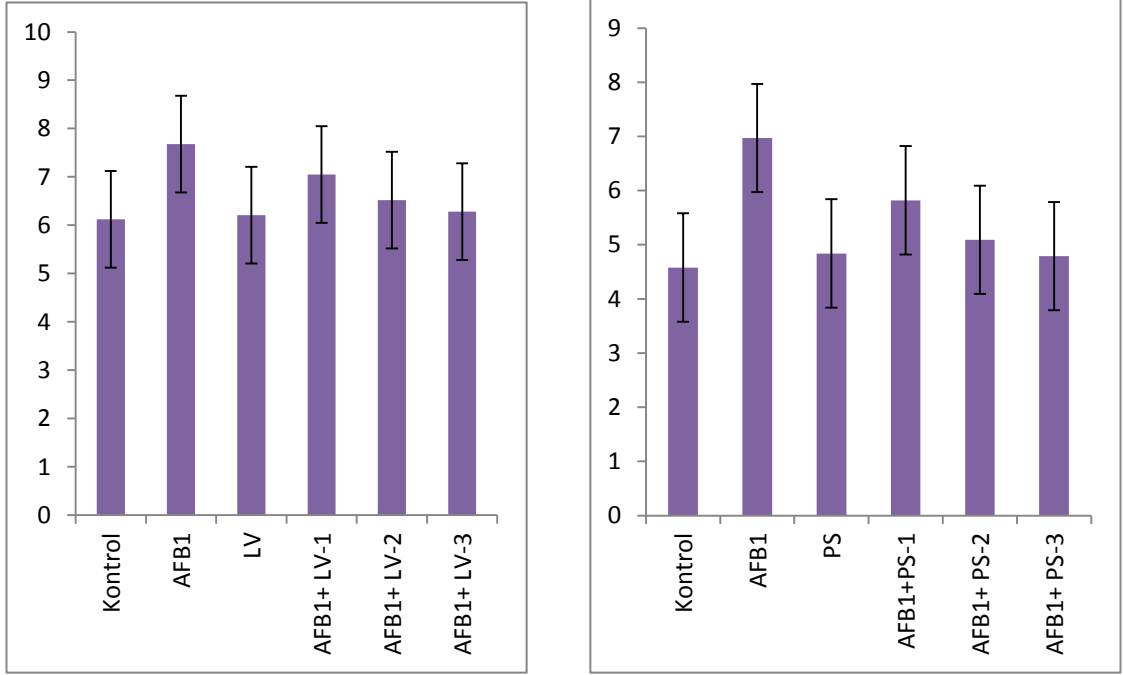
<sup>c</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ X.P.T.E (5  $\mu$ g/ml )'a göre

<sup>d</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub>+ X.P.T.E (10  $\mu$ g/ml )'a göre,

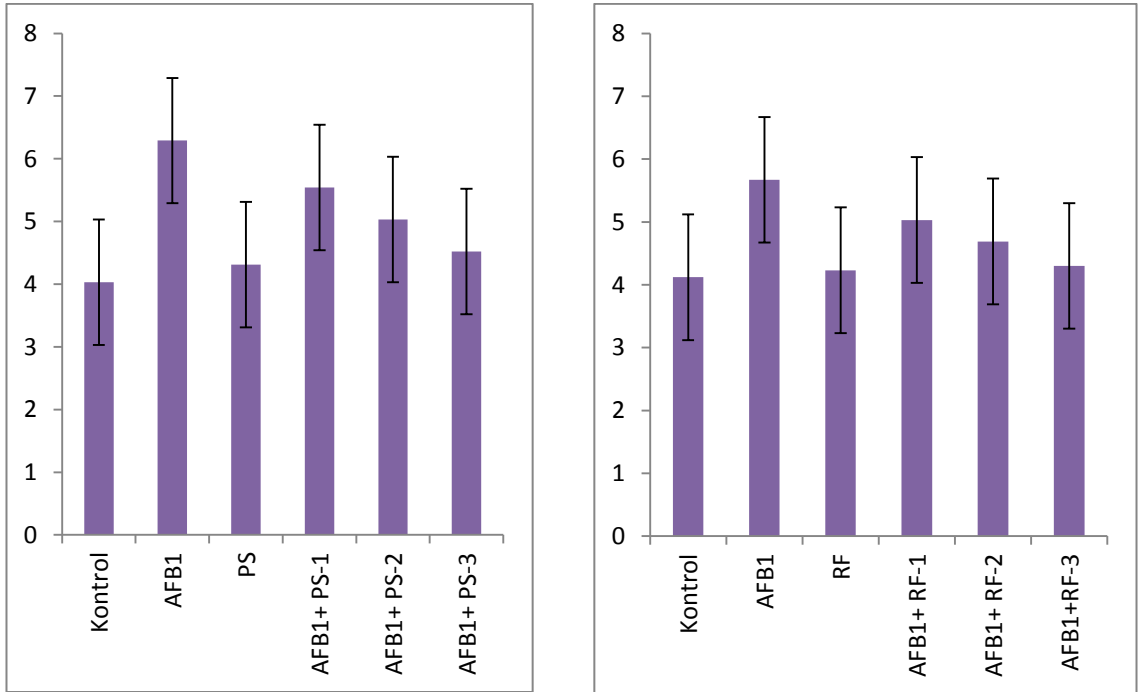
<sup>e</sup>p<0,05 AFB<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ml )'a göre



**Şekil 4.8.** DM ve FC'nın MN sonuçları

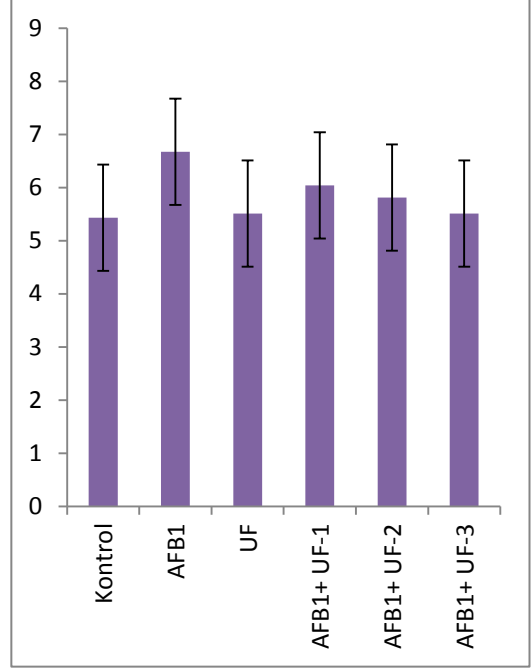
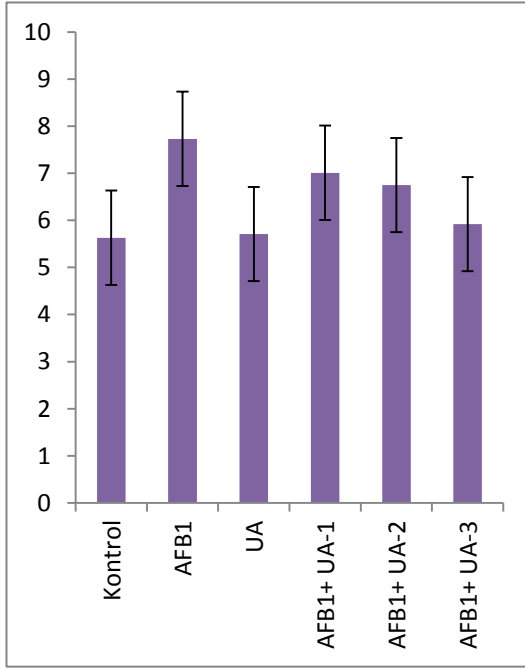


Şekil 4.9. LV ve PS'in MN sonuçları

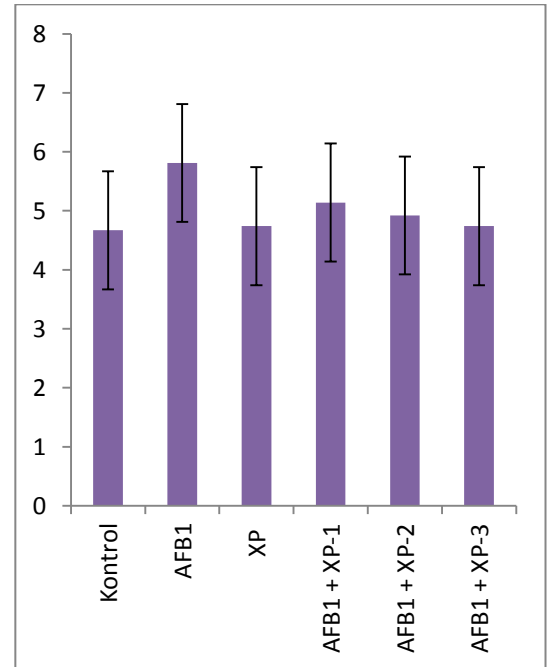
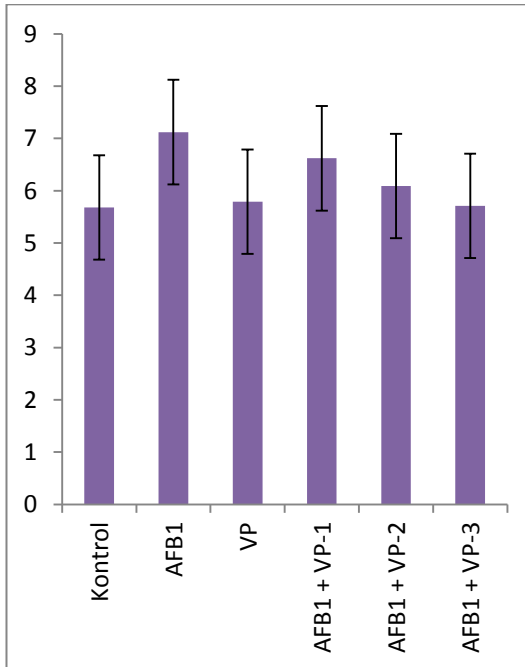


Şekil 4.10. PS ve RF'nın MN sonuçları





Şekil 4.11. UA ve UF'nın MN sonuçları



Şekil 4.12. VP ve XP'nın MN sonuçları

#### 4.6. SOD, GPx, GSH ve MDA Bulguları

Tez kapsamında yapılan enzimatik çalışmalarda, yalnızca AFB<sub>1</sub> verilen grup kontrol grubuna göre, bununla beraber AFB<sub>1</sub> ile birlikte verilen liken total ekstresinin üç farklı dozları da yalnız AFB<sub>1</sub> verilen grupla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yalnız AFB<sub>1</sub> verilen konsantrasyonun (5 µM) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemli derecede ( $p<0,001$ ) enzimlerin aktivitelerini (SOD, GPx ve GSH) azalttığı, buna karşın MDA seviyesini ise arttırdığı görülmüştür. Liken total ekstresinin uygulanmasından sonra enzim aktivitelerini (SOD, GPx ve GSH) arttırdığı, buna karşın MDA seviyesini ise azalttığı görülmüştür.

**Çizelge 4.14.** *Dermatocarpon miniatum* Eschw. biyokimyasal sonuçları

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	0.92±0.02	1.10±0.51	4.06±0.14	3,09±0.36
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	0.47±0.14 <sup>a</sup>	0.30±0.57 <sup>a</sup>	1.60±0.55 <sup>a</sup>	5,82±0.28 <sup>a</sup>
<b>D.M.T.E (10 µg/ml)</b>	0.76±0.14 <sup>b</sup>	0.97±1.22 <sup>ab</sup>	2.56±0.55 <sup>ab</sup>	4.75±1.19 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+D.M.T.E (5 µg/ml)</b>	0.60±0.07 <sup>abc</sup>	0.39±0.72 <sup>abc</sup>	2.56±0.54 <sup>ab</sup>	3.15±0.09 <sup>bc</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+D.M.T.E (10 µg/ml)</b>	0.61±0.25 <sup>abc</sup>	0.54±0.14 <sup>abcd</sup>	2.88±0.01 <sup>abc</sup>	3.01±0.10 <sup>bc</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+D.M.T.E (20 µg/ml)</b>	0.88±0.04 <sup>abcd</sup>	0.73±0.58 <sup>abcde</sup>	3.20±0.55 <sup>abcd</sup>	2.94±0.48 <sup>abcd</sup>

*Dermatocarpon miniatum* Eschw. likeninin total ekstresinin (D.M.T.E) enzimatik aktivitelerine bakıldığında sadece AFB<sub>1</sub> verildiğinde SOD ve GPx aktivitelerinin ve GSH seviyesinin istatistiksel olarak önemli derecede ( $p<0,001$ ) düştüğü, MDA seviyesinin ise istatistiksel olarak önemli derecede ( $p<0,001$ ) arttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda 0,92±0,02 olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,47±0,14'e düşmüştür. Sadece D.M.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi 0,76±0,14' çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber D.M.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi sırasıyla 0,60±0,07, 0,61±0,25 ve 0.88±0.04'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1,10±0,51 olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,30±0,57'ye düşmüştür. Sadece D.M.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi 0,97±1,22'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber D.M.T.E'nin üç farklı dozu (5

$\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  ve 20  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla  $0,39\pm 0,72$ ,  $0,54\pm 0,14$  ve  $0,73\pm 0,58$ 'e çıkmıştır. Kontrol grubunda  $4,06\pm 0,14$  olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra  $1,60\pm 0,55$ 'e düşmüştür. Sadece D.M.T.E'si (10  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise GSH seviyesi  $2,56\pm 0,55$ 'e çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber D.M.T.E'nin üç farklı dozu (5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  ve 20  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla  $2,56\pm 0,54$ ,  $2,88\pm 0,01$  ve  $3,20\pm 0,55$ 'e çıkmıştır. Kontrol grubunda  $3,09\pm 0,36$  olan MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra  $5,82\pm 0,28$ 'e çıkmıştır. Sadece D.M.T.E'si (10  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise MDA seviyesi  $4,75\pm 1,19$ 'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber D.M.T.E'nin üç farklı dozu (5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  ve 20  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla  $3,15\pm 0,09$ ,  $3,01\pm 0,10$  ve  $2,94\pm 0,48$ 'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.14)

**Çizelge 4.15.** *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale biyokimyasal sonuçları

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH ( $\mu\text{mol/L}$ )	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	$1.91\pm 0.15$	$0.86\pm 0.38$	$4.16\pm 0.55$	$1.81\pm 0.13$
<b>AFB1 (5 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	$1.36\pm 0.13^a$	$0.43\pm 0.58^a$	$0.96\pm 0.01^a$	$3.04\pm 0.98^a$
<b>F.C.T.E (10<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	$1.77\pm 0.77^{ab}$	$0.55\pm 0.50^{ab}$	$3.56\pm 0.54^{ab}$	$1.79\pm 0.73^b$
<b>AFB1+F.C.T.E (5 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	$1.47\pm 0.11^{abc}$	$0.57\pm 0.33^{ab}$	$1.28\pm 0.55^{ab}$	$2.77\pm 0.72^{abc}$
<b>AFB1+F.C.T.E (10 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	$1.79\pm 0.11^{ab}$	$0.57\pm 0.33^{ab}$	$2.43\pm 0.96^{abc}$	$2.51\pm 1.33^{abcd}$
<b>AFB1+F.C.T.E (20 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	$1.93\pm 0.16^{bcd}$	$0.57\pm 0.33^{ab}$	$3.96\pm 0.55^{bcd}$	$1.99\pm 0.11^{bde}$

*Flavoparmelia caperata* (L.) Hale likeninin total ekstresinin (F.C.T.E) enzimatik aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda  $1,91\pm 0,15$  olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra  $1,36\pm 0,13$ 'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber F.C.T.E'nin üç farklı dozu (5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  ve 20  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise SOD aktivitesi artmıştır. Kontrol grubunda  $0,86\pm 0,38$  olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra düşmüş sadece F.C.T.E'si (10  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise GPx aktivitesi çıkmıştır. AFB<sub>1</sub> ile beraber F.C.T.E'nin üç farklı konsantrasyondaki dozları (5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  ve 20  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde GPx aktivitesi sırasıyla  $0,57\pm 0,33$ ,  $0,57\pm 0,33$  ve  $0,57\pm 0,33$ 'e çıkmıştır. Kontrol grubunda GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra düşmüştür. Buna karşın F.C.T.E'si (10  $\mu\text{g/ml}$ ) verildiğinde ise GSH seviyesi artmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile

beraber F.C.T.E'nin 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 1,28±0,55, 2,43±0,96 ve 3,96±0,55'e çıkmıştır. Kontrol grubunda MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 3,04±0,98'e çıkmış, F.C.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi 1,79±0,73'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber F.C.T.E'nin 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 2,77±0,72, 2,51±1,33 ve 1,99±0,11'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.15).

**Çizelge 4.16.** *Letharia vulpina* (L.) Hue biyokimyasal sonuçları.

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.09±0.04	1.15±2.03	3.84±1.66	0.73±0.92
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	0.57±0.22 <sup>a</sup>	0.73±0.92 <sup>a</sup>	1.28±0.55 <sup>a</sup>	1.15±2.30 <sup>a</sup>
<b>L.V.T.E (10 µg/ml)</b>	0.88±0.03 <sup>ab</sup>	0.97±2.06 <sup>ab</sup>	3.20±0.55 <sup>ab</sup>	0.70±2.60 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+L.V.T.E (5 µg/ml)</b>	0.94±0.22 <sup>abc</sup>	0.86±2.30 <sup>abc</sup>	2.24±0.54 <sup>abc</sup>	0.98±0.70 <sup>abc</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+L.V.T.E (10 µg/ml)</b>	0.97±0.29 <sup>abc</sup>	1.02±2.38 <sup>abcd</sup>	3.20±0.56 <sup>abd</sup>	0.85±0.35 <sup>abcd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+L.V.T.E (20 µg/ml)</b>	1.04±0.15 <sup>bcd</sup>	1.10±1.18 <sup>abcde</sup>	3.80±0.54 <sup>bcde</sup>	0.79±0.34 <sup>bc</sup>

Tabloya bakıldığında kullanılan liken türü *Letharia vulpina* (L.) Hue total ekstresinin (L.V.T.E) enzimatik aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda 1,09±0,04 olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,57±0,22'ye düşmüştür. Sadece L.V.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi 0,88±0,03'e çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber L.V.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi sırasıyla 0,94±0,22, 0,97±0,29 ve 1,04±0,15'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1,15±2,03 olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,73±0,92'e düşmüştür. Sadece L.V.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi 0,97±2,06'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber L.V.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 0,86±2,30, 1,02±2,38 ve 1,10±1,18'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 3,84±1,66 olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 1,28±0,55'e düşmüştür. Sadece L.V.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi 3,20±0,55'e çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber L.V.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 2,24±0,54, 3,20±0,56 ve 3,80±0,54'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 0.73±0.92 olan MDA seviyesi

AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 1,15±2,30'e çıkmıştır. Sadece L.V.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi 0,70±2,60'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber L.V.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 0,98±0,70, 0,85±0,35 ve 0,79±0,34'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.16).

**Çizelge 4.17.** *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları.

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.31±0.06	3.22±0.31	2.56±0.55	0.66±1.61
<b>AFB1 (5 µM)</b>	0.51±0.14 <sup>a</sup>	0.97±0.30 <sup>a</sup>	1.28±0.55 <sup>a</sup>	1.25±1.10 <sup>a</sup>
<b>P.S.T.E (10 µg/ml)</b>	1.25±0.43 <sup>ab</sup>	2.53±0.43 <sup>ab</sup>	2.24±0.55 <sup>ab</sup>	0.43±0.58 <sup>ab</sup>
<b>AFB1+P.S.T.E (5 µg/ml)</b>	0.65±0.13 <sup>abc</sup>	1.57±0.22 <sup>abc</sup>	2.56±0.55 <sup>bc</sup>	1.01±0.18 <sup>abc</sup>
<b>AFB1+P.S.T.E (10 µg/ml)</b>	0.73±0.10 <sup>abcd</sup>	2.21±0.12 <sup>abd</sup>	2.88±0.96 <sup>abcd</sup>	0.98±0.32 <sup>abcd</sup>
<b>AFB1+P.S.T.E</b>	1.16±0.32 <sup>abcde</sup>	2.87±0.32 <sup>abcde</sup>	2.88±0.01 <sup>abcd</sup>	0.76±0.05 <sup>abcde</sup>

Tezda kullanılan diğer bir liken türü olan *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. total ekstresinin (P.S.T.E) enzimatik aktiviteleri tablodan incelendiğinde SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra düşmüştür. Daha sonra kan kültürlerine AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'nin üç farklı dozu uygulanmış ve SOD aktivitesinin P.S.T.E'nin antioksidan özelliğinden dolayı arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda 3,22±0,31 olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra istatikselsel olarak anlamlı derecede düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber kültür ortamına P.S.T.E'nin 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 1,57±0,22, 2,21±0,12 ve 2,87±0,32'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2,56±0,55 olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 1,28±0,55'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 2,56±0,55, 2,88±0,96 ve 2,88±0,01'e yükselmiştir. Kontrol grubunda MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra istatikselsel olarak anlamlı derecede artmıştır. Daha sonra kültür ortamına AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'nin üç farklı dozu uygulandığında MDA seviyesi sırasıyla 1,01±0,18, 0,98±0,32 ve 0,76±0,05'e kadar düşmüştür. Bu durum istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.17).

**Çizelge 4.18.** *Parmelia sulcata* Taylor biyokimyasal sonuçları

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.29±0.18	1.80±0.79	2.56±0.55	0.86±1.19
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	0.60±0.10 <sup>a</sup>	1.32±1.08 <sup>a</sup>	0.96±0.01 <sup>a</sup>	1.33±0.50 <sup>a</sup>
<b>P.S.T.E (10 µg/ml)</b>	0.93±0.12 <sup>ab</sup>	1.54±0.59 <sup>ab</sup>	2.54±0.96 <sup>b</sup>	0.80±1.15 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+P.S.T.E (5 µg/ml)</b>	0.71±0.13 <sup>abc</sup>	1.75±1.80 <sup>abc</sup>	2.04±0.55 <sup>abc</sup>	1.28±0.29 <sup>ac</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+P.S.T.E (10 µg/ml)</b>	0.82±0.22 <sup>abcd</sup>	1.80±0.16 <sup>bcd</sup>	2.56±0.54 <sup>abd</sup>	1.09±0.36 <sup>abcd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+P.S.T.E (20 µg/ml)</b>	0.90±0.25 <sup>abd</sup>	1.81±0.33 <sup>bcd</sup>	2.59±0.55 <sup>abcd</sup>	0.82±1.15 <sup>abde</sup>

*Parmelia sulcata* Taylor likeninin total ekstresinin (P.S.T.E) enzimatik aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda 1,29±0,18 olan SOD aktivitesi sadece P.S.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde SOD aktivitesi 0,93±0,12 çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi sırasıyla 0,71±0,13, 0,82±0,22 ve 0,90±0,25'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1,80±0,79 olan GPx aktivitesi sadece P.S.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde GPx aktivitesi 1,54±0,59 çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 1,75±1,80, 1,80±0,16 ve 1,81±0,33'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2,56±0,55 olan GSH seviyesi sadece P.S.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde GSH seviyesi 2,54±0,96 çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 2,04±0,55, 2,56±0,54 ve 2,59±0,55'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 0,86±1,19 olan MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 1,33±0,50'e çıkmıştır. Sadece P.S.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi 0,80±1,15'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber P.S.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 1,28±0,29, 1,09±0,36 ve 0,82±1,15'e kadar düşmüştür. Bu değerler istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde *Parmelia sulcata* Taylor likeninin total ekstresinin anlamlı fark oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.18).

**Çizelge 4.19.** *Ramalina farinacea* (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.81±0.17	0.79±0.28	4.00±0.19	1.92±0.18
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	1.04±0.25 <sup>a</sup>	0.36±0.18 <sup>a</sup>	1.01±0.34 <sup>a</sup>	3.45±0.37 <sup>a</sup>
<b>R.F.T.E (10 µg/ml)</b>	1.69±0.12 <sup>b</sup>	0.64±0.11 <sup>ab</sup>	3.51±0.17 <sup>b</sup>	1.82±0.22 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+R.F.T.E (5 µg/ml)</b>	1.18±0.19 <sup>ac</sup>	0.45±0.12 <sup>a</sup>	1.52±0.25 <sup>bc</sup>	2.99±0.25 <sup>ac</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+R.F.T.E (10 µg/ml)</b>	1.34±0.12 <sup>acd</sup>	0.57±0.12 <sup>abc</sup>	2.34±0.25 <sup>d</sup>	2.54±0.23 <sup>cd</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+R.F.T.E (20 µg/ml)</b>	1.78±0.11 <sup>be</sup>	0.74±0.12 <sup>abcd</sup>	3.71±0.24 <sup>e</sup>	2.04±0.23 <sup>de</sup>

*Ramalina farinacea* (L.) Ach. likeninin total ekstresinin (R.F.T.E) antioksidan enzim aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda 1,81±0,17 olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 1,04±0,25'e düşmüştür. Sadece R.F.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi 1,69±0,12'ye çıkmıştır. Bu durum istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber R.F.T.E'nin 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozlarının verilmesiyle SOD aktivitesi sırasıyla 1,18±0,19, 1,34±0,12 ve 1,78±0,11'e çıkmıştır. Bir diğer enzim olan GPx aktivitesi Kontrol grubunda 0,79±0,28 olarak, AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,36±0,18 olarak ölçülmüş enzim seviyesinin AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisinden dolayı düştüğü belirlenmiştir. Sadece R.F.T.E'si verildiğinde GPx aktivitesi 0,64±0,11'ye çıkmıştır. AFB<sub>1</sub> ile beraber R.F.T.E'nin farklı konsantrasyondaki dozları verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 0,45±0,12, 0,57±0,12 ve 0,74±0,12'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 4,00±0,19 olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 1,01±0,34'e düşmüştür. Sadece R.F.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi 3,51±0,17'e çıkmıştır. Daha sonra kan kültürlerine sırasıyla R.F.T.E'nin 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları AFB<sub>1</sub> ile beraber verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 1,52±0,25, 2,34±0,25 ve 3,71±0,24'e çıkmıştır. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. son olarak bakılan MDA seviyesi kontrol grubunda 1,92±0,18, AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 3,45±0,37 olarak çıkmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. kan kültürlerine sadece R.F.T.E'sinin 10 µg/ml'lik dozu verildiğinde MDA seviyesi 1,82±0,22'e düşmüştür. Kültürlere AFB<sub>1</sub> ile beraber R.F.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 2,99±0,25, 2,54±0,23 ve 2,04±0,23'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.19).

**Çizelge 4.20.** *Usnea articulata* (L.) Hoffm. biyokimyasal sonuçları

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.51±0.07	1.31±2.47	2.81±0.14	2.24±3.20
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	0.67±0.25 <sup>a</sup>	0.59±0.98 <sup>a</sup>	0.22±0.14 <sup>a</sup>	4.16±5.54 <sup>a</sup>
<b>U.A.T.E (10 µg/ml)</b>	1.19±0.03 <sup>ab</sup>	1.14±1.13 <sup>b</sup>	2.84±0.05 <sup>b</sup>	2.34±4.88 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+U.A.T.E (5 µg/ml)</b>	0.74±0.26 <sup>abc</sup>	0.81±1.50 <sup>abc</sup>	2.68±0.16 <sup>abc</sup>	3.52±0.01 <sup>ab</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+U.A.T.E (10 µg/ml)</b>	1.38±0.05 <sup>abcd</sup>	1.18±0.01 <sup>bc</sup>	2.81±0.11 <sup>b</sup>	2.98±4.88 <sup>abc</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+U.A.T.E (20 µg/ml)</b>	1.45±0.01 <sup>abcde</sup>	1.34±1.13 <sup>bcd</sup>	2.85±0.05 <sup>b</sup>	2.37±1.14 <sup>abcd</sup>

Tezde kullanılan *Usnea* cinsine ait türlerden olan *Usnea articulata* (L.) Hoffm. likeninin total ekstresinin (U.A.T.E) enzimatik aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda 1,51±0,07 olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,67±0,25'e düşmüştür. Sadece U.A.T.E'sinin 10 µg/ml'lik dozu verildiğinde ise SOD aktivitesi 1,19±0,03'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.A.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi sırasıyla 0,74±0,26, 1,38±0,05 ve 1,45±0,01'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1,31±2,47 olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,59±0,98'e düşmüştür. Sadece U.A.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi 1,14±1,13'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.A.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 0,81±1,50, 1,18±0,01 ve 1,34±1,13'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2,81±0,14 olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,22±0,14'e düşmüştür. Sadece U.A.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi 2,84±0,05'e çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.A.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 2,68±0,16, 2,81±0,11 ve 2,85±0,05'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2,24±3,20 olan MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 4,16±5,54'e çıkmıştır. Sadece U.A.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi 2,34±4,88'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.A.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 3,52±0,01, 2,98±4,88 ve 2,37±1,14'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.20).



**Çizelge 4.21.** *Usnea filipendula* Stirt. biyokimyasal sonuçları

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.50±0.08	1.12±1.50	2.78±0.09	1.22±0.92
<b>AFB<sub>1</sub> (5 µM)</b>	0.95±0.11 <sup>a</sup>	0.55±0.56 <sup>a</sup>	0.19±0.09 <sup>a</sup>	2.97±1.84 <sup>a</sup>
<b>U.F.T.E (10 µg/ml)</b>	1.32±0.22 <sup>ab</sup>	1.24±1.50 <sup>b</sup>	2.81±0.05 <sup>b</sup>	1.81±1.84 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+U.F.T.E (5 µg/ml)</b>	1.02±0.49 <sup>ac</sup>	0.72±0.56 <sup>abc</sup>	2.84±0.05 <sup>b</sup>	2.81±3.04 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+U.F.T.E (10 µg/ml)</b>	1.31±0.26 <sup>abd</sup>	0.89±0.98 <sup>abc</sup>	2.94±0.11 <sup>ab</sup>	2.31±1.84 <sup>a</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+U.F.T.E (20 µg/ml)</b>	1.51±0.14 <sup>bcd</sup>	1.14±1.13 <sup>cd</sup>	2.97±0.01 <sup>abc</sup>	1.67±1.84 <sup>ad</sup>

*Usnea* cinsine ait diğer bir liken türü olan *Usnea filipendula* Stirt. likeninin total ekstresinin (U.F.T.E) enzimatik aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda 1,50±0,08 olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,95±0,11'e düşmüştür. Sadece U.F.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi 1,32±0,22'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.F.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi sırasıyla 1,02±0,49, 1,31±0,26 ve 1,51±0,14'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1,12±1,50 olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,55±0,56'e düşmüştür. Sadece U.F.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi 1,24±1,50'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.F.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 0,72±0,56, 0,89±0,98 ve 1,14±1,13'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2,78±0,09 olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,19±0,09'e düşmüştür. Sadece U.F.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi 2,81±0,05'e çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.F.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 2,84±0,05, 2,94±0,11 ve 2,97±0,01'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1,22±0,92 olan MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 2,97±1,84'e çıkmıştır. Sadece U.F.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi 1,81±1,84'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber U.F.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 2,81±3,04, 2,31±1,84 ve 1,67±1,84'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.21).

**Çizelge 4.22.** *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai biyokimyasal sonuçları

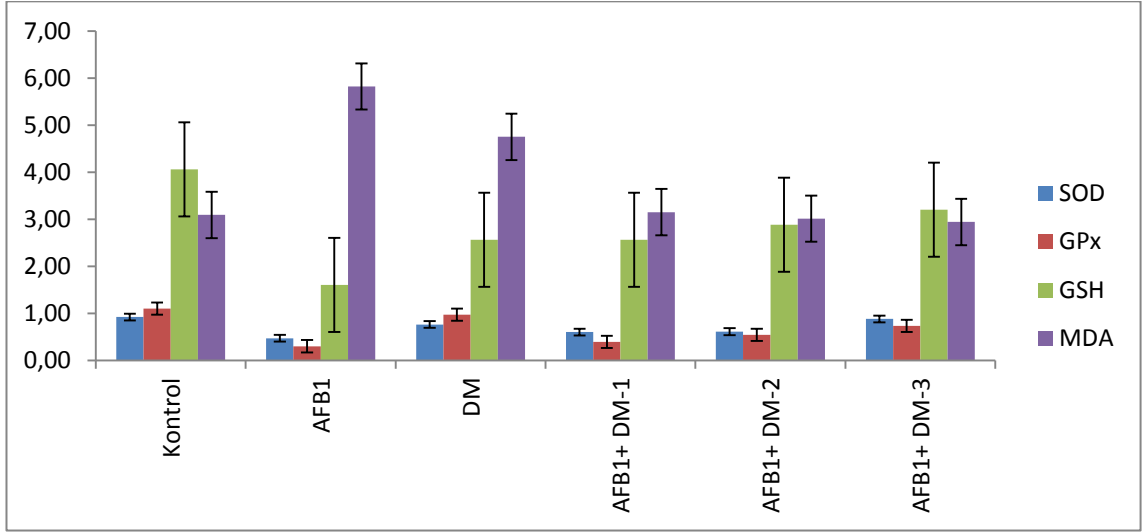
	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH ( $\mu$ mol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.20 $\pm$ 0.12	1.28 $\pm$ 0.01	2.84 $\pm$ 0.05	2.13 $\pm$ 1.84
<b>AFB<sub>1</sub> (5 <math>\mu</math>M)</b>	0.62 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.99 $\pm$ 3.69 <sup>a</sup>
<b>V.P.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	0.92 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	1.08 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	2.84 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	2.13 $\pm$ 1.84 <sup>b</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+V.P.T.E (5 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1.01 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	0.92 $\pm$ 1.50 <sup>abc</sup>	2.62 $\pm$ 0.05 <sup>abc</sup>	2.56 $\pm$ 1.85 <sup>ac</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+V.P.T.E (10 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1.12 $\pm$ 0.18 <sup>bc</sup>	1.37 $\pm$ 0.01 <sup>abcd</sup>	2.72 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	2.21 $\pm$ 3.20 <sup>bc</sup>
<b>AFB<sub>1</sub>+V.P.T.E (20 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1.26 $\pm$ 0.05 <sup>bcd</sup>	1.48 $\pm$ 0.01 <sup>abcde</sup>	2.84 $\pm$ 0.11 <sup>bd</sup>	2.02 $\pm$ 0.10 <sup>bcd</sup>

Tezda kullanılan likenlerden *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai liken türünün total ekstresinin (V.P.T.E) biyokimyasal aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda 1,20 $\pm$ 0,12 olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,62 $\pm$ 0,22'e düşmüştür. Sadece V.P.T.E'si (10  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi 0,92 $\pm$ 0,24'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber V.P.T.E'nin üç farklı dozu (5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi sırasıyla 1,01 $\pm$ 0,21, 1,12 $\pm$ 0,18 ve 1,26 $\pm$ 0,05'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1,28 $\pm$ 0,01 olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,43 $\pm$ 1,50'e düşmüştür. Sadece V.P.T.E'si (10  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi 1,08 $\pm$ 0,01'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber V.P.T.E'nin üç farklı dozu (5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 0,92 $\pm$ 1,50, 1,37 $\pm$ 0,01 ve 1,48 $\pm$ 0,01'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2,84 $\pm$ 0,05 olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0,83 $\pm$ 0,14'e düşmüştür. Sadece V.P.T.E'si (10  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi 2,84 $\pm$ 0,05'e çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber V.P.T.E'nin üç farklı dozu (5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 2,62 $\pm$ 0,05, 2,72 $\pm$ 0,19 ve 2,84 $\pm$ 0,11'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2,13 $\pm$ 1,84 olan MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 2,99 $\pm$ 3,69'e çıkmıştır. Sadece V.P.T.E'si (10  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi 2,13 $\pm$ 1,84'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber V.P.T.E'nin üç farklı dozu (5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml ve 20  $\mu$ g/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 2,56 $\pm$ 1,85, 2,21 $\pm$ 3,20 ve 2,02 $\pm$ 0,10'e kadar düşmüştür (Çizelge4.22).

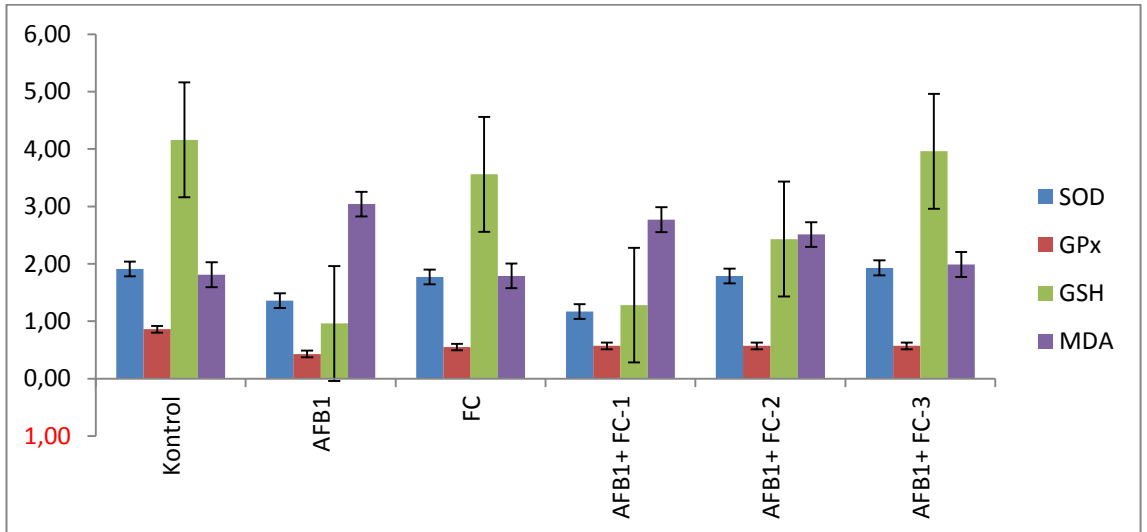
**Çizelge 4.23.** *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. biyokimyasal sonuçları

	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	GSH (µmol/L)	MDA (nmol/mL)
<b>Kontrol</b>	1.35±0.06	1.60±1.13	2.68±0.16	1.89±1.84
<b>AFB1 (5 µM)</b>	0.67±0.19 <sup>a</sup>	0.49±0.98 <sup>a</sup>	1.14±0.33 <sup>a</sup>	4.34±3.20 <sup>a</sup>
<b>X.P.T.E (10 µg/ml)</b>	1.10±0.29 <sup>b</sup>	1.15±1.50 <sup>ab</sup>	2.81±0.24 <sup>ab</sup>	1.93±3.69 <sup>b</sup>
<b>AFB1+X.P.T.E (5 µg/ml)</b>	0.86±0.30 <sup>ac</sup>	0.92±1.50 <sup>ab</sup>	2.55±0.19 <sup>abc</sup>	3.73±1.84 <sup>abc</sup>
<b>AFB1+X.P.T.E (10 µg/ml)</b>	1.29±0.13 <sup>bd</sup>	1.06±0.56 <sup>ab</sup>	2.65±0.11 <sup>bc</sup>	2.69±2.01 <sup>abcd</sup>
<b>AFB1+X.P.T.E (20 µg/ml)</b>	1.30±0.07 <sup>bcd</sup>	1.08±0.98 <sup>ab</sup>	2.81±0.05 <sup>abd</sup>	2.01±2.15 <sup>bcde</sup>

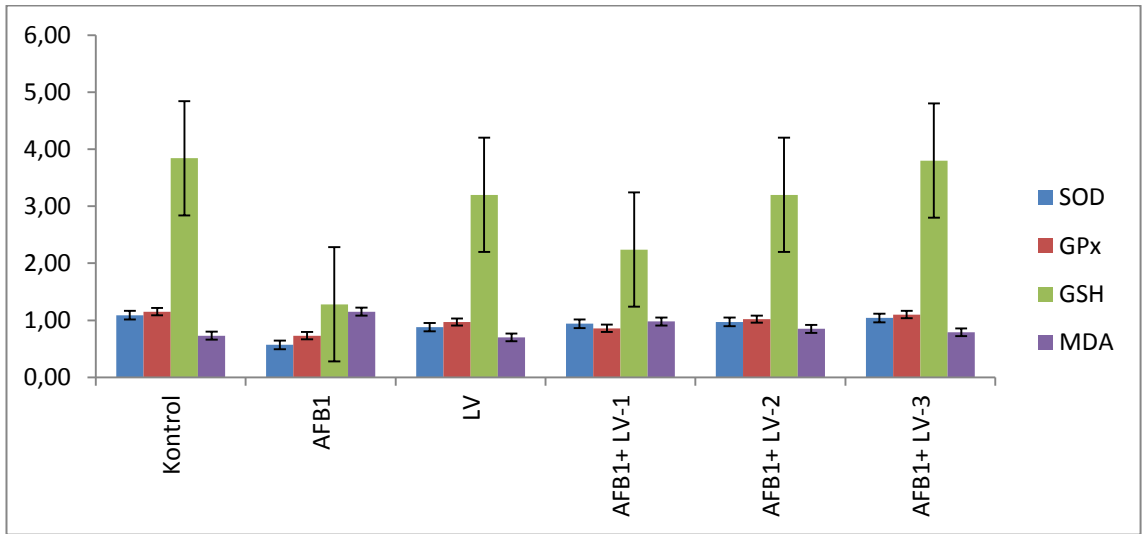
Son olarak biyokimyasal parametrelerine bakılma liken tür *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.'nin total ekstresinin (X.P.T.E) enzimatik aktivitelerine bakıldığında kontrol grubunda 1.35±0.06 olan SOD aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0.67±0.19'e düşmüştür. Sadece X.P.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi 1.10±0.29'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber X.P.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise SOD aktivitesi sırasıyla 0.86±0.30, 1.29±0.13 ve 1.30±0.07'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1.60±1.13 olan GPx aktivitesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 0.49±0.98'e düşmüştür. Sadece X.P.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi 1.15±1.50'ye çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber X.P.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GPx aktivitesi sırasıyla 0.92±1.50, 1.06±0.56 ve 1.08±0.98'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 2.68±0.16 olan GSH seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 1.14±0.33'e düşmüştür. Sadece X.P.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi 2.81±0.24'e çıkmıştır. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber X.P.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise GSH seviyesi sırasıyla 2.55±0.19, 2.65±0.11 ve 2.81±0.05'e çıkmıştır. Kontrol grubunda 1.89±1.84 olan MDA seviyesi AFB<sub>1</sub> verildikten sonra 4.34±3.20'e çıkmıştır. Sadece X.P.T.E'si (10 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi 1.93±3.69'e düşmüştür. Daha sonra AFB<sub>1</sub> ile beraber X.P.T.E'nin üç farklı dozu (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) verildiğinde ise MDA seviyesi sırasıyla 3.73±1.84, 2.69±2.01 ve 2.01±2.15'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.23).



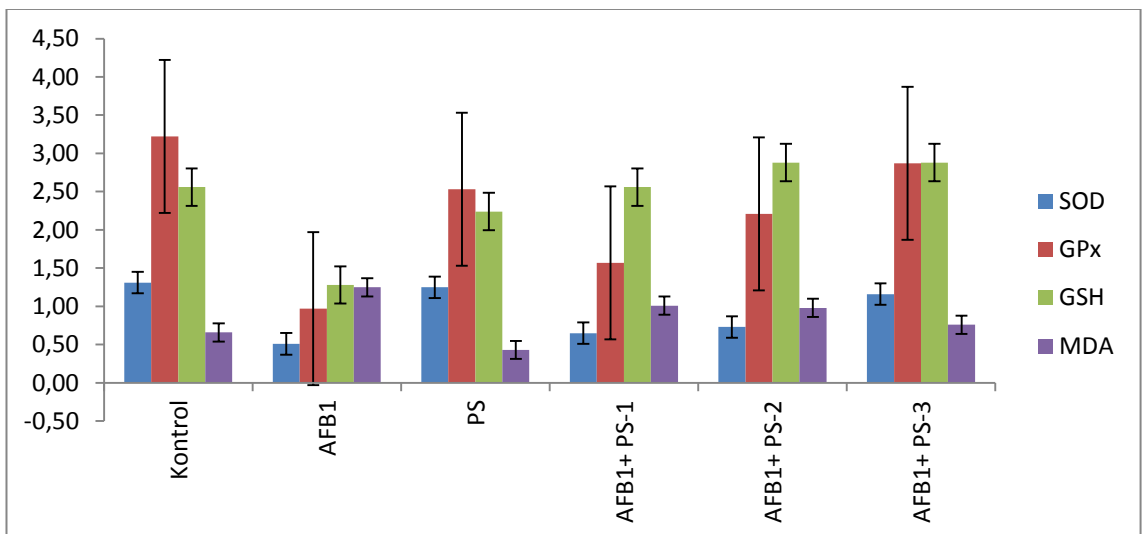
Şekil 4.13. *Dermatocarpon miniatum* Eschw. biyokimyasal sonuçları



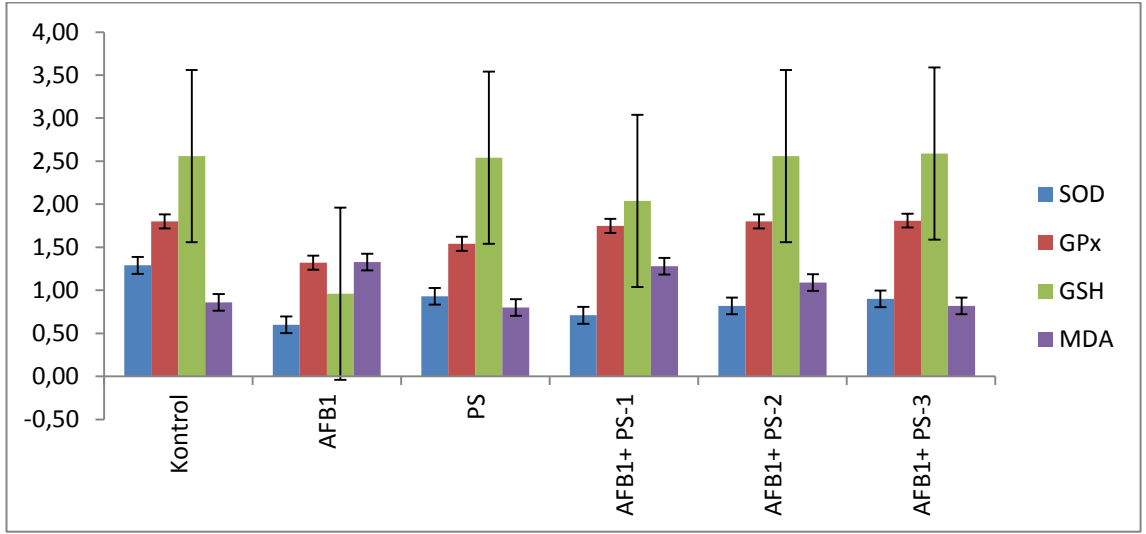
Şekil 4.14. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale biyokimyasal sonuçları



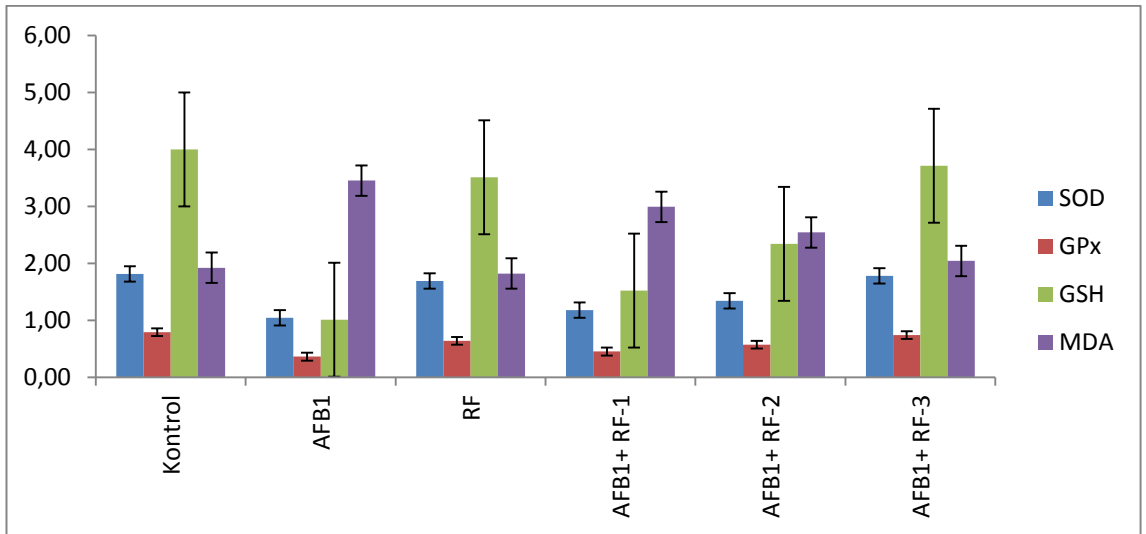
Şekil 4.15. *Letharia vulpina* (L.) Hue biyokimyasal sonuçları



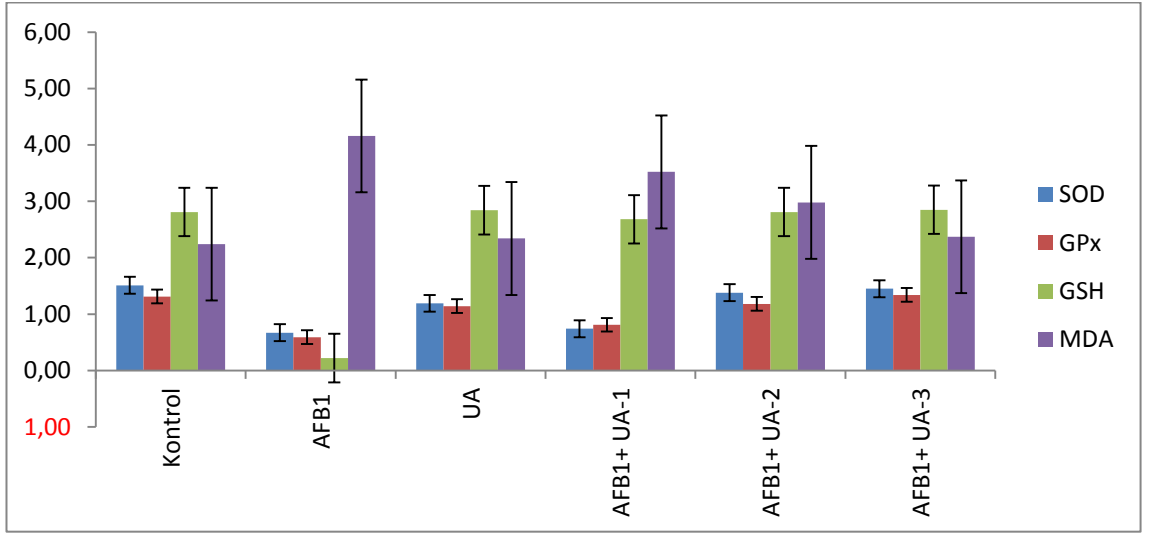
Tablo 4.16. *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları



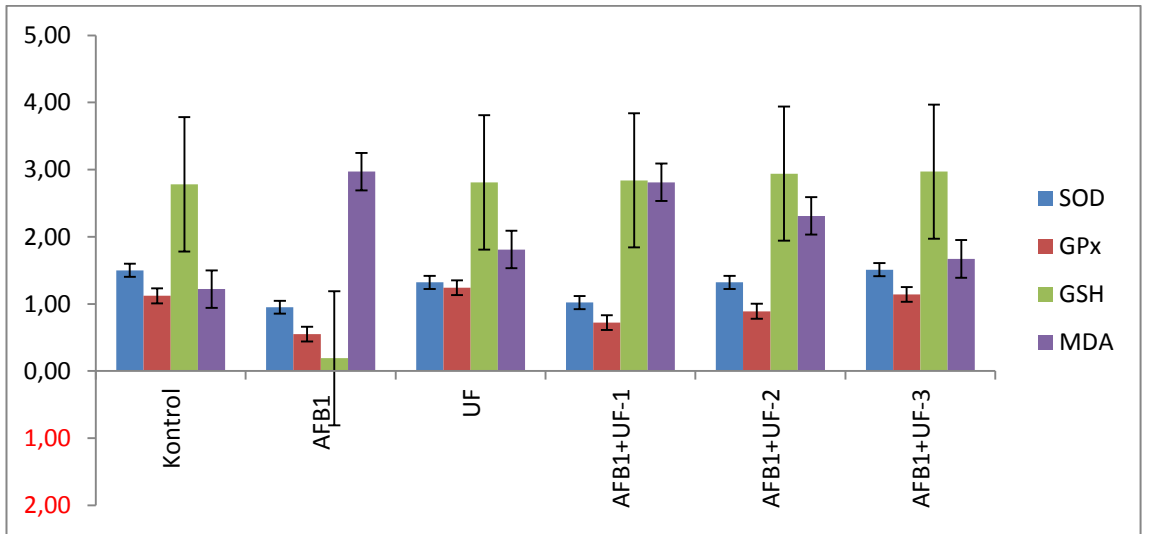
Şekil 4.17. *Parmelia sulcata* Taylor biyokimyasal sonuçları



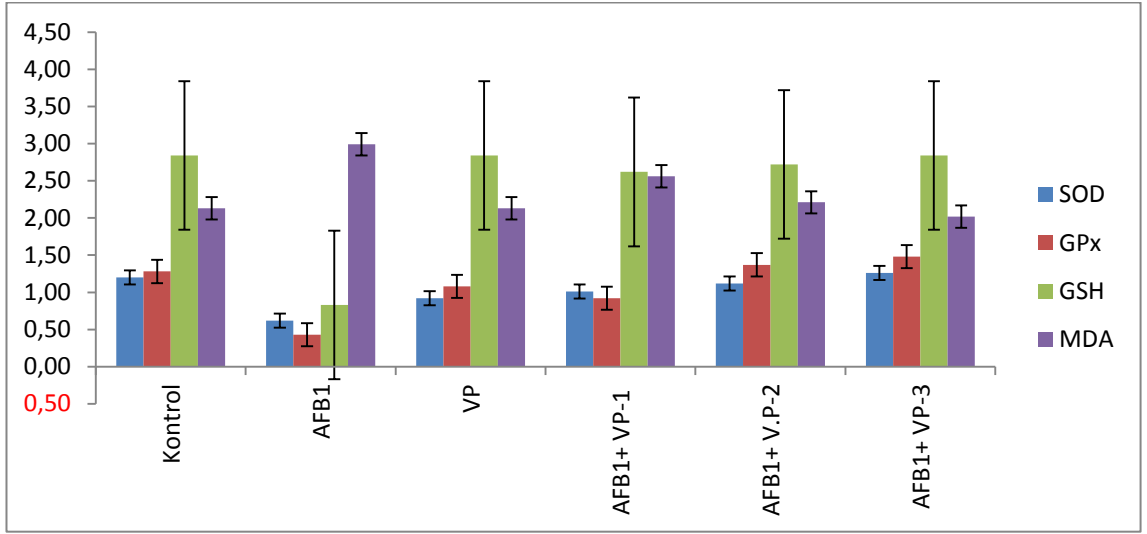
Şekil 4.18. *Ramalina farinacea* (L.) Ach. biyokimyasal sonuçları



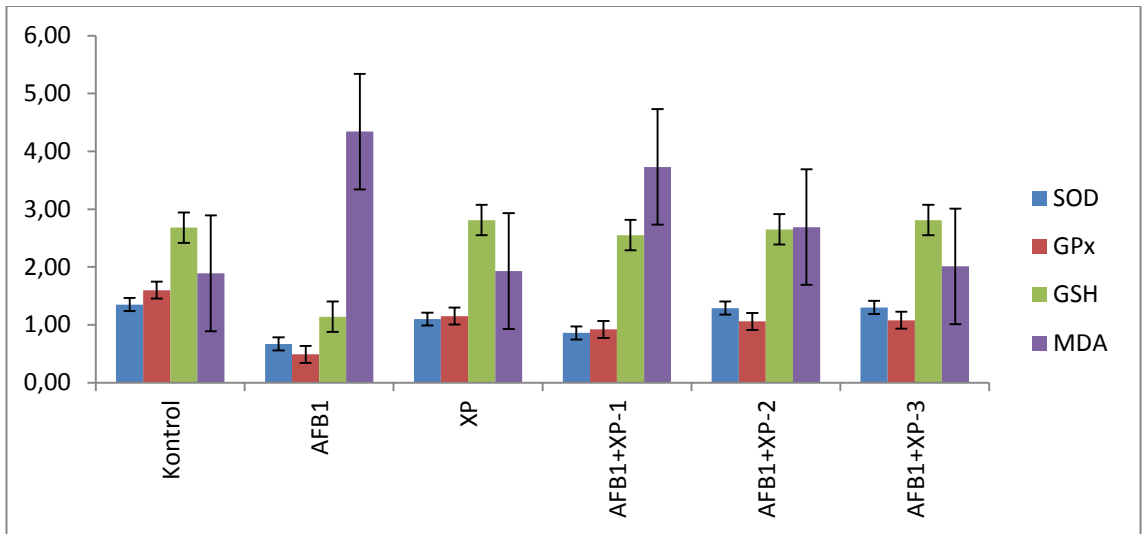
Şekil 4.19. *Usnea articulata* (L.) Hoffm. biyokimyasal sonuçları



Şekil 4.20. *Usnea filipendula* Stirt. biyokimyasal sonuçları



Şekil 4.21. *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai biyokimyasal sonuçları



Şekil 4.22. *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. biyokimyasal sonuçları



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda yapılan birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla değişik bitki ve bitki kısımlarından tıbbi olarak faydalanılmaya çalışılmış olup ekstraksiyon, dekoksasyon veya saflaştırma yolu ile doğal bileşik maddeler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu bileşik maddelerin karakterizasyonu, tanımlamaları yapılarak mutajenik, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi, insanlarda kanser hastalığının gelişmesini azaltmak için önemli çalışmaları da beraberinde getirmiştir (Roncada *et al.* 2004). Günümüzde değişik bileşikleri içinde barındıran birçok doğal ürün hem ticari olarak bulunmakta hem de bireysel ya da atadan görme şeklinde istifade edilmektedir. Bu doğal ürünler özellikle bireysel immün sisteminin düzenlenmesini sağlamasından dolayı antimutajenik, antikarsinojenik veya antitümoral aktiviteye sahiptirler. Bu doğal bileşikler, kimyasal olarak hazırlanmış olan antimutajen, antikarsinojen veya antitümör ilaçlarla (drog) karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Günümüz araştırmacıları halk sağlığında insanlar tarafından asırlardır tıbbi amaçla kullanılan bitkilerin mutajenik-antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabilecekleri değişik test sistemleri geliştirmiştir. Geliştirilen bu test sistemlerinin temel özellikleri; kısa sürede ve doğru olarak sonuç vermesi, düşük maliyetli olması, uygulama kolaylığı ve çalışmaya uygun olmaları amaçlanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000). Bu test sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalara bakıldığında likenlerle yapılan çalışmaların giderek arttığı görülmüştür. Likenler, yapılarında buldukları ve kendilerine has olan sekonder metabolitleri sayesinde antimutajenik, antitümoral ve değişik biyolojik aktiviteye sahip oldukları bilinen, her geçen gün popülerliği artmakta olan sıra dışı canlılardır.

Bundan dolayı tez çalışması kapsamında Erzurum-Artvin-Giresun ve çevresinde yetişmekte olan 10 farklı liken türünün total ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin belirlenmesi için mutant bakteri suşlarının kullanıldığı Ames/*Salmonella* ve *E. coli* WP2 test sistemleri kullanılmıştır. Ayrıca insan periferik kanından elde edilen lenfositlerde AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisine karşı bu liken türlerinin mutajenik veya

antimutajenik özelliklerinin olup olmadıkları Mikronükleus (MN) yöntemi ile araştırılmıştır. İnsan lenfosit kültürlerinde biyokimyasal çalışmalar yapılarak total liken özütlerinin antioksidan özelliklerinin (SOD, GPx, GSH ve MDA enzimleriyle) tespiti, etki derecelerinin belirlenmesi ve antimutajenik özelliğinin antioksidan özelliğinden kaynaklı olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tezin ilk kısmını oluşturan Ames/*Salmonella* ve *E. coli* WP2 bakteriyel test sistemleri çalışmasında *Dermatocarpon miniatum* Eschw., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Letharia vulpina* (L.) Hue, *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Parmelia sulcata* Taylor, *Ramalina farinacea* (L.) Ach., *Usnea articulata* (L.) Hoffm., *Usnea filipendula* Stirt., *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai ve *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. likenlerinden elde edilen total ekstralarının *S. typhimurium* TA1535, TA1537 ve *E. coli* WP2 $uvrA$  mutant bakteri suşları üzerine sırasıyla NaN<sub>3</sub>, 9-AA ve MNNG mutajenleri ile oluşturulan mutasyonlara karşı mutajenik ve antimutajenik etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde 10 farklı liken türünün total stresinin uygulanan 5 farklı konsantrasyonlarının (20 µg/petri, 40 µg/petri, 60 µg/petri, 80 µg/petri ve 100 µg/petri) bakteri suşları üzerine mutajenik etkinlik göstermediği, buna karşın *S. typhimurium* TA1535, TA1537 ve *E. coli* WP2 $uvrA$  mutant bakteri suşları üzerine antimutajenik etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Tezde kullanılan mutant bakteri suşları daha önceden tanımlanmış çok özel mutasyonlar içermektedir. Kullanılan mutant bakteri suşlarından olan *S. typhimurium* TA1535 bakterisi histidin (his<sup>-</sup>) oksotrofudur. Bundan dolayı histidin amino asidini sentez edememektedir. Ames testi kullanılarak yapılan çalışmaların temel dayanağı; mutajen maddenin bakteri DNA'sı ile etkileşmesi neticesinde his operonunda geri mutasyon oluşturmaya dayanmaktadır. Böylece oksotrof olan bakteri atasal formuna (prototrof) geri dönerek histidin amino asidini sentez edebilmektedir. *S. typhimurium* TA1535 bakterisi histidin sentezinden sorumlu ilk enzimi kodlayan His G46 geninde bir baz değişimi nokta mutasyonu taşımaktadır. Bundan dolayı bakteri lösin amino asidi yerine prolin amino asidi sentezlemektedir (Victorin *et al.* 1987; Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010). Kullanılan diğer bakteri suşu olan *S. typhimurium* TA1537 ise histidin

biyosentezinden sorumlu olan kısmında (His C ve His D gen bölgeleri) insersiyon tipinde gen mutasyonu oluşmuştur. Bu durum çerçeve kaymasına neden olmaktadır. Mutajen ajanlar bu olayı tersine döndürerek bakterinin yeniden gerekli amino asitlerinin sentezlenmesini sağlamıştır (Victorin *et al.* 1987; Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

Tezde kullanılan önemli geri mutasyon testlerinden bir diğeri olan mutant bakteri suşu ise *E. coli* WP2*uvrA*'dır. Bu mutant bakteri triptofan oksotrofudur. Triptofan sentezinde önemli bir enzimi kodlayan *trpE* geninde A-T baz değişimi nokta mutasyonu taşımaktadır. İlgili gendeki bu değişim anlamsız mutasyonla sonuçlanmıştır. Ayrıca *uvrA* ise bakterinin hassasiyetini artırmak için kullanılmıştır (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

Liken türlerinden elde edilen total ekstraların uygulanmasıyla kullanılan sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ), 9-aminoakridin (9-AA) ve MNNG mutajenlerinin mutajenik etkileri engellenmiştir. Antimutajenik etki liken ekstralarında bulunan liken asitleriyle ilişkilendirilmiştir. Liken asitleri mutajen maddenin DNA ile etkileşimine engel olarak veya mutajen maddenin hücre içerisine girişini önleyerek mutasyonların meydana gelmesini engellemiş olduğu düşünülmüştür.

Sonuç tablosuna bakıldığında liken türlerinin farklı antimutajenik etkinliğe sahip sonuçlar oluşturduğu ve bunun da doza bağımlı olmadığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan farklı mutasyonlar içeren suşların DNA tamir mekanizmalarında da farklılıklar bulunmaktadır. Likenlerin içermiş oldukları liken asitleri güçlü antioksidan özelliklere sahiptirler. Liken asitlerinin bu özelliği antioksidan sistemi harekete geçirmek suretiyle bu tamir mekanizmalarını uyararak mutajen ajanın etkisini azaltmış veya ajanın DNA'ya bağlanmasını engellemiş olabileceğiyle ilişkilendirilmiştir. Bundan dolayı antimutajenik etkinlik göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca bazı dozların zayıfta olsa mutajen etki gösterdiği görülmüştür. Bu duruma farklı mutasyon içeren bakteri suşlarının sahip oldukları tamir mekanizmalarıyla ve hassasiyetleriyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Diğer bir sebep olarak da mutajen ajanla liken ekstresinde

bulunan asitlerden bazılarının sinerjistik etki göstermiş olabileceği varsayılmıştır. Tezde kullanılan farklı likenlerin değişik oranda antimutajenik etkinlik göstermesi liken türlerinin birbirinden farklı yapıda ve miktarda liken asidi içermeleriyle ilişkilendirilmiştir.

Birbirleriyle mukayese edildiğinde bakteri suşları arasında likenlerin total ekstrelerinin en etkili olduğu bakteri suşları sırasıyla *E. coli* WP2uvrA ve *S. typhimurium* TA1535 olmuştur. Liken ekstrelerinin en az antimutajenik etkinlik gösterdiği bakteri suşu *S. typhimurium* TA1537 mutant bakterisi olmuştur. Bu durum suşların taşımış oldukları farklı mutasyonlar ve DNA tamir mekanizmalarıyla, farklı hassasiyetlere sahip olmaları ile açıklanmıştır (Mortelmans and Riccio 2000; Özbek 2006; Karadayı 2010).

Tabloya bakıldığında *E. coli* WP2uvrA mutant bakteri suşu üzerine antimutajenik etkinlik olarak en kuvvetli olan liken türleri sırasıyla *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai, *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., *Dermatocarpon miniatum* Eschw., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale liken türleridir. En az antimutajenik etkinlik gösteren liken türü ise *Letharia vulpina* (L.) Hue'dır. *S. typhimurium* TA1535 mutant bakteri suşu üzerine antimutajenik etkinlik olarak en kuvvetli olan liken türleri sırasıyla *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai, *Usnea articulata* (L.) Hoffm., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. ve *Ramalina farinacea* (L.) Ach. liken türleridir. En az antimutajenik etkinlik gösteren liken türü ise *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale'dır. *S. typhimurium* TA1537 mutant bakteri suşu üzerine antimutajenik etkinlik olarak en kuvvetli olan liken türleri sırasıyla *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai ve *Letharia vulpina* (L.) Hue liken türleridir. En az antimutajenik etkinlik gösteren liken türü ise *Ramalina farinacea* (L.) Ach.'dir.

Liken türlerinden elde edilen total ekstreler uygulandıktan sonra MNNG ile muamele edilmiş *E. coli* WP2, NaN<sub>3</sub> ile muamele edilmiş *S. typhimurium* TA1535 ve 9-AA ile muamele edilmiş *S. typhimurium* TA1537 mutant bakteri suşları üzerine 10 farklı liken türünden elde edilmiş olan total ekstrelerinin önemli antimutajenik etkilerinin olduğunu

belirlenmiştir. Daha önce benzer test sistemleri ile yapılan çalışmalara bakıldığında farklı liken türlerinin antimutajenik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Ağar vd 2010; Güllüce vd 2011; Aslan vd 2012).

Yine bu tezin ilk kısmında ikinci ayağında yer alan çalışmada insan periferel kanından elde edilen lenfositlerde AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisine karşı bu liken türlerinin mutajenik veya antimutajenik özelliklerinin olup olmadıkları Mikronükleus (MN) yöntemi ile araştırılmıştır. 10 farklı liken türünün total ekstralarının insan periferel lenfositlerinde herhangi bir mutajenik etkisine rastlanmamıştır. Ayrıca uygulanan 3 farklı konsantrasyonlarının (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml) AFB<sub>1</sub>'in (5 µM) mutajenik etkisine karşı antimutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. AFB<sub>1</sub>'in insan periferel lenfositlerinde, MN'yi artırdığı görülmüştür. AFB<sub>1</sub> (5 µM) uygulanan lenfosit kültürlerinin kontrol ile aralarındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Daha önce AFB<sub>1</sub> kullanılarak insan lenfosit hücrelerinde yapılan benzer çalışmalarda aflatoksinlerin mutajenik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir. Özellikle aflatoksinler içinde toksisitesi en yüksek olan AFB<sub>1</sub>, DNA da değişik hasarlara veya mutasyonlara neden olmaktadır. 1977 yılında Leon-Cazares ve Aroche-alfonso'nun yaptığı çalışmada insan lenfositleri *Aspergillus parasiticus* mantar sporları ile birlikte 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakmış ve aflatoksinlerin KA'larına neden olduklarını göstermiştir (Kotan 2010; Çeker 2011).

AFB<sub>1</sub>'in etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. AFB<sub>1</sub> doğrudan veya dolaylı olarak etki etmektedir. Doğrudan DNA'ya bağlanarak ya da salınımını uyardığı OH<sup>-</sup> iyonlarının DNA hasarına neden olmasıyla mutajenik etki göstermektedir. AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisi DNA'daki guanin bazının N-7 ile AFB<sub>1</sub>'in 8. karbonu arasında kovalent bağ kurulmasına bağlı olarak, özellikle G-T şeklinde transversiyona neden olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. AFB<sub>1</sub> verilen ratlarda karaciğerlerinde 8-oksodeoksiguanozin (8-oxodG) oluşumu artmaktadır. Bu durum ratların DNA'larında hasarlara (KKD gibi) neden olmaktadır (Chan *et al.* 2003).

AFB<sub>1</sub>'in diğ er bir etki mekanizmasının ise OH<sup>-</sup> iyonlarının salınımını arttırarak ROT'ların oluşmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. AFB<sub>1</sub>'in canlı vücudundaki metabolik AFB<sub>1</sub>'in hareketliliğ inden dolayı ROT'ların miktarını arttırarak oksidatif stres oluşumuna neden olduğı bilinmektedir (Chan *et al.* 2003). ROT'ların artışı ise mutasyona neden olarak değışik DNA hasarlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Lee *et al.* 1989). Bundan dolayı AFB<sub>1</sub>'in doğrudan DNA'ya bağlanarak ya da dolaylı olarak ROT'ların salınımının arttırmasıyla KKD oluşumu, mikronökleus oluşumu, asentrik kromozom oluşması, kromatid fragmentlerinin oluşması, anafaz köprülerinin oluşması ve geri kalmış kromozomlar gibi birçok DNA hasarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkisine karşı likenlerin antimutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Gölçin vd 2002; Aslan vd 2006; Güllüce vd 2006; Ağ ar vd 2010; Aslan vd 2011;2012; Alpsoy vd 2011; Güllüce vd 2011; Kotan vd 2011; 2013; Nardemir vd 2013; Alpsoy vd 2013). Likenlerin göstermiş oldukları bu antimutajenik etkileri, yapılarında bulunan "liken asitleri" denilen sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Değışik liken türlerinden izole edilmiş birçok liken asidi bulunmaktadır. Bunlardan olan protolikesterinik asit, pulvinik asit türevlerinden olan vulpinik asit, pinastrik asit, depsid grubundan evernik, olivetorik asit, tridepsid grubundan giroforik asit, depsidon grubundan fisodik, lobarik, fumarprotosetrarik asitler ile dibenzofuran türevlerinden usnik asidin değışik biyolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Bunlardan özellikle protolikesterinik asit, pulvinik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asidin en yüksek aktivite gösteren liken maddeleri olduğı belirlenmiştir (Vartia 1950; Dölger vd 1997; Dölger vd 1998; Ingólfsdottir 2002; Boustie and Grube 2005). Ayrıca likenlerden izole edilen depsid, depsidon bileşiklerinin daha önceki çalışmalarda da ifade edildiğı gibi antibakteriyal, antifungal, antiülserojenik, antienflamatuar, antimutajenik ve antikarserojenik özelliklerin oldukları bildirilmiştir (Vartia 1950; Vartia 1973; Raju *et al.* 1985; Yamamoto *et al.* 1995; Neamati *et al.* 1997; Aslan vd 1998, 1999; Huneck 1999; Müller 2001, Brodo 2001; Müller 2001; Ingólfsdottir 2002; Tokat 2004; Behera *et al.* 2005; Boustie and Grube 2005; Russo *et al.* 2006).

Likenler, ülkemizde ve dünyada çok eski zamanlardan beri halk sağlığında değişik hastalıkların tedavisi için yaygın olarak kullanılmışlardır (Öztürk ve Aslan 1991; Aslan ve Öztürk 1994; Aslan 2000). 16. yy'den itibaren dekoksasyon ve infüzyon şeklinde hastalıkların tedavisinde kullanılan likenler yapılarında bulunan sekonder metabolitlerine göre değil morfolojik şekillerine bakarak değerlendirmiş ve tedavi amaçlı kullanılmışlardır. Örneğin: *Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg. saç uzatmak, saçların dökülmesini engellemek ve gürleştirmek için, *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. akciğer hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Karamanoğlu 1971; Smith 1975; Zeyrek 1982; Tutel 1986; Galun 1988; Dilsizoğlu vd 2004; Boustie and Grube 2005). Benzer şekilde sarı renkli liken olan *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. sarılık hastalığının tedavisi için önerilmiştir. Kafatası likeni olarak isimlendirilen *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. veya diğer bazı türlerin epilepsi tedavisi için altın kadar değerli olduğu belirtilmiştir (Tokat 2004). *Cetraria islandica* (L.) Ach. ve *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar & Vězda öksürük ve solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve göğüs yumuşatıcı pastillerin yapımı için değerlendirilmiştir.

Tezde kullanılan türlerin dışında da çok farklı likenler değişik amaçlar ve hastalıklar için kullanılmışlardır. Kolombiya'da yaşayan Hesquiati halkı *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. likenini verem hastalığının tedavisinde kullandığına dair kayıtlar bulunmaktadır. Likenlerin etkisinin üretmiş oldukları sekonder metabolitler olan stistik asit, giroforik asit ve norstistik asit gibi maddelerden kaynakladığı düşünülmektedir (Asahina 1967). Günümüzde de liken asitlerinin kullanılması ile egzama, solunum ve dolaşım yolu hastalıklarında kullanılmaktadır (Biswas 1956; Huneck and Yoshimura 1996).

*Usnea barbata*'yı rahim hastalıkları için tavsiye edilmiştir. *Usnea longissima* Ach. 'dan Çin'de hazırlanan ve adına "Sun lo" denilen karışım balgam söktürücü olarak ve ülser tedavisi için kullanılmıştır. *Usnea*'nın türleri Malaya Adaları'nda tonik şeklinde ve soğuk algınlıklarında hala tüketilmektedir. *Usnea*'nın bu etkilerinin yapısında bulunan ve yüksek oksidatif aktiviteye sahip usnik asit ve diğer asitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Eski zamanlarda *Peltigera canina* kuduz hastalığına karşı, *Peltigera apthosa* barsak kurtlarını düşürmede ve ardıç kuşu kızartılarından ıstırap çekenlerde,

*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. ise ateşli hastalıkların ve sarılık hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Tokat 2004).

*Cetraria islandica* (L.) Ach. ve *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar & Vězda öksürük ve solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve göğüs yumuşatıcı pastillerin yapımı için değerlendirilmiştir. Günümüzde birçok ilaç fabrikaları tarafından likenlerden elde edilen pastil ve şuruplar olduğu gibi bu likenlerin çayı dahi bulunmaktadır (Karamanoğlu 1971; Smith 1975; Zeyrek 1982; Tutel 1986; Galun 1988).

Liken türlerinden olan *Cladonia rangiformis* Hoffm.'ten elde edilmiş olan metanol ekstraktının antiinflamatuar etkinliğinin olduğu ve bu etkininde içermiş olduğu usnik, atroronik asit, atranorinik asit, fumarprotosetraraiik asit gibi liken asitlerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Süleyman vd 2002).

*Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr.'dan elde edilen aseton ekstresinin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 bakterileri üzerine antimutajenik etkisinin olduğunu bildirilmiştir (Zeytinoğlu vd 2008). Ayrıca MN testiyle yapılan çalışmada genotoksik etkisinin olmadığı antimutajenik özelliğinin bulunduğunu ve bu durumda likenin içerdiği usnik asit, protolikesterinik asit, likensturinik asit gibi asidik maddelerden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir (Ogmundsdottir *et al.* 1998; Olafsdottir 1999; Orange *et al.* 2001).

Lin *et al.* (2003) likenlerden elde edilen bir polisakkaridin HL 60 ve K562 hücrelerinin miktarını azalttığını dolayısıyla apoptozis ve telomeraz aktivitesini değiştirmek suretiyle antikanser özelliği sahip olduğunu bildirilmişlerdir (Lin *et al.* 2003). Yine likenlerle ilgili başka çalışmada *Cetraria islandica* (L.) Ach.'nın içermiş olduğu protolikesterinik asidin kanserde malignant hücre oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Ogmundsdottir *et al.* 1998).

*Peltigera canina* (L.) Willd.'nin metanol ekstraktlarından elde edilen farklı yapıdaki polisakkaritlerin farelerde TNF $\alpha$  salınımını artırarak suretiyle immün sistemi



güçlendirdiği ve buna bağlı olarak antikanser tedavisinde kullanılabileceğini belirtilmiştir (Omarsdottir *et al.* 2007).

Tez çalışmasında kullanılan likenlerin kullanım alanlarına bakıldığında yüzyıllardır halk sağlığında kullanılan önemli türlerin olduğu görülmüştür. *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai Kuzey Avrupa’da zehir olarak kullanılmıştır. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale Meksika’da ilaç olarak tüketilmiştir. *Letharia vulpina* (L.) Hue Okangon ‘da ilaç olarak, egzama, siğil ve kurdeşen gibi hastalıkları tedavisinde, British Kolombiya’da yüzeysel yaralara müdahalede, yaraların ve iltihaplanan yerlerin iyileştirilmesinde, mide ülserinde, İskandinavya’da değişik işlemlerden geçirildikten sonra zehir olarak kullanılmıştır. Ayrıca *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. İsveç’te ellerdeki siğillerin tedavisinde, *Parmelia sulcata* Taylor Kuzey Kaliforniya’da kalın bağırsaktaki sancıyı yok etmek amacıyla, Hindistan’da yemeklere tat vermek için, yine Hindistan’da yiyecek ve ilaç olarak değerlendirilmiştir. *Usnea articulata* (L.) Hoffm. ve *Usnea filipendula* Stirt. yaraların tedavisinde, *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. Avrupa’da sıtma tedavisinde, sarılık tedavisinde ve kinin yerine kullanılmıştır. *Xanthoria parietina* subsp. *ectanea*: İspanya’da menstrual döngü zamanında şarapla kaynatılarak ilaç olarak tüketilmiştir. Ayrıca böbrek hastalıklarında, diş ağrılarında, diğer ağrılarda ilaç olarak kullanılmış olup öksürük şuruplarının bileşenlerinden birini de bu liken çeşidi oluşturmaktadır (Karamanoğlu 1971; Zeyrek 1982; Tokat 2004; Anonim 2013).

20. yüzyıldan itibaren hızla gelişen teknoloji ve kimya bilimi sayesinde likenlerin içerdiği sekonder metabolitlerden hızla aydınlatılmaya ve saflaştırılmaya başlanmıştır. Saflaştırılan bu maddeler ise değişik biyolojik aktivite çalışmalarında birçok araştırmacı tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Değişik kimyasal maddeler ve AFB<sub>1</sub>’in mutajenik etkisine karşı likenlerin antimutajenik, antioksidan etki gösterdiğine dair çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Ogmundsdottir *et al.* 1998; Olafsdottir 1999; Orange *et al.* 2001; Geyikoğlu ve Turkez 2006; Aslan vd 2012; Kotan vd 2011,2013).

Yapılan çalışmalarda likenlerden izole edilen liken asitlerinden depsid ve depsidon grubundan olan maddelerin ultraviyole ışınlarının (UV) neden olduğu deri kanserine

karşı koruyucu özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir (Russo *et al.* 2008). UV.A ve UV.B ışınlarının ROT'ların üretilmesine ve nitrojen türevlerinin artmasına neden oldukları, böylece canlılarda değişik kanser hastalıklarına, gen mutasyonlarına ve DNA hasarlarına neden olmaktadır. Russo ve ark. (2008) yapmış olduğu çalışmalarda likenlerden izole edilen depsidon maddelerinin DNA zincir kırıklarını azalttığı, bu azalmanın depsidon grubu bileşiklerin ana etkisinin ROT'ların azalmasıyla ilişkilendirmişlerdir (Russo *et al.* 2008). Ayrıca yine aynı çalışmada kullanılan liken konsantrasyonunun artmasıyla ROT aktivitesinde artış gözlenmiş, ROT aktivitesinin artışı likenlerin apoptozise yönlendirici etkisiyle açıklamıştır. Başka bir çalışmada ise, likenlerden izole edilen epigallokatektin gallet, quercetin, gallik asit curcurin, eugenol bileşiklerinin polimeraz enzim aktivitesini azaltarak yaşlanmaya karşı etkisi ve apoptozise hücreleri yönlendirmek suretiyle antikanser özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Fujisava *et al.* 2002; Lin *et al.* 2003). Bunlara ek olarak, protolikeesterinik asidi, lobarik asit, usnik asidin tümör oluşumu üzerine etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Cardenelli *et al.* 1997; Lin *et al.* 2003; Bucar *et al.* 2004). Ayrıca likenlerden izole edilen vulpinik asidin *Spodoptera ornithogelle* türlerinde larval periyotta ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (Slansky 1979).

Tez çalışmasında kullanılan likenlerin içerdiği oldukları liken asitlerine bakıldığında; *Dermatocarpon miniatum* Eschw. liken türünün D-mannitol, sorbitol, sükroz, trehaloz, D-volemitol gibi maddeler içerdiği, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale'nın atranorin, protosetrarik asit,(+) usnik asit, kaperatik asit, D- arabitol, mannitol, polisakkaritlerden üreaz; *Letharia vulpina* (L.) Hue'nın ise norstiktik asit, vulpinik asit, arabitol, erythritol, galaktosit, glukoz, lichenin, mannitol, sukroz, sitrik asit, glikolik asit, malik asit, alanin, aspartik asit, glisin, serin, tiyozin, valine, ve atranorin gibi kuvvetli asitler içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca *Parmelia saxatilis* (L.) Ach.'te atranorin, lobarik asit, salisilik asit, belirlenemeyen bazı yağ asitleri, arabitol, fruktoz, galaktoz, ribitol, sükroz, volemitol, üreaz gibi maddelerin yanı sıra bazı metallerin bulunduğu ve bunların da demir, manganez ve çinko olduğu saptanmıştır. *Parmelia sulcata* Taylor içeriğinde ise atranorin, salisilik asit, enzimler, üreaz; *Ramelina farinacea* (L.) Ach ise içerik olarak protosetrarik asit, (+) usnik asit, (+) arabitol, mannitol sahip oldukları bildirilmiştir.

*Usnea articulata* (L.) Hoffm. ve *Usnea filipendula* Stirt. da ise usnik asit; *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E.Mattsson & M.J.Lai de ise özellikle (-) usnik asit, pinastrik asit, vulpinik asit gibi kuvvetli zehir etkisi yapan asit türlerinin yanı sıra yüksek yağ asitleri, depsitler ve depsidonların mevcudiyeti bildirilmiştir (Culberson *et al.* 1977; Huneck 1999).

Canlı vücudunda gerçekleşen metabolik ve fizyolojik olaylar neticesinde yan ürün olarak ROT üretilmekte ve bunların canlıda zararlı oksidatif reaksiyonları oluşabilmektedir (Erel 2004). Yapılan çalışmalarla serbest radikallerin DNA üzerinde, proteinlerde ve lipitlerle beraber vücudun diğer yapılarında da oksidatif stres durumundan dolayı hasara neden olduğu belirlenmiştir (Çakatay ve Kayalı 2004). Serbest radikaller canlı nükleusunda DNA'ya zarar vererek genotoksik ve mutajenik etkilere sebep olmaktadır. Serbest radikaller kalıtsal materyaldeki pürin ve pirimidin modifikasyonlarına, kansere yatkınlığı olan gen bölgelerinin aktivasyonlarına, DNA veya kromozom kırılmalarına neden olduklarından dolayı son derece önemlidirler (Seven ve Candan 1995; Barrington *et al.* 1996).

Aflatoksinlerin ROT'ların seviyesinde artışa neden oldukları bildirilmektedir (Lee *et al.* 2005). Aflatoksinlerin ROT'ların artmasına neden olmasından dolayı serbest radikaller DNA, protein ve lipidlerle kolayca reaksiyona girerek DNA'nın yapısında mutasyonlara, proteinlerin yapısına bağlanarak proteinlerde yapı değişikliklerine ve dolayısıyla da proteinlerin oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olan  $\cdot\text{OH}$  radikalinin salınımına neden olmaktadır (Bedard and Massey 2006).

ROT'ların canlıya verdiği zararların azaltılmasını, giderilmesini veya başka moleküllere çevrilmesini antioksidan sistemler sağlamaktadır. Bundan dolayı birçok araştırmacı herhangi bir maddenin antimutajenik olmasında antioksidan sistemin yattığını vurgulamaktadır. Bu durum neticesinde antimutajenik özelliği tespit edilen 10 farklı liken türlerinin antimutajenitesinin antioksidan özelliğinden dolayı olup olmadığına bakılmıştır. Yapılan antioksidan özellik belirleme çalışmasında, AFB<sub>1</sub>'in SOD, GPx aktivitesi ve GSH üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Araştırma neticesinde AFB<sub>1</sub>'in

SOD, GPx aktivitesini ve GSH seviyesini düşürdüğü, buna karşın 3 farklı dozda uygulanan liken ekstraları muamelesinden sonra bu enzimlerin aktivitelerinin ve seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Böylece 10 farklı liken türünün total ekstralarının antimutajenik özelliğinin antioksidan kapasitesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmada kontrol grubunda ki SOD ve GPx aktivitesiyle GSH ve MDA seviyesi sadece AFB<sub>1</sub> verilen grupla karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001).

Antioksidan sistemin enzimatik olan ve en önemlilerinden birisi de süperoksit radikallerinin O<sub>2</sub> veya daha az reaktif olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e dönüştürülmesi işlemi yapan SOD enzimidir (Mc Cord and Fridovich 1969).

Verma ve Nair'in (2001), yapmış olduğu çalışmada total aflatoksin kullanımı çalışmasında (25 veya 50 mg/aflatoksin/hayvan/gün) ve Kotan vd (2013) çalışmalarda aflatoksinin DNA ve protein miktarını azalttığı veya yapısında bozulmalara neden olduğu ve ayrıca, SOD enzim aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Çeker vd (2012); Alpsöy vd (2011) ve Kotan vd (2011,2013) insan lenfositleri üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda, Preetha vd (2006)'ni ratların karaciğeri üzerine yapılan çalışmalarda, AFB<sub>1</sub>'in kontrol grubuna nazaran SOD aktivitesini ciddi oranda düşürdüğü belirlenmiştir (Preetha *et al.* 2006; Alpsöy vd 2011; Kotan vd 2011; Çeker 2012;). Ayrıca Eraslan vd (2005)'nin yapmış oldukları çalışmada Ross PM3 ırkı piliçlere aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) besinler verildiğinde de kan parametrelerinin incelenmesi sonucunda SOD aktivitesinin azaldığı görülmüştür (Eraslan vd 2005).

Tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında da elde edilen sonuçlar ile literatür sonuçları örtüşmektedir. AFB<sub>1</sub>'den kaynaklanan oksidatif stres durumunda SOD enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir. Bu durumun sebeplerinden ilki, ROT'ların enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yapmaları, ikincisi ise ROT'ların proteinlere bağlanmak suretiyle proteinlerde yapısal değişikliklere neden olarak

proteinlerin oksidasyonuna sebebiyet vermesi şeklinde açıklanmıştır (Venkataraman *et al.* 2004).

Antioksidan sistem içerisinde yer alan önemli diğer bir enzim ise hidroperoksitlerin ortadan kaldırılmasında son derece büyük öneme sahip GPx enzimidir (Armstrong 1998). Daha önce yapılmış olan çalışmalara bakıldığında AFB<sub>1</sub>'in GPx aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Alpsoy vd 2011; Kotan vd 2011; Çeker 2012). Ratlarla yapılan çalışmalara da bakıldığında AFB<sub>1</sub>'in karaciğerde GPx aktivitesini kontrol grubuna nazaran düşürdüğü ve bunun da istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (p<0.001) (Preetha *et al.* 2006).

Yine daha önceki çalışmalar incelendiğinde AFB<sub>1</sub>'in total olarak kullanımının da, Ross PM3 ırkı piliçlere aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) besin verilerek yapılan çalışmada, AFB<sub>1</sub>'in DNA, RNA, protein miktarında ve GPx enzim aktivitesinde önemli derecede azalma meydana getirdiği belirtilmiştir (Verma and Nair 2001).

AFB<sub>1</sub>'in neden olduğu oksidatif stresin GPx aktivitesini düşürmesinin sebeplerinden birisi, ROT'ların enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yapmasıdır. Diğer bir neden de, ROT'ların proteinlere bağlanmak suretiyle proteinlerde yapısal değişikliklere neden olmasıdır. Dolayısıyla buna bağlı olarak da proteinlerin oksidasyonuna neden olmalarıdır (Janssen *et al.* 1993; Preetha *et al.* 2006). GPx aktivitesinin azalmasında bir başka neden de GPx aktivitesinin GSH miktarına bağlı olmasıdır. Oksidatif stres GPx aktivitesinin azalmasına neden olarak GSH miktarını azaltmakta (Preetha *et al.* 2006), buna bağlı olarak da GPx aktivitesi azalmaktadır. Özetle GPx aktivitesinin azalması GSH'ın azalmasına, GPx sentezinin azalmasına, enzim bozulmasının artmasına ve enzimin inaktivasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir (Janssen *et al.* 1993; Krishnamoorthy *et al.* 2007).

Oksidatif stres canlıda lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya MDA çıkmaktadır. Bu durum ise lipid peroksidasyonunu gösteren parametrelerden birisidir (Seven ve Candan 1995). AFB<sub>1</sub> lipid peroksidasyonunun

dolayısı ile de onun bir ürünü olan MDA miktarının artmasına neden olur (Shen *et al.* 1994).

Daha önceki çalışmalarda AFB<sub>1</sub>'in kontrol grubuna nazaran MDA miktarını aşırı derecede arttırdığı ve aradaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Ratların karaciğerlerinde yapılan çalışmalarda, AFB<sub>1</sub> verilen grupta lipid peroksidasyonunun aşırı derecede arttığı buna bağlı olarak da MDA miktarının kontrol grubuna nazaran yükseldiği gözlenmiştir (Preetha *et al.* 2006). Yine Ross PM3 ırkı piliçlere aflatoksinli yem verilmiş 15, 30 ve 45. günlerinde kan alınarak MDA miktarı ölçülmüş, MDA miktarı kontrol grubuna göre artma göstermiştir (Eraslan vd 2005).Yaptığımız çalışmada ise kontrol grubundaki MDA miktarının düşük, , AFB<sub>1</sub> verilen grupta ise çok daha yüksek olarak ölçülmüştür. AFB<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile OH<sup>-</sup> iyonu miktarını arttırmış ve bu durum da lipid peroksidasyonuna sebep olmuştur. Bundan dolayı da MDA miktarını artırdığı bildirilmiştir (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Alpsoy 2008; Kotan 2010; Çeker 2011).

Aflatoksinlerin MDA seviyesini artırmalarının nedeni çeşitli araştırmacılar tarafından ROT'ların artışına ve bunun da lipid peroksidasyonunu artırmasına bağlanmıştır (Verma and Nair 2001; Lee *et al.* 2005; Bedard and Massey 2006; Alpsoy vd 2011, 2009; Kotan vd 2011; Çeker 2012).

AFB<sub>1</sub> ile beraber likenlerin total ekstraktların verilmesiyle kültürlerde genel anlamda SOD, GPx aktivitesi ile GSH seviyeleri artmış, MDA seviyesi ise azalmıştır. Bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. ( $p<0.001$ ).

Daha önceki çalışmalar likenlerin antimikrobiyal, antimutajenik ve antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Ogmundsdottir *et al.* 1998; Olafsdottir 1999; Orange *et al.* 2001; Geyikoğlu ve Turkez 2006; Kotan vd 2012,2013;).

Yapılan çalışma ve daha önceki araştırmalar likenlerin antioksidan özelliğe sahip olduklarını ortaya koymuştur. Likenlerin bu antioksidan özelliği yapılarında bulunan

sekonder metabolitlerden, flavonoidlerden, epigallokatektin, gallat, quercetin, gallik asit, kurkumin, eugenol, fatty asitler, lakton, antrhraquinon, depsid, depsidon, tridepsidon gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Fujisawa *et al.* 2002; Atsumi *et al.* 2005).

Kosanic *et al.* (2013)'in yapmış olduğu çalışmada *Evernia prunastri* (L.) Ach. ve *Pseudevernia furfuraceae* (L.) Zopf.'dan elde edilmiş olan 3-Hidroksifisodalik asit, fisodik asit, evernik asit, usnik asit, atronorin ve kloroatranorinin antioksidan özelliğinin olduğunu bildirmişlerdir (Kosanic *et al.* 2013).

Manojlovic *et al.* (2012)'in yapmış olduğu çalışmada ise *Parmelia caperata* (L.) Hale., *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. ve *Parmelia sulcata* Taylor liken türlerinden elde edilen fenolik bileşiklerden olan protosetrarik ve usnik asidin, depsidon grubundan olan salizilik asit ile likenlerin temel maddelerinden olan atranorin ve kloroatranorinin antioksidan aktivitelerin olduğunu belirlemiştir (Manojlovic *et al.* 2012).

Rankovic *et al.* (2012)'nin yaptığı çalışmalar üç farklı liken türünden elde edilen norstiktik asit, usnik asidin kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olduklarını bildirmiştir (Rankovic *et al.* 2012).

Bayır vd (2006)'nın liken ve likenden elde edilen liken asidiyle yapmış olduğu çalışmada da, *Usnea longissima* Ach. liken türü ve ondan elde edilmiş olan difraktaik asidin güçlü antioksidan aktivitesini göstermişlerdir (Bayır vd 2006).

Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında likenlerin güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları ve bu antioksidan kapasitesinin yapılarında bulunan liken asitlerinden kaynakladığı düşünülmüştür.

Bu tez kapsamında kullanılan Ames/*Salmonelle* ve *E. Coli* WP2 test sistemleriyle ve MN yöntemi ile yapılan 10 farklı liken türünden elde edilen çalışmalar değerlendirildiğinde daha önceki çalışmalar genellikle tek bir organik çözücü

kullanılarak ekstraksiyonun yapıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ise, liken maddeleri için kullanılan 4 farklı organik çözücü kullanılmış ve bunlar birleştirilerek total ekstre elde edilmiştir. Bu bakımdan çalışmamız bir ilki teşkil etmektedir. Ayrıca kullanılan liken türlerine bakıldığında da bu türlerin daha önce kullanılmadığı veya kullanılan iki türün ise tez kapsamında çalışılan mutajenite ve antimutajenite testleri bakımından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu tezde aynı anda hem prokaryotik çalışma hem de ökaryotik çalışma yapılmıştır. Bu durum göz önüne alında çalışma önemli bir boşluğu doldurmaktadır. Bundan dolayı yapılan bu tez liken dünyası ve literatür çalışmaları için önem arz etmektedir.

### 5.1. Öneriler

Mutajen maddelerin canlıya verdiği zararlar ile ilgili birçok çalışma günümüzde mevcuttur ve hala da araştırmalar devam etmektedir. Bu zararların belirlenmesinde ve toksik etkinin engellenmesinde birçok test sistemiyle materyaller kullanılmaktadır. Bu test sistemleri içinde prokaryotik ve ökaryotik testler yer almaktadır. Çalışılan tez prokaryotik ve ökaryotik çalışmaları beraber içerdiğinden dolayı son derece önemlidir. Fakat prokaryotik çalışmada doza bağımlı olmadığı tespit edilen antimutajenik etkinin kaynaklanma sebepleri yapılacak daha hassas çalışmalar ile belirlenebilir.

Daha önceki çalışmalar AFB<sub>1</sub>'in mutajenik ve kanserojenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda kullanılan liken türlerinden elde edilen ekstratlar genel olarak tek bir organik çözücünden (metanol veya aseton) geçirilerek elde edilmiştir. Buna karşın likenlerde farklı yapıda organik moleküller bulunmakta ve bunların polariteleri de farklılık arz etmektedir. Bundan dolayı bu tez kapsamında kullanılan 4 farklı çözücü apolardan polara doğru sıralanarak kullanılmış, likenin içeriğinde bulunan tüm organik moleküllerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için yapılan çalışma, total ekstre çalışılması bakımından ilk ve önemli bir çalışma olduğu belirlenmiştir. Fakat her bir likenin elde edilen total ekstre ile kullanılan çözücülerin tek tek karşılaştırılması olarak çalışılması aradaki farklılıkların belirlenmesi açısından daha kapsamlı sonuçlar ortaya koyacağı düşünülmektedir.



Prokaryotik ve ökaryotik çalışmalar karşılaştırıldığında sonuçların birbirini desteklemekle beraber bazı sapmaların olduğu görülmüştür. Bu durum kullanılan test sistemlerin farklı mekanizmalar ve değişik hassasiyetlere sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu bakımdan yapılan çalışmanın hassasiyetlik derecesi artırılması bakımında önemli görülmüştür.

Liken ekstraktlarının AFB<sub>1</sub>'in neden olduğu genotoksik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine antogonistik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda antigenotoksiteden sorumlu olan bitki ekstraktlarının kimyasal bileşenleri aydınlatılarak, etken maddenin izole edilip aktivitelerinin hangi derecede etkili olduğu araştırılması yapılabilir. Ekstratların antimitojenite aktiviteleri serbest radikalleri toplayabilme özelliğinden veya multifaktoriyel kaynaklı olabilir. Bu durumun kullanılan farklı test sistemleriyle örtüştüğü görülmüştür. Bu sebeple likenlerin antimitojenite etki mekanizması ayrıntılı olarak çalışılabilir. Bundan sonraki çalışmaların bu noktaya odaklanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Abdullaev, L., Riverón-Negrete, H., Caballero-Ortega, J., Manuel Hernández, I., Pérez-López, R., Pereda-Miranda J., and Espinosa-Aguirre, J., 2003. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.), *Toxicol. In Vitro*, 17:731–736.
- Acar, A., Durakbaşı, HG., Paydak, F.1995. Alüminyum sülfatın insan periferel kan lenfosit kültürlerinde mikronukleus uyarımı üzerine etkileri. SÜ Tıp Fak Derg.,11:139-44.
- Ahad, AM., Goto, Y., Kiuchi, F., Tsuda, Y., Kondo, K., Sato ,T., 1991. Nematocidal principles in “oakmoss absolute” and nematocidal activity of 2,4-dihydroxybenzoates. *Chem Pharm Bull*, 39:1043–1046.
- Ağar, G., Güllüce, M., Aslan, A., Bozari, S., Karadayı, M. & Orhan, F. 2010. Mutation preventive and antigenotoxic potential of methanol extracts of two natural lichen. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 4(20):2132-2137.
- Akkaya, MR., 2011. Süt Sığırlarında Aflatoksin B<sub>1</sub> İçeren Yemlerin Toksin Bağlayıcılar İle kontrolü ve Aflatoksin M<sub>1</sub> Oluşumunun Saptanması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Akkuş, İ., 1996. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Mimoza Yayınları.
- Akkuş, İ., Kalak, S., 1996. "Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus." *Clinica chimica acta*, 244(2): 221-227.
- Alekperov, UK., Ames, BN., Kada, T. and Wattenberg, LW., 1986. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutation Research*, 168:47-65.
- Alpsoy, L., Orhan, F., Nardemir, G., Agar, G., Gulluce, M., Aslan, A. 2013. Antigenotoxic potencies of a lichen species, *Evernia prunastri*. *Toxicology and Industrial Health*. DOI:10.1177/0748233712469655.
- Alpsoy, L., Yalvac ME., 2011. Key Roles of Vitamins A, C, and E in Aflatoxin B<sub>1</sub>-Induced Oxidative Stress.Vitamin and Immune System. Ed: Gerald Litwack, *Vitamins and Hormones*, Vol. 86, Burlington: 287-305. ISBN: 978-0-12-386960-9.
- Alpsoy, L., Aslan, A., Kotan, E., Agar, G. & Anar, M. 2011. Protective role of two lichens in human lymphocytes in vitro. *Fresenius Environmental Bulletin*. V. 20(7): 1661-1666.
- Alpsoy, L., Agar, G. and Ikbal, M., 2009. Protective role of vitamins A, C, and E against the genotoxic damage induced by aflatoxin B<sub>1</sub> in cultured human lymphocytes. *Toxicol Ind Health* 25:183-188.
- Alpsoy, L., 2008. İnsan Lenfosit Kültürlerinde Aflatoksin B<sub>1</sub>' İin Neden Olduğu Genotoksik Ve Biyokimyasal Değişiklikler Üzerine A, C Ve E Vitaminlerinin Antagonistik Etkisi. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Altun, D., 2007. *Usnea longissima* Ach. Likenin Drosophila Melanogaster' İin Çeşitli Gelişim Parametreleri Ve Ömür Uzunluğu Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Anonim, 2013, <http://dogaokulu.net/notlar/likenler.pdf>
- Anonymous, 2013a, <http://www.earthlife.net/lichens/intro.html>.
- Anonymous, 2013b, [http://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces\\_cerevisiae](http://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)
- Anonymous, 2013c, [http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus\\_test.htm](http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm)
- Armstrong, DA., 1998. *Methods in molecular biology*. Volume 108, Toronto, Humana Press.
- Arslan, R., 2013. Türkiye’de Üretilen Bazı Organik Baharat Ve Bitkisel Çayların Aflatoksin B<sub>1</sub> Düzeyleri Ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Aruoma, O., Kauai, H., Halloween, B., 1991. Oxygen free radicals and human disease. *Journal of the Royal Society of Health*, 111(5): 172–177.
- Asahina, Y., 1967. Lichenologische Notizen (205). *J Jap Bot*, 42: 289– 294.
- Aslan, A., Gulluce, M., Agar, G., Karadayı, M., Bozari, S., Orhan, F., 2012. Mutagenic and antimutagenic properties of some lichen species grown in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Cytology And Genetics*, 46(5): 291-296.
- Aslan, A., Agar, G., Alpsoy, L., Kotan, E., Ceker, S. 2011. Protective role of methanol extracts of two lichens on oxidative and genotoxic damage caused by AFB<sub>1</sub> in human lymphocytes in vitro. *Toxicology and Industrial Health*. 28(6):505-512.
- Aslan, A., Budak, G., Tıraşoğlu, E., Karabulut, A., 2006. Determination of elements in some lichens growing in Giresun and Ordu province (Turkey) using energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative transfer* 97: 10-15.
- Aslan, A., Yazıcı, K & Karagöz, Y., 2002. Lichen Flora of the Murgul District, Artvin, Turkey. *Israel Journal of Plant Sciences*, Vol; 50:77-81.
- Aslan, A., 2000. Lichens from the Regions of Artvin, Erzurum, and Kars, Turkey. *Israel Journal of Plant Sciences*, 48:143-155.
- Aslan A., Güllüce M. Ve Ögütçü H., 1999. Bazı Likenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma. *Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi*, 22(2): 19-26.
- Aslan, A., Öztürk, A., Kaya, E., 1998. Likenlerin ekonomik önemi ve Oltu bölgesinden tesbit edilen önemli liken türleri. Geçmişten geleceğe Oltu ve Çevresi Sempozyumu, Erzurum.
- Aslan, A., 1995. Erzurum-Kars-Artvin arasında yer alan bölge likenleri üzerine taksonomik incelemeler. Doktora tezi, Uludağ üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Bursa.
- Aslan, A., Öztürk, A., 1994. Oltu (Erzurum) Yöresine ait liken florası üzerine çalışmalar. *Tr J Botany*, 18:103–106.
- Atsumi, T., Fujisawa, S., Tonosaki, K., 2005. Relationship between intracellular ROS production and membrane mobility in curcumin- and tetrahydrocurcumin-treated human gingival fibroblasts and human submandibular gland carcinoma cells. *Oral Diseases* 11 (4), 236–242.
- Aubrecht, J., Narla R.K., Ghosh P., Stanek J. and Uckun F.M., 1999. Molecular Genotoxicity Profiles of Apoptosis-Inducing Vanadocene Complexes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154:228–235.
- Bahçeci, Z., 2007. *Moleküler Biyoloji*. Göktuğ Basın Yayın Dağıtım ve Pazarlama, 323 s, Amasya.

- Bahçekapılı, N., Üzüm G., 2007. The relationship between erythropoietin pretreatment with blood-brain barrier and lipid peroxidation after ischemia/reperfusion in rats. *Life Sciences* 80(14): 1245-1251.
- Baron, G., 1999. *Understanding Lichens*. Richmond Publishing Slough, England.
- Barondeau, DP., Kassmann, CJ., Bruns, CK., Tainer, JA., Getzoff, ED., 2004. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*, 43: 8038–8047.
- Barrington, JW., Lindsay, P., James, D., Smith, S. and Roberts, A., 1996. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 103:130-132.
- Bastien, JW., 1983. Pharmacopoeia of the Qollahuaya Andeans. *Journal of Ethnopharmacology*, 8: 97-111.
- Basu, TK., Temple, NJ., Garg, ML., 1999. *Antioxidants in Human Health and Disease*. New York, CABI Publishing, 2. Bölüm, 15–17.
- Bayır, Y., Odabasoglu, F., Cakir, A., Aslan, A., Suleyman, H., Halici, M. and Kazaz, C., 2006. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 13: 584-590.
- Bedard, LL. and Massey, TM., 2006. Aflatoxin B(1)-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, 164:584-22.
- Behera, BC., Verma, N., Sonone, A. and Makhija, U., 2005. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytotherapy Research*. 19: 58–64.
- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, RM., 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions*, 31: 1441–1444.
- Biswas, K., 1956. *Common medicinal plants of Darjeeling and the Sikkim-Himalayas*. pp: 90.
- Boehme, DS., Hatchkiss, JA. and Handerson, RF., 1992. GSH and GSH dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone. *Experimental and Molecular Pathology*, 56: 37–48.
- Boustie, J., and Grube, M., 2005. Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2): 273–287.
- Bradford, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brigelius-Flohe, R. and Traber MG., 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13:1145 -1155.
- Brodo, IM., Sharnoff, SD., Sharnoff, S., 2001. *Lichens of North America*. New Haven & London. Yale University Press.
- Brown, T.A., 2007. *Genomes 3*. Garland Science Publishing, 713 p, New York, USA.
- Bucar, F., Schneider, I., Ogmundsdottir, H., Ingolfssdottir, K., 2004. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine*, 11: 602–606.
- Bukan, N., 1999. Glibenklamidin streptozotosin-diabetik ratlarda kalp dokusu süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerine etkisi. *Uzmanlık Tezi*. Ankara Gazi Üniversitesi.

- Canavar, Ö., 2011. Farklı Hasat Zamanlarının Yerfıstığı'nın Verim Ve Verim Unsurları İle Yağ Asitleri Kompozisyonu Ve Aflatoksin Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Chan, HT., Chan, Ho JW., 2003. Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in hepatoma cells. *Toxicology*. 30: 211–217.
- Chao, JC., Huang, CH., Wu, SJ., Yang, SC., Chang, NC., Shieh, MJ. and Lo, PN., 2002. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 13: 427–434.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, MC., Mecocci, C., 2005. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 39: 841–852.
- Cardarelli, M., Serino, G., Campanelli, L., Ercole, P., De Cicco Nardone, F., Alesiani, O., Rossiello, F., 1997. Antimitotic effects of usnic acid on different biological system. *Cell Molecular Life Sciences* 53: 667–672.
- Caumont, AB., Gordon A., Pichuanes JS., Litvak ATNS., Dupont CH., 1996. Expression of functional HIV-1 integrase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* leads to the emergence of a lethal phenotype: potential use for inhibitor screening. *Current Genetics*, 29: 503–510.
- Ceker, S., Agar, G., Nardemir, G., Anar, M., Kizil, HE., Alpsoy, L., 2012. Investigation of Anti-oxidative and Anti-genotoxic Effects of *Origanum vulgare* L. Essential Oil on Human Lymphocytes In vitro. *Jeobp*, 15(6): 997 – 1005.
- Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, PL., Sava, G., 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89:137–146.
- Cruz, AD., McArthur, AG., Silva, CC., Curado, MP., Glickman, BW., 1994. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat Res.*, 313:57–68.
- Culberson, CF., Culberson, WL., Johnson, A., 1977. Second supplement to Chemical and botanical guide to lichens products. *Am. Bryol. Lichenol. Soc. St. Louis*.
- Culberson, CF., 1969. Chemical and Botanical guide to Lichen Products. The Univ of North Carolina Press Chapel Hill.
- Çakatay, U., Kayalı, R., 2004. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrah Paşa Tıp Derg*, 35:140-149.
- Çeker, S., 2011. İnsan Lenfosit Kültürlerinde Aflatoksin B<sub>1</sub>'in Neden Olduğu Genotoksik Ve Biyokimyasal Değişiklikler Üzerine Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Bitkilerin Esansiyel Yağlarının Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çolakoğlu, KF., 2012. Koçlarda Aflatoksinin Karaciğer İle Böbrek Üzerine Etkileri Ve Glukomannan (Eg)'In Koruyucu Etkinliği. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Çora, T., Demirel, S., Acar, A., Erkul, İ., 1992. Yenidoğan periferel kan lenfosit kültürlerinde fototerapinin uyardığı mikronukleuslar. *SÜ Tıp Fak Derg*. 8:345-51.
- Davis, EW. and Yost JA., 1983. Novel hallucinogens from Eastern Ecuador. *Botanical Museum Leaflets. Harvard University*, 29(3): 291-295.
- Demirel, S., Zamani, G., 2002. *Genel Tıp Derg*. 12(3):123-12.
- Dilsizoğlu, A., Kavuncuoğlu, Z., Oba, D., 2004. Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. *Tübitak Bilim ve Teknik*, 439: 86–89.

- Dobson, FS., 2005. Lichens: An Illustrated Guide to British and Irish Species, by Fifth Edition Richmond Publishing.
- Dülger, B., Gücin, F., Aslan, A., 1998. *Cetraria islandica* (L) Ach likeninin antimikrobiyal aktivitesi. Tr J Biology, 22: 111–118.
- Dülger, B., Gücin, F., Kara, A., Aslan, A., 1997. *Usnea florida* (L) Wigg likeninin antimikrobiyal aktivitesi. Tr J Biology, 21: 103–108.
- El-Zawahri, MM., Morad, MM., Khishin, AF., 1990. Mutagenic effect of aflatoxin G1 in comparison with B1. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 10(1-2): 45-51.
- El-Zawahri, M., Moubasher, A., Morad, M., El-Kady, I., 1977. Mutagenic effect of aflatoxin B1. Annales de la nutrition et de l'alimentation, 31: 859–866.
- Emmerich, R., Giez, I., Lange, OL et al. 1993. Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. Phytochemistry, 33(6): 1389-1394.
- Emsen, B., Yildirim, E., Aslan, A., Anar, M. And 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(2):1455-149.
- Eom, SY. Yim, DH. Zhang, Y. Yun, JK. Moon, SI. Yun, HY. Song, YJ. Youn, SJ. Hyun, T. Park, JS. Kim, BS. Lee, JY. Kim, YD. Kim, H., 2013. Dietary aflatoxin B1 intake, genetic polymorphisms of CYP1A2, CYP2E1, EPHX1, GSTM1, and GSTT1, and gastric cancer risk in Korean. Cancer Causes Control, 24, 1963–1972.
- Eraslan, G., Akdoğan, M., Yarsan, E., Şahindokuyucu, F., Eşsiz, D., Altıntaş, L., 2005. The Effects of Aflatoxins on Oxidative Stress in Broiler Chickens. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 701–707.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clinical Biochemistry, 7: 112-119.
- Evans, FJ. and Schmidt RJ., 1980. Plants and plant products that induce contact dermatitis. Planta Medica, 38: 289.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res, 455: 81-95.
- Fenech, M., 1993. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. Environmental Health Perspectives Supplements, 101(3): 101-107.
- Fenech, M., Morley, AA., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes. Cytobios, 42: 32-46.
- Fenech, M., Morley, AA., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. Cytobios, 43:33-46.
- Fousteri, M., Mullenders, LH., 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. Cell Research, 18(1): 73-84.
- Fridovich, I., 1985. Superoxide radical and superoxide dismutase regularities and irregularities. Harvey Lectures, 79, 51-75.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., 2002. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. Toxicology, 177(1): 39–54.
- Galun, M., 1988. Handbook of Lichenology, CRC Pres Inc., Florida.

- Gatehouse, DG., Rowland, IR., Wilcox, P., Callander, RD. and Foster, R., 1990. Bacterial mutation assay, Basic Mutagenicity Ukems recommended procedures (Ed: Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.
- Geyikoğlu, F., Türkez, H., 2006. Protective effect of sodium selenite against the genotoxicity of aflatoxin B1 in human whole blood cultures. *Brazilian Archives of Biology And Technology*, 49: 393–398.
- Giez, I., Lange, OL. and Proksch, P., 1994. Growth retarding activity of lichen substances against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22(2): 113-120.
- Girotti, AW., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2): 87-95.
- Gonzalez-Tejero, MR., Martinez-Lirola, MJ., Casares-Porcel, M., Molero-Mesa, J., 1995. Three lichens used in popular medicine in eastern Andalućia (Spain). *Economic Botany* 49(1): 96-98.
- Gözükara, EM., 1997. *Biyokimya*. İstanbul, Evin Matbaası.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kufrevioglu, OL., Aslan, A., 2002. Determinations of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *J. Ethnopharm.* 79: 325–329.
- Gulluce, M., Agar, G., Aslan, A., Karadayı, M., Bozari, S., Orhan, F. 2011. Protective effects of methanol extracts from *Cladonia rangiformis* and *Umbilicaria vellea* against known mutagens sodium azide and 9-aminoacridine. *Toxicology and Industrial Health*, 27(8): 675-82.
- Gutteridge, JMC., Halliwell, B., 1994. *Antioxidants in nutrition, Health And Disease*. New York. Oxford University Pres.
- Gücin, F., Dülger, B., Aslan, A. 1997. *Pseudoevernia furfuracea*(L.) Zopf. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 7(25): 22-24.
- Güley, Z., 2008. Doğal Üretilen Küflü Peynirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B<sub>1</sub> Ve Aflatoksin M1 Üzerine Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir.
- Güllüce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adigüzel, A, Agar, G., & Sokmen, A. 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*, 13: 515-521.
- Halıcı, MG. ve Aksoy A., 2004. Erciyes Dağı'ndan Türkiye için yeni bir liken türü, *Sporastatia polyspora* (Nyl.) Grumann. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, özet kitapçığı, 100, Adana.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition, Oxford Science Publications, 22–24.
- Halliwell, B. and Gutteridge, JMC., 1996. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. 2nd Edition Clarendon Pres.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet*, 23, 1396-1398.
- Hartman, PE., Shankel, DM., 1990. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molekules. *Environ. Mol. Mutagen.* 15: 145-182.
- Hedde, JA., Countryman, RI., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 41:321-32.

- Heath, RL. and L. Packer 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198.
- Hitzeman, RA., Hagie, FE., Levine, HL., Goeddel, DV., Ammerer, G. and Hall BD. 1981. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, 293 (5835): 717-22.
- Hollis, RP., Killham, K. and Glover, LA., 2000. Design and Application of a Biosensor for Monitoring Toxicity of Compounds to Eukaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4):1676–1679.
- Honda, NK. and Vilegas, W., 1998. The chemistry of lichens. *Química Nova*, vol. 21(1): 110-125.
- Hsu, IC., Metcalf, RA., Sun, T. *et al.* 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas [see comments]. *Nature*, 350: 427-428.
- Huneck, S., 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86: 559–570.
- Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of lichen substances. Springer and Berlin Heidelberg, New York.
- Ingólfssdóttir, K., 2002. Molecules of interest: usnic acid. *Phytochemistry*, 61: 729– 736.
- Jagetia, GC., Jacob, PS., 1994. The influence of vinblastine treatment on the formation of radiation-induced micronuclei in Mouse bone marrow. *Hereditas*, 120:51-59.
- Jagetia, GC., Jayakrishnan, A., Fernandes, D., Vidyasagar, MS., 2001. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res.* 491:9-16.
- Janssen, YM., Van Houten, B., Borm, PJ., Mossman, BT., 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory. Investigation*, 69: 261–274.
- Jeong, JY. and Jue DM., 2000. Murine pro-tumor necrosis factor expressed in *Saccharomyces cerevisiae* HF7c localizes to membrane/particulate. *Experimental and molecular medicine*, 32(2): 61-66.
- Jin, S. and Levine, AJ., 2001. The p53 functional circuit. *Journal of Cell Science*, 114: 4139-4140.
- Joseph, PD. Gruz, P. and Nohmi, T., 1997. Recent advances in the construction of Bacterial genotoxicity Assays, *Mutat. Res.*, 386: 1-23.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., ve Tiftik AM., 1998. *Biyokimya Kitabı*. 1. Baskı, Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi Ünitesi. Konya.
- Karadayı, M., 2010. *Origanum Vulgare* L. Ssp. *Vulgare*'den Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* Mikrozom Ve *E. Coli* Wp2 Test Sistemleri İle Mutajen Ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Karagül, H., Fidancı, UR., Altıntaş , A. ve Sel, T., 2000. *Klinik Biyokimya*. 1. Baskı, Meteksan, Ankara.
- Karamanoğlu, K., 1971. Türkiye'nin önemli liken türleri. *Ankara üniversitesi-eczacılık fakültesi dergisi*. 1(10): 1-50.
- Karapınar, HS., 2013. Bazı Gıdaların Aflatoksin İçeriğinin HPLC Metodu İle Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.



- Kathirgamanathar, S., Ratnasooriya WD., Baekstrom, P., Andersen, RJ. and Karunaratne V., 2006. Chemistry and bioactivity of physciaceae lichens *Pyxineconsocians* and *Geteroderma leucomelos*. *Pharma. Biol.* 44: 217-220.
- Korkmaz, B., 2005. Bazı 2-Sübstitüe perimidin bileşiklerinin mutajenik aktivitelerinin Ames mutajenite testi ile belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kosanic, M., Manojlovic, N., Jankovic, S., Stanojkovic, T., Rankovic, B., 2013. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 112–118.
- Kotan, E., Agar, G., Alpsoy, L., Aslan, A., Erman, F., Nardemir, G., 2013. Anti-Genotoxic And Anti-Oxidative Effects Of *Cladonia rangiformis* Extracts Against Aflatoxin B-1 In Vitro. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(4A): 1139-1143.
- Kotan, E., Alpsoy, L., Anar, M., Aslan, A. & Ağar, G. 2011. Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stres and genotoxic effects of AFB(1) in human lymphocytes in vitro. *Toxicology and Industrial Health*. V. 27(7): 599-605.
- Kotan, E., 2010. İnsan Lenfosit Kültürlerinde Aflatoksin B<sub>1</sub>'in Neden Olduğu Genotoksik Ve Biyokimyasal Değişiklikler Üzerine Bazı Liken Metanol Ekstraktlarının Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., Vignesh, RC., Aruldas, MM., Arunakaran, J., 2007. Ameliorative effect of vitamins ( $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reproductive Toxicology*, 23: 239–245.
- Kurt, T., Aksoy Hİ., 2006. Fındıkta Aflatoksin Analizi. Ünye Ticaret Borsası.
- Kutbay, YB., 2001. Sitokalazin-B ile bloklanan hücrelerde yaşa bağlı Mikronükleus oranları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Samsun.
- Landis, GN. and Tower, J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126: 365–379.
- Lando, C., Hagmar L. and Bonnassi S., 1998. Biomarkers of cytogenetic damage in human and risk of cancer. The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Medicina del Lavoro*, 89: 124-131.
- Lee, JK., Choi, EH., Lee, KG., Chun, HS., 2005. Alleviation of aflatoxin B1 -induced oxidative stress in HepG2 cells by volatile extract from *Allii Fistulosi Bulbus*. *Life Sciences*, 77, 2896–2910.
- Lee, CK., Brown, BG., Rice WY Jr., Doolittle, DJ., 1989. Role of oxygen free radicals in the induction of sister chromatid exchanges by cigarette smoke. *Environ Molecular Mutagen*. 13(1):54-9.
- Li, D., Cao, Y., He, L. et al., 1993. Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*, 14(2): 169-173.
- Lin, X., Cai, YJ., Li, ZX., Chen, Q., Liu, ZL., Wang, R., 2003. Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of cfp-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*. *Biochim Biophys Acta*, 1622: 99–108.

- Long, LH. and Halliwell, B., 2000. Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radical Research*, 32(5): 463-467.
- Luberda, Z., 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*, 5(1): 5-17.
- Manojlovic, N., Rankovic, B., Kosanic, M., Vasiljevic, P., Stanojkovic, T., 2012. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, 19: 1166– 1172.
- Maron, DM. and Ames, BN., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113(3-4): 173-215.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 577–586.
- Mates, JM., Perez-Gomez, C. and De Castro, IN., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32: 595–603.
- Mc Cord, JM., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal Biological and Chemistry*, 244: 60409–60455.
- McLean, M., Dutton, MF., 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology Therapeutics*, 65: 163–192.
- Miyanochara, AL., Imamura T., Araki M., Sugawara K., Ohtomo N. and Matsubara K., 1986. Expression of Hepatitis B Virus Core Antigen Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Synthesis of Two Polypeptides Translated from Different Initiation Codons. *Journal Of Virology*, 59(1): 176-180.
- Mortelmans, K. and Riccio, E.S., 2000. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research*, 455: 61-69.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60.
- Muthuvel, R., Venkataraman, P. Krishnamoorthy, G., Gunadharini, DN., Kanagaraj, P., Jone Stanley, A., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldhas, MM. and Arunakaran, J., 2006. Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats. *Clinica Chimica Acta*, 365: 297 – 303.
- Müller, K., 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens *Appl Microbiol Biotechnol*, 56: 9–16.
- Nardemir, G., Yanmis, D., Alpsoy, L., Gulluce, M., Agar, G., Aslan, A., 2013. Genotoxic, antigenotoxic and antioxidant properties of methanol extracts obtained from *Peltigera horizontalis* and *Peltigera praetextata*. *Toxicology and Industrial Health*. DOI:10.1177/0748233713480207.
- Nash, I., Thomas, H., 1996. *Lichen Biology*. Cambridge University Press 304p, UK.
- Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Wang, S., Sunder, S., Nicklaus, MC., Milne, GWA., Proksa, B., Pommier, Y., 1997. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J. Med. Chem*, 40: 942-946.

- Nishitoba, Y., Nishimura, H., Nishiyama, T. and Mizutani J., 1987. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry*, 26: 3181–3185.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H. and Haramaki, N., 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *American Heart Journal*, 135, 115.
- Ogmundsdottir, HM., Zoega, GM., Gissurarson, SR., Ingolfsdottir, K., 1998. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50: 107–115.
- Ohkawa, H., et al., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95:351-358.
- Olafsdottir, ES., Ingolfsdottir, K., Barsett, H., Paulsen, BS., Jurcic, K., Wagner, H., 1999. Immunomodulating polysaccharides from aqueous extracts of *Cetraria islandica* (Iceland Moss). *Phytomedicine*, 6: 33–39.
- Omarsdottir, S., Freysdottir, J. and Olafsdottir, ES., 2007. Immunomodulating polysaccharides from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*, 14(2-3): 179-184.
- Orange, A., James, PW., White, FJ., 2001. *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. British Lichen Society: London.
- Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Ögüş, A. ve Açık, L., 2009. *Genetik Kavramlar*. Palme Yayıncılık No: 506, 677 s, Ankara.
- Özbek, T., 2006. Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/*Salmonella* Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özkaya Ş. Temiz A. 2003. Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri Ve Detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. Cilt:01, Sayfa 1-21.
- Öztürk, A., 1995. Meme kanserli olguların lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi sıklığı. *Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antalya*.
- Öztürk, A., Aslan, A., 1991. Likenlerin ekonomik özellikleri ve Kuzeydoğu Anadolu'dan bazı liken türleri. *Yüzüncü Yıl Univ, Fen-Edeb. Fak, Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2): 27–42.
- Paglia, DE., Valentine, WN., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70: 158-169.
- Parcell, S., 2002. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Alternative Medicine Review*, 7: 22-44.
- Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P., 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J Agric Food Chem*, 46: 4487–4490.
- Polat, F., 2013. Hatay İli Süt İneği İşletmelerinde Kullanılan Yemlerin Aflatoksin Düzeylerinin Belirlenmesi Ve Bu Yemlerin Kan Parametreleri İle Sütteki Aflatoksin Düzeyleri Üzerine Etkisi. *Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay*.
- Preetha, SP., Kanniappan, M., Selvakumar, E., Nagaraj, M., Varalakshmi, P., 2006. Lupeol ameliorates aflatoxin B1 -induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 333–339.
- Purvis, W., 2000. *Lichens. The Natural History Museum, London*.

- Purvis, OW., Coppins, BJ., Hawksworth, DL., James, PW., Moore, DM., 1992. The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. Natural History Museum Publications in association with The British Lichen Society, London.
- Raju, KR., Appa Rao, AVN., Rao, PS., 1985. Leprapinic acid derivatives with antibacterial activity. *Fitoterapia*, 56: 221-226.
- Rankovic, B., Kosanic, M., Stanojkovic, T., Vasiljevic, P. and Manojlovic, N., 2012. Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituent. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 14707-14722.
- Rawal, S. Coulomb, Jr RA., 2011. Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes: The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254, 349–354.
- Richard F, Muleris M, Dutrillaux B. 1994. The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutat Res*, 316: 1-7.
- Richardson, DHS., 1992. Lichens as Pollution Monitors. Richmond Publishing.
- Richardson, DHS., 1975. The Vanishing Lichens. David and Charles Newton Abbot.
- Rizzini, CT., 1952. The uses of lichens in medicine. *Bras Med*, 66(38-39): 589-96.
- Roncada, T., Vicentini, VEP., Mantovani, MS., 2004. Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and in human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 18: 617–622.
- Rosin, MP. and Stich, HF., 1979. Assessment of the use of the *Salmonella* mutagenesis assay to determine the influence of antioksidants on carcinogen-induced mutagenesis. *International Journal of Cancer*, 23: 722-727.
- Rosin, MP. and Stich, HF., 1978. The inhibitory effect of cysteine on the mutagenic activities of several carcinogens. *Mutation Research*, 54: 73-81.
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Garbarino, J. & Cardile, V., 2008. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sciences*, 83(13-14): 468-474.
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Vanella, L., Cardile, V., Garbarino, J., 2006. Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Anti-Cancer. Drug*. 17: 1163–1169.
- Sadıkoğlu, S., 2011. Yükselti Farkı ve Hasat Dönemlerinin Ordu İli Ticari Fındık Çeşitlerindeki Aflatoksin Seviyesi ve Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Sanders WB., 2004. Bacteria, algae, and phycobionts: maintaining useful concepts and terminology *The Lichenologist*, 36(5): 269–275.
- Seven, A. ve Candan, G., 1995. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim*, 8: 3906-3911.
- Shamberger, JR., Cynthia, L., Beaman, KD. and Kasten, BL., 1979. Antioxidants reduce the mutagenic effect of Malonaldehyde and  $\beta$ -propiolactone. *Mutation Research*, 66: 349-355.
- Shen, HM., Shi, CY., Lee, HP. and Ong, CN., 1994. Aflatoxin B1 induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127: 145-150.
- Sherman F., 2002. Getting Started with Yeast. *Methods Enzymology*. 350: 3-41.
- Slansky, FJR., 1979. Effects of the lichen chemicals atranorin and vulpinic acid upon feeding and growth of larvae of the yellow striped armyworm, *Spodoptera ornithogalli*. *Environmental Entomology*, 8: 865- 868.

- Smela Maryann E, Currier Sophie S, Bailey Elisabeth A, and Essigmann John M. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B<sub>1</sub>: from mutational spectromerty to carcinogenesis. *Carsinogenesis* Vol.22, No.4, pp:535-545.
- Smith, AL., 1975. *Lichens*. Surrey. England: The richmond publishing Co. Ltd.
- Spiteller, G., 2001. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experimental gerontology*, 36(9): 1425-1457.
- Stahl, W. And Sies, H., 2002. Introduction: reactive oxygen species. *Research Monographs*, 1-2.
- Stark, AA., 2010. Chapter 2 Molecular Mechanism of Detection of Aflatoxins and Other Mycotoxins. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. DOI: 10.1007/978-3-642-00725-5\_2.
- Sun, Y., et al., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 34: 497-500.
- Süleyman, H., Yıldırım, D., Aslan, A., Göçer, F., Gepdiremen, A., and Güvenalp, Z., 2002. An investigation Of the Antiinflammatory Effects of an Extract from *Cladonia rangiformis* HOFFM. *Biol. Pharm. Bull.* 25(1): 10-13.
- Şekeroğlu Atlı, Z., Şekeroğlu, V., 2011. Genetik Toksisite Testleri. *Tubav Bilim Dergisi*, Cilt 4(3): 221-229.
- Taylor, TN., Hass, H., Remy, W., Kerp, H., 1995. The oldest fossil lichen. *Nature*, 378: 244.
- Taylor JH., Woods, PS., Hughes, ML., 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 43: 122.
- Thannickal, VJ. and Fanburg, BL., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology*, 279: 1005-1028.
- Thune, PO. and Solberg YJ., 1980. Photosensitivity and allergy to aromatic lichens acids, compositae oleoresins and other plant substances. *Contact Dermatitis*, 6: 81.
- Tokat, ZG., 2004. Ankara Bölgesi Likenlerinin Antimikrobaiyal Aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Turna, G., 2008. Ehrlich asit solid tümör modeli oluşturulmuş farelerde thymus sipyleus ve taurinin karaciğer MDA, glutatyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi.
- Tutel, B., 1986. Liken Biyolojisi Ve Faydaları. *Marmara Üniversitesi-Eczacılık Dergisi*. 2(2): 185-194.
- Ueno, Y., 1985. The toxicology of mycotoxins. *Critical Review in Toxicology*, 14(2): 99-132.
- Üstüner, D., 2011. Kromozom Kırıkları Ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı. *Tubav Bilim Dergisi*, Cilt 4(1): 64-69.
- Valko, M., Rhodes, CJ., Moncola, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidativestress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R., 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res.* 244:95-103.
- Vartia, KO., 1973. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian, V., Hale, M.E. (Eds.), *The lichens*. Academic Press, New York, p. 547.
- Vartia, KO., 1950. Antibiotics in lichens. *I. Ann-Med Ex Biol Fenn*, 27: 46-54.

- Venkataraman, P., Sridhar, M., Dhanammal, S., Vijayababu, M.R., Srinivasan, N., Arunakaran, J., 2004. Antioxidant role of zinc in PCB (Aroclor 1254) exposed ventral prostate of albino rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 608–613.
- Verma, R.J. and Nair, A., 2001. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian Journal Andrology*, 3: 217-221.
- Victorin, K., Busk, L. and Ahlborg, U.G., 1987. Retinol (Vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test. *Mutation Research*, 179: 41-48.
- Williams, J.H., Phillips, T.M., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. and Deepak Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*, 80:1106–1122.
- Woods, J.R., Cavanaugh, J.L., Narkus, E.P., Plessinger, M.A. and Miller, R.K., 2002. The effect of labor on maternal and fetal vitamins C and E. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(5): 1179-1185.
- Wu, J. Xu, W. Zhang, C. Chang, Q. Tang, X. Li, K. Deng, Y., 2013. Trp266 determines the binding specificity of a porcine aflatoxin B1 aldehyde reductase for aflatoxin B1-dialdehyde. *Biochemical Pharmacology*, 86, 1357-1365.
- Wyllie, T. and Morehouse, L., 1977. *Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins*. Marcel Dekker. USA.
- Yamamoto Y., Miura Y., Kinoshita Y., Higuchi M., Yamada Y., Murakami A., Ohigashi H., Koshimizu K., 1995. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chem. Pharm. Bull.* 43:1388–1390.
- Yazıcı, K., Aslan, A., 2006. Distribution of epiphytic lichens and air pollution in the city of Trabzon, Türkiye. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77: 838-845.
- Yılmaz, S., Ozan S., 2003. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell biochemistry and function*, 21(4): 325-330.
- Yoshida, K., Yamazaki, H., Ozeki, S., Inoue, T., Yoshioka, Y., Yoneda, M., et al., 2001. Mitochondrial genotype and radiation-induced micronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro. *Oncol Rep.* 3:615-9.
- Zeyrek, N., 1982. Likenler ve sanayide önemi. IV. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı bildiri kitapçığı, 91-95.
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Ayaz Tuylu, B., Turk, A.O. and Barutca, B., 2008. Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. in vitro. *Phytotherapy Research*, 22: 118–123.
- Zijno, A., Marcon, F., Leopardý, P., Salvatore, G., Carere, A., Crebelli, R., 1994. An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Fd Chem Toxic*, 32:159-63.

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İstanbul Esenler’de doğdu. İlk ve ortaokulu burada tamamladı. Liseyi Kabataş Erkek Lisesi (A.L)’sinde bitirdi. 2002-2007 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi’nde Biyoloji Eğitimini bitirdi. Ortaokulda “Üstün Hizmet Belgesi” ve lisede Kabataş Erkek Lisesi “Onur Belgesi” ve “Özel Plaket” ödülleri almaya hak kazandı. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Doktora programına yerleşti. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitiminde asistan olarak çalışmaya başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.