

**USNİK ASİT BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO*  
KOŞULLARDA RİSK DEĐERLENDİRMEŐİ**

**Zühal POLAT**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ  
2013  
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

USNİK ASİT BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA RİSK  
DEĞERLENDİRMESİ

Zühal POLAT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2013

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

USNİK ASİT BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA RİSK  
DEĞERLENDİRMESİ

Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Zühal POLAT tarafından hazırlanan bu çalışma 23/05/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ali ASLAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

**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

Yüksek Lisans Tezi

### USNİK ASİT BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA RİSK DEĞERLENDİRMESİ

Zühal POLAT

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Ülkemizde yaygın olarak bulunan likenler, mantarlar ve alglerin birlikteliğinden oluşan simbiyotik organizmalardır. Liken sekonder metabolitleri liken birliğinin elemanlarından biri olan mantarlar tarafından üretilen ve genellikle fenolik yapılı olan bileşiklerdir. En yaygın liken metabolitlerinden biri olan usnik asidin (UA) antiviral, antitümör, antiprotozoal, antienflamatuar, analjezik, antipiretik ve antiproliferatif gibi farmakolojik kullanımlarda geniş bir etki yelpazesi olduğu rapor edilmektedir. Ancak, UA'nın kültürleri yapılmış periferik insan kan hücreleri üzerindeki genotoksik ve antioksidan etkileri hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında, periferik insan tam kan kültürlerinde (n=5) UA'nın genetik ve oksidatif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (0-200 µg/ml) liken ekstreleri kültür tüplerine ilave edildi. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesi için Kromozom aberasyonları (KA) ve Mikroçekirdek (MÇ) testleri kullanıldı. Ayrıca, oksidatif değişimlerin belirlenmesi amacıyla biyokimyasal parametreler (Toplam antioksidan kapasite [TAK] ve Toplam oksidatif durum [TOD]) değerlendirildi. *In vitro* test sistemlerimizde, insan lenfositlerinde usnik asidin non-mutajenik olduğu gözlemlendi. Üstelik sonuçlarımız usnik asidin 1 ve 5 µg/ml'lik konsantrasyonlarının kültürleri yapılmış insan kan hücrelerinde TAS seviyelerini arttırdığını ortaya koydu. Diğer taraftan, usnik asit uygulandığı tüm konsantrasyonlarda (200µg/ml hariç) TOS seviyelerinde istatistiksel açıdan önemli bir değişikliğe yol açmadı (P>0,05). Sonuç olarak, mevcut çalışmada non-mutajenik ve antioksidan özelliklere sahip olan usnik asit terapötiklerin yeni bir kaynağı olarak önerilmektedir.

**2013, 49 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** İnsan lenfositleri, usnik asit, *in vitro*, kromozom aberasyon testi, liken, mikroçekirdek testi, oksidatif durum, genotoksisite

## ABSTRACT

MS Thesis

### RISC ASSESSMENT OF USNIC ACID COMPOUND IN *IN VITRO* CONDITIONS

Zühal POLAT

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Lichens are symbiotic organisms composed of fungi and algae, and are very common in Turkey. Lichen secondary metabolites are mainly phenolic compounds produced by fungal partner of lichen symbiosis. Usnic acid (UA) is one of the most common lichen metabolites, and it was reported that to be effective for a wide range of pharmacological purposes including antiviral, antitumor, antiprotozoal, antiinflammatory, analgesic, antipyretic and antiproliferative. However, there are limited data on the genotoxic and antioxidant effects of UA in cultured human peripheral blood cells. Therefore, the aim of this thesis study was to investigate the genetic and oxidative effects of UA in cultured human blood cells (n=5). The UA was added into culture tubes at various concentrations (0 to 200 µg/ml). Chromosome aberrations (CA) and micronucleus (MN) tests were performed for genotoxic damage influences estimation. In addition, biochemical parameters (total antioxidant capacity [TAC] and total oxidative status [TOS]) were examined to determine oxidative effects. In our *in vitro* test systems, it was observed that UA had no mutagenic effects on human lymphocytes. Furthermore, our results indicated that low concentrations (1 and 5 µg/ml) of UA caused increases of TAC levels in cultured human blood cells. And the TOS levels were not changed ( $P>0,05$ ) when the all concentrations (except for 200 µg/ml) of UA were applied. In conclusion, usnic acid can be a new resource of therapeutics as recognized in this study with their non-mutagenic and antioxidant features.

**2013, 49 papes**

**Keywords:** Human lymphocytes, usnic acid, *in vitro*, chromosome aberration test, lichen, micronucleus assay, oxidative status, genotoxicity

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu alıŐma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmıŐtır.

Tez çalıŐmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e en içten teŐekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalıŐmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım başta Elanur AYDIN olmak üzere, Başak TOĞAR ve Leyla DEMİR'e teŐekkürlerimi bir borç bilirim. ÇalıŐmalarımın her aşamasında desteğini benden esirgemeyen arkadaşım Neslihan YÜCE'ye ayrıca teŐekkürlerimi sunarım.

Tezim sürecince maddi ve manevi desteklerini gördüğüm çok kıymetli annem Mukaddes POLAT'a ve kardeŐlerim Zeynep POLAT, Zehra POLAT, Abdulkadir POLAT ve Semra DİLER'e en içten Őükranlarımı sunarım.

Zühal POLAT

Mayıs, 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Likenlerin Genel Özellikleri.....	1
1.2. Liken Sekonder Metabolitleri.....	4
1.3.Usnik Asidin Tıbbi Kullanımı.....	6
1.3.1. Usnik asidin anti-bakteriyal ve anti-fungal aktivitesi.....	6
1.3.2. Usnik asidin anti-viral aktivitesi.....	8
1.3.3.Usnik asidin anti-kanser aktivitesi.....	8
1.3.4. Usnik asidin anti-proliferatif aktivitesi.....	9
1.4. Usnik Asidin Diğer Biyolojik Etkileri.....	10
1.5. Usnik Asit İçeren Liken Türlerinin Oksidan/Anti-oksidan Potansiyelleri.....	12
1.6. Usnik Asit İçeren Liken Türlerinin Mutajenite /Anti-mutajenite Potansiyelleri.....	13
1.7. Usnik Asit Toksisitesi.....	14
1.8. Genotoksisite Testleri.....	16
1.9. Oksidatif Stres.....	18
1.10. Antioksidan Sistem.....	22
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....</b>	<b>26</b>
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması.....	26
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	26
3.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	27
3.1.4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	27
3.2. Yöntemler.....	28

3.2.1. Genotoksisite testleri .....	28
3.2.2. Biyokimyasal analizler .....	30
3.3. İstatiksel İşlemler .....	32
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>33</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>36</b>
KAYNAKÇA .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	50



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	Yüzde konsantrasyon
°C	Santigrat derece
Mg	Mikrogram
ml	Mikrolitre
Kg	Kilogram
M	Metre
M	Molarite
Mg	Miligram
mM	Milimolar
mm <sup>2</sup>	Milimetre kare

### Kısaltmalar

ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BHA	Bütillenmiş hidroksianizol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
DNA	Deoksiribonükleik asit
ED <sub>50</sub>	Etkili doz
FTC	Fermik tiyosiyanat metodu
GPx	Glutatyon peroksidaz
KA	Kromozom aberasyonları
KKD	Kardeş-kromatid değişimi
LD <sub>50</sub>	Letal doz
LPO	Lipit peroksidasyon
MÇ	Mikroçekirdek
MTT	Mikrokültür tetrazolium test

PLGA	Poli laktik-glikolik asit
PUFA	Poliansature yağ asitleri
ROM	Reaktif oksijen metabolitleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TBA	Tiyobarbitürik asit testi
TBHQ	Tert-bütilhidrokinon
TOD	Toplam oksidan durum
UA	Usnik asit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Usnik (a) and İzousnik (b) asit .....	5
Şekil 4.1. 200 µg/ml usnik asit uygulanmış insan lenfosit hücre metafaz plağı örneği..	33
Şekil 4.2. 200 µg/ml usnik asit uygulanmış insan lenfosit hücrelerinde örnek binükleotid hücre fotoğrafı (1000X) .....	34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar .....	27
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>İn vitro</i> koşullarda usnik asidin biyokimyasal etkileri.....	34
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>İn vitro</i> koşullarda usnik asidin sitogenetik etkileri.....	35

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Likenlerin Genel Özellikleri

Liken terimi ilk kez M.Ö. IV yüzyılda Theophrastus tarafından “Bitkilerin Tarihi” adlı eserde zeytin ağacının üzerindeki yüzeysel büyümeyi belirtmek için kullanılmış Yunanca bir kelimedir (Aslan 1995).

Yaklaşık 400 milyon yıl öncesinden beri var olduğu bilinen likenler, halen yaşayan en yaşlı ve en uzun ömre sahip canlılar arasında ilk sırada yer almaktadır. Bazı özel türlerin en az 25 milyon yıldır yaşadığı düşünülmekte hatta bu rakamın 70 milyon olabileceğine inanılmaktadır (Richardson 1975; Richardson 1992; Taylor *et al.* 1995; Nash and Thomas 1996; Baron 1999; Gilbert 2000; Dobson 2005).

Likenler, eskiden beri birçok ülkede tıbbi amaçlarla geleneksel ilaçlar olarak kullanılmıştır (Shibata *et al.* 1948). Bilimsel anlamda likenlerle ilgili bilgilere ilk kez 15. yüzyılda rastlanılmaktadır (Jahns 1983).

Likenler, bir mikobiyont olan mantar ile fotobiyont olan bir ya da daha fazla sayıda alg veya siyanobakteriden oluşan simbiyotik organizmalardır (Nash and Thomas 1996). Liken oluşturan mantarlar çoğunlukla *Ascomycetes* ya da daha nadiren *Basidiomycetes* sınıfına dahildir. Algler ise çoğunlukla *Cyanobacteria*, *Chlorophyta* bölümlerine ait üyelerdir (Nash III 1996; Honegger 1998).

Renk olarak likenler turuncudan kırmızıya, yeşilden kahverengiye, griden siyaha kadar farklı varyasyonlar göstermektedir. Boyut olarak yüzeysel olan formlarda 1 mm<sup>2</sup>'den, sarkan formlarda 2 m<sup>2</sup>'ye kadar bulunabilirler (Nash and Thomas 1996; Boustie and Grube 2005).

Likenler, morfolojik olarak kabuksu, yapraksı, çalimsı ve pulsı yapıda bulunmaktadır. Likenlerin görünüşü ve yaşayış şekli kendilerini oluşturan alg ve mantarlardan tamamen farklıdır. Liken içerisindeki alg ve mantarların birbirleriyle birleşimleri farklı şekillerde olmaktadır. Alg ve mantarın liken içerisindeki dağılımı homojen ise böyle basit yapılu likenlere “Homeomerik liken”, heterojen ise böyle likenlere de “Heteromerik liken” denir (Aslan 1995). Mikroskop altında incelendiğinde, homeomerik likenlerin tallusunda alg ve mantarın homojen dağıldığı, heteromerik likenlerde ise tabakalar oluşturduğu görülmektedir (Dobson 2000).

Önceden mantarların klorofil bulundurmaması nedeniyle bir parazit gibi alglerden yararlandığı düşünülmesine rağmen ilerleyen dönemlerde yapılan araştırmalar bu fikrin yanlış olduğunu göstermiştir. Çünkü likenleri oluşturan alg ve mantarlar arasında bazı iş bölümleri vardır. Mantar, ortak yaşam birliğinde algin fotosentez yapabilmesi için ortamdaki su ve suda erimiş mineral maddeleri hifleri yardımı ile temin ederken, alg ise yapısındaki klorofil yardımıyla fotosentez yaparak birliğin karbonhidrat gereksinimini karşılamaktadır (Aslan 1995).

Likenlerde metabolik aktivite su, ısı ve ışıkla değişkenlik göstermektedir. Fotosentez için en uygun su içeriği %65-90 iken, en uygun sıcaklık 15-20°C’dir. Depo maddesi olarak nişasta bulundurmaktadır (Cocchietto *et al.* 2002). Her iki organizma da tek başına yaşayamayacakları yerlerde beraber kolonize olup “liken birliği” halinde yaşamaktadırlar (Nash and Thomas 1996). Bu simbiyoz yaşam birliğinde üreme daha çok eşeysiz üreme şeklinde olmakta, eşeyli üreme ise sadece mantar üyelerinde görülmektedir. Temiz hava şartlarında, likenler içerisinde kısa ömürlü olan türler neredeyse yok denecek kadar azdır. Günümüzde çevre kirliliği, küresel ısınma, ozon tabakasının delinmesi vb. çevre sorunları dikkate alındığında likenlerin yaşam süresi kısalmış olmasına rağmen, uygun şartlar altında (temiz hava, yeterli nem, ışık vb.) 1000 yıldan daha fazla sürede hayatta kalmaktadırlar. Likenlerde yıllık büyüme birkaç milimetreden birkaç santimetreye kadar değişmektedir (Aslan 1995).

Likenler, dünyanın hemen hemen her yerinde yayılış göstermektedir. Yeterli nemin ve O<sub>2</sub>'nin bulunduğu kayalar, ağaçların gövde, dal ve hatta yapraklarında, toprak, kiremit, beton, cam, ahşap materyal, deri, kumaş gibi doğal ve yapay çok değişik substratlar üzerinde gelişmektedirler. Deniz seviyesinden yüksek dağlara, çöllerden arktik ve tropik bölgelere kadar dünyanın hemen hemen her yerinde yayılış göstermektedirler (Nash and Thomas 1996; Aslan vd 1998).

Likenler, primer ve sekonder olmak üzere iki tip metabolit üretmektedirler. Likenlerin primer metabolitleri yalnız algler tarafından fotosentezle sentezlenmektedir. Bu primer metabolitler arasında polisakkaritler, aminoasitler, proteinler, polikaretenoidler ve vitaminler yer almaktadır (Huneck 2001; Boustie and Grube 2005). Likenlerin sekonder metabolitleri ise daha çok mantarlar tarafından sentezlenmektedir. Likenler, amino asit 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 üretmektedirler (Huneck and Yoshimura 1996).

Likenlerin sekonder metabolitleri olan liken asitleri, likenlere doğadaki karasal süksesyonda öncül bitki olma özelliği kazandırmıştır (Aslan 1995). Yani kumul, kayalık, killi, bataklık ve çakıllı olan ortamlar ilk önce likenler tarafından istila edilmektedir. Bunlara "Öncü populasyonlar" denir. Likenler salgıladıkları liken asitleri sayesinde kayaların üzerinde ince bir toprak tabakası oluşturarak ortamın toprak kalitesini yükseltmektedir. Likenlerden sonra bu ortamlar kara yosunları tarafından işgal edilmektedir. Böylece ortamdaki organik madde miktarı artmakta ve yüksek yapılı bitkilerin gelişmesine yardımcı olmaktadır (Lawrey 1986; Nash and Thomas 1996; Müller 2001).

Likenler doğal abiyotik şartlara (canlılardan kaynaklanmayan ortam şartları) çok dayanıklı iken, yüksek yapılı bitkilerle rekabete dayanıksızdırlar. Likenler yavaş üremelerinin neden olduğu bu rekabette zayıf kalma dezavantajlarını, ürettikleri sekonder metabolitler (liken asitleri) sayesinde telafi ederler (Nash and Thomas 1996).

Likenler, dünyada ve ülkemizde çok eski zamanlardan beri çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Geçmişten günümüze kadar likenler boya, kozmetik ve ilaç sanayisinde hammadde, gıda sanayisinde ise gıda katkı maddesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmıştır (Cocchietto *et al.* 2002; Dilsizoğlu vd 2004; Yazıcı and Aslan 2006).

Ayrıca likenler, hava kirliliğinin belirlenmesinde biyolojik indikatörler olarak kullanılmaktadır. Sülfür dioksit olan hassasiyetleri dolayısıyla, bölgesel kirlilik ve asit yağmurlarının düzeylerini belirlemeyi amaçlayan çalışmalarda çevresel indikatörler olarak likenler güvenilir sonuçlar vermektedir (Vokou *et al.* 1999; Loppi *et al.* 2004)

Likenlerin çok uzun zamandır çeşitli hastalıklar üzerine iyileştirici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu etkilerinin yapılarında bulunan çeşitli asitlerden kaynaklandığı saptanmıştır (Vartio 1973; Tamer 1991).

Aynı zamanda mezar taşları ve bazı tarihi eser yapıtların yaşları ile heyelan ve depremlerin meydana geliş tarihleri de likenler incelenerek belirlenebilmektedir (Armstrong 2004). Ancak çevre kirliliğinin yanı sıra, likenlerin doğal yollarla üremeleri çok yavaş olduğundan bu amaçlarla kullanımları çok azalmıştır (Harmala *et al.* 1992).

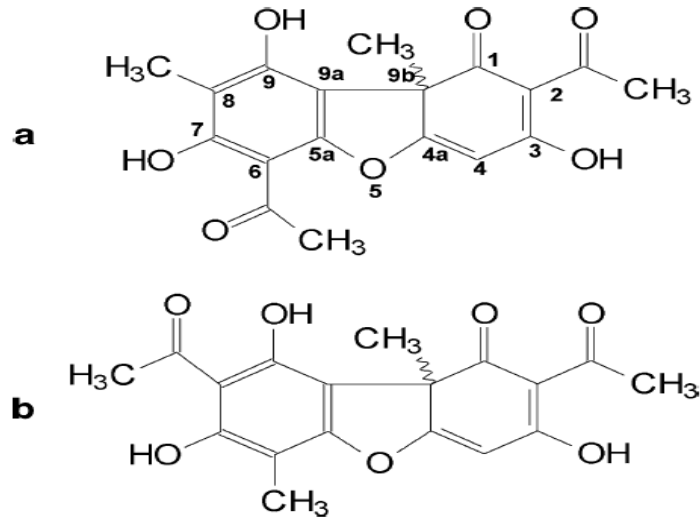
## 1.2. Liken Sekonder Metabolitleri

Tabiatta yaşayan en ilginç canlı gruplarından biri olan likenler çok sayıda alifatik, sikloalifatik, aromatik, terpenik, steroid ve karotenoid yapıda metabolit sentezlemektedirler. Bu metabolitlerin ekonomideki rollerinin yanı sıra kimyasal yapılarında faydalı olduğu bilinmektedir (Jahns 1980).

Usnik asit ilk kez 1844 yılında Alman bilim adamı Knop tarafından izole edilmiş olan likenik bir sekonder metabolittir. Bu madde dibenzofuran türevidir ve kimyasal yapısı 2,6-diasetil-7,9- dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3 (H,9bH) dibenzofurandion (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>)'dur (Ingólfssdóttir 2002; Cocchietto *et al.* 2002). Usnik asidin farklı biyolojik aktivitelere sahip (+)-D usnik asit ve (-)-L usnik asit olmak üzere 2 enantiomeri (türü)



bulunmaktadır (Romagni *et al.* 2000). Ayrıca usnik asidin doğal iki izomeri olan (-) izousnik asit (2,8-diasetil -7,9-dihidroksi-6,9,6-) ve dimetil benzofuran (1,3(2 H,9Bh) dion) da çeşitli likenlerde bulunmaktadır. Usnik asit likenlerde kimyasal olarak sülfirik asit hidrolizinden sonra oksidatif eşleşmeyi izleyen metilfloroasetofenon'dan sentezlenmektedir (Barton 1956). Taguchi ve arkadaşları 1969 yılında yaptıkları çalışmada asetil CoA dan üretilen metilfloroasetofenonun likenlerde bulunan usnik asidin biyosentezinde aracı olduğunu rapor etmişlerdir.



**Şekil 1.1.** Usnik (a) ve İzousnik (b) asit (Guo *et al.* 2008)

Usnik asit, yaygın olarak *Usnea*, *Alectoria*, *Cladonia*, *Ramalina*, *Lecanora*, *Parmelia* ve *Evernia* cinsine ait likenlerden elde edilmektedir (Giray *et al.* 2010). *Alectoria* cinsine ait türler usnik asitçe oldukça zengin olup ağırlıklarının yaklaşık %6'sı kadar usnik asit içermektedirler. Usnik asit, oda sıcaklığında katı, sarı renkli ve acı-tatlı kortikal bir pigmenttir. Sodyum usniat tuzu şeklinde A.B.D. ve diğer bazı ülkelerde zayıflama preparatlarının içine katılmaktadır (Ingólfssdóttir 2002; Cocchietto *et al.* 2002).

### 1.3.Usnik Asidin Tıbbi Kullanımı

Usnik asit içeren likenler dünyanın hemen hemen her tarafında yaygın olarak tedavi amaçlı kullanılmıştır. *Cladonia* likenine ait birçok tür tüberküloz tedavisinde (Vartia 1973) ve *Usnea* likenine ait türler ise Asya, Afrika ve Avrupa'da ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılmıştır (Okuyama *et al.* 1995). *Usnea barbata* Hipokrat tarafından üriner sistem şikayetlerinde *Usnea longissima* ise Çinliler tarafından yara iyileştirmede ve balgam söktürücü olarak kullanılmıştır (Shibata *et al.* 1948).

Usnik asidin Asya, Afrika ve Avrupa ülkelerinde ağrı kesici, ateş düşürücü, yara iyileştirici ve ekspektoran (balgam sökücü) olarak kullanıldığı da çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir. (Shibata and Ukita 1948; Okuyama *et al.* 1995).

Daha önce rapor edilmiş bir çalışmada kısmen saflaştırılan usnik asidin tüberküloz ve kronik bronşit için etkili olduğu tespit edilmiştir (Anonymus 2004). Ayrıca, deodorant, diş macunu, ağız suyu (gargara) ve güneş koruyucu kremler gibi medikal veya kozmetik amaçlı ürünlerin bileşiminde de usnik asit bulunmaktadır. Likenlerin etoksidiglikol ekstraktlarının yaş ağırlığının %10'ununu oluşturan usnik asidin, nemlendirici kremlerde koruyucu olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Ingolfsdottir 2002).

#### 1.3.1. Usnik asidin anti-bakteriyal ve anti-fungal aktivitesi

1980'li yıllarda antibiyotik olarak kullanılabilme özelliğinden dolayı usnik aside olan ilgi artmıştır. (Cocchietto *et al.* 2002). Usnik asidin her iki enantiomeri de gram (+) bakteri ve mikobakterilere karşı aktif olduğu tespit edilmiştir (Ingolfsdottir 2002).

Yapılan çeşitli araştırmalarda likenlerden izole edilen usnik asidin geniş spektrumlu bir antibiyotik olduğu rapor edilmiştir (Shibamoto and Wei 1984, Rowe *et al.* 1991; Dobrescu *et al.* 1993; Abo-Khatwa *et al.* 1996; Cocchietto *et al.* 2002) İlk yapılan klinik denemelerden birinde %1 oranında (+)- usnik asit içeren gargara, gönüllü birtakım insana ağız yoluyla verilmiş ve belirli aralıklarla ağız içerisindeki normal ağız

florası incelenmiştir. Çalışma sonucunda, usnik asidin dişte aşınmalara ve çürümelere neden olan *Streptococcus mutants'*ın gelişimini selektif olarak bastırdığı gözlenmiştir (Ghione *et al.* 1988).

Kullanılan standart yöntemlerle, *in vitro* da patojen olduğu bilinen gram (+) ve anaerobik bakterilere karşı usnik asidin etkili olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca usnik asidin vücut kokusuna yol açan başlıca gram (+) bakterilerin de gelişimini baskıladığı bilinmektedir (Ingolfsdottir 2002).

Yapılan bir araştırmada usnik asidin *Candida orthopsilosis* ve *Candida parapsilosis* mantarlarına karşı antifungal aktiviteye karşı sahip olduğu rapor edilmiştir (Pires *et al.* 2012). Usnik asit içeren *Usnea florida* (L.) Wiggli, *Usnea barbata* (L.) Wiggli, *Usnea longissima* Ach., *Usnea rigida* Vain., *Usnea hirta* (L.) Wiggli ve *Usnea subflorida* (Zahlbr.) Mot. likenlerinin asetonlu ekstralarının *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Enterococcus faecalis* (RSKK 508), *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada artan usnik asit miktarına bağlı olarak antimikrobiyal aktivitenin de arttığı gösterilmiştir (Cansaran *et al.* 2006).

*Ramalina farinaceae* (L.) Ach. likeninin aseton ekstresi ve (+) usnik asit bileşeni *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans* ve *Candida glabrata*'ya karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. *Alectoria sarmentosa* (Ach.) Ach. (Alectoriaceae) likeninin alkolik ekstresinden elde edilen alektosarmentin, (-) usnik asit, physodik asit ve 8'-O-etil-beta-alektronik asit gibi sekonder liken metabolitlerinin antimikrobiyal etki gösterdiği kaydedilmiştir (Gollapudi *et al.* 1994).

Usnik asit ve onun tuzlarının *in vitro* yöntemlerde, düşük konsantrasyonlarda nispeten *Mycobacterium tuberculosis*'in gelişimini engellediği belirlenmiştir (Krishna *et al.* 1992). Usnik asitle yapılan diğer çalışmalarda ise usnik asidin *Staphylococcus aureus*'a

karşı etkili olduğu (Lauterwein *et al.* 1995; Elo *et al.* 2007) ve cerrahi nakillerde sterilizasyonda kullanılabileceği belirlenmiştir (Francolini *et al.* 2004).

### 1.3.2. Usnik asidin anti-viral aktivitesi

*U. longissima* likeninden izole edilen (+) usnik asidin 1 µg/ml ED<sub>50</sub> değeriyle tümöre neden olan Epstein Barr virüsüne karşı kemoterapide önemli derecede etkili olduğu kaydedilmiştir. Aynı çalışmada (+) usnik asidin Herpes simplex tip1 virüsüne karşı ve polio tip1 virüsüne karşı da etkili olduğu tespit edilmiştir (Yamamoto *et al.* 1995).

*Teloschistes chrysophthalmus* (L.) Th. Fr. (Teloschistaceae) likeninden izole edilen usnik asit Junin ve Tacaribe virüslerine karşı antiviral etkisi kanıtlanmıştır (Fazio *et al.* 2007). Farklı biyolojik ve fizyolojik aktivitelere sahip olan usnik asidin antiviral aktivitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada fare polyomavirüslerinin proliferasyonuna karşı inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir (Campanella *et al.* 2002). Sokolov ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarında usnik asidin her iki izomerinin de pandemik influenza A(H1N1)pdm09 virüsüne karşı antiviral aktiviteye sahip olduğunu kaydetmişlerdir (Sokolov *et al.* 2012).

### 1.3.3.Usnik asidin anti-kanser aktivitesi

Mikropartiküllerin, kemoterapinin geleceğinde büyük rol oynayacağı düşünölmektedir. Bu mikropartiküllerden biri olan usnik asit ile yapılan bir çalışma sonucunda PLGA (poli laktik-glikolik asit) mikroküreleri içindeki usnik asidin, serbest usnik asit tedavisine kıyasla insan monolayer tümör hücrelerinin (HEp-2) inhibisyonunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Ribeiro-Costa *et al.* 2004).

*Cladonia arbuscula*'dan izole edilen aktiviteleri (+)- usnik asit ve *Alectoria ochroleuca*'dan izole edilen (-)- usnik asidin antikanser hücre hatları [meme kanseri hücre hattı (T-47D) ve pankreatik kanser hücre hattı (Capan-2)] üzerinde araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre her iki usnik asit enantiomerinde mitokondrial membran

potansiyelinin kaybına yol açarak hücre büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Einarsdottir *et al.* 2010).

Rabelo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada usnik asidin insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) üzerinde sitotoksik etki yaparak antikanser aktiviteye sahip olduğunu kaydetmişlerdir (Rabelo *et al.* 2012). *Cladonia convoluta* (Lam.) Anders likeninden izole edilen usnik asidin doza ve zamana bağlı olarak mürin lösemi (L1210) hücrelerinde apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir (Bezivin *et al.* 2004).

Yine, *Cladonia substellata* likeninden elde edilen PLGA-nano kapsüllerinin içindeki usnik asidin Swiss fare solit sarkoma 180 hücreleri üzerinde antitümöral aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Santos *et al.* 2006).

#### **1.3.4. Usnik asidin anti-proliferatif aktivitesi**

Likenlerden elde edilen (+)- usnik asidin kanser ya da doku rejenerasyonu üzerine etkileri, hücre çoğalması ve yara iyileşmesini aktive etme yetenekleri araştırılmıştır. MM98 malign mezotelyoma hücreleri, A431 vulvar kanser hücreleri ve HaCaT keratinositlerin kullanıldığı deneyler sonucunda usnik asidin yüksek derecede toksisite gösterdiği kaydedilmiştir. Liken bileşenlerinin subtoksik dozlarının varlığında HaCaT monolayer üzerinde Scratch yaralama deneylerinde (+)- usnik asit var olan yarayı güçlü bir şekilde kapatma etkisi gösterirken, usnik ve gyrophorik asitten oluşan bir kombinasyonun da doku rejenerasyonunun artmasına yol açtığı gözlenmiştir (Burlando *et al.* 2009).

Deri-yara iyileşmesi ve fibroblastların proliferasyonunda sodyum usnik asidin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; sodyum usnik asidin L929 fibroblastların proliferasyonunu destekleyici etki göstermediği ancak harici bir uygulama ile deri altı bir yaranın iyileşmesini hızlandırdığı kaydedilmiştir (Jin *et al.* 2005). Backorova ve arkadaşları yaptıkları araştırmalarında usnik asit, paretin, atranorin ve gyroforik asidin *in vitro* modellerde kanser hücre (A2780, insan ovaryum kanseri; MCF-7, insan meme

adeno kanseri; HT-29 insan kolon adeno kanseri; HL-60, insan promiyelositik lösemi ve jurkat, insan T hücreleri lenfosit lösemisi, HeLa ,insan rahim ağzı adeno kanseri; SK-BR-3 insan meme adeno kanseri; HCT-116 p53<sup>+/+</sup> ve HCT-116 p53<sup>-/-</sup>) hatlarına karşı antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini çalışmışlardır.Araştırma sonucunda usnik asit ve atranorinin hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunu baskılamada parietin ve giroforik aside göre daha etkili oldukları rapor edilmiştir. (Backorova *et al.* 2011)

#### 1.4. Usnik Asidin Diğer Biyolojik Etkileri

Likenlerin insektisit aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada sekonder liken metabolitlerinden (-) usnik asit ve (+) usnik asit, laboratuvar koşullarında *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) larvalarına karşı değerlendirilmiştir. Her iki enantiomerin de 5 ve 10 ppm'lik dozlarda 24 saatte güçlü larva öldürücü etkiye sahip olduğu ve 3.ve 4. larva evrelerinde ise %100'lük bir mortaliteye neden olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda liken bileşenlerinin yeni insektisitler olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Çetin *et al.* 2008). Likenlerin larvasit aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada (+)- usnik asidin *Culiseta longiareolata* sivrisineğinin larvalarına karşı yüksek larvasidal etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (Çetin *et al.* 2012).

*İn vitro* koşullarda yapılan bir çalışmada *Cladonia substellata* likeninden izole edilen usnik asidin *Trypanosoma cruzi* parazitinin büyümesini doza bağlı olarak inhibe ettiği kaydedilmiştir (Calvalho *et al.* 2005). *İn vitro* da (+)- usnik asidin fare ve sıçan kardiyo fibroblastlarında *Toxoplasma gondii tachyzoites* paraziti üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar usnik asidin *T.gondii tachyzoites* üzerine dikkate değer bir anti parazital etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Wei *et al.* 2008).

Emsen ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *U. longissima*'dan izole ettikleri liken bileşiklerinin (usnik asit ve difraktik asit) *Colorad potato* kınkanatlı böceğine ve *Leptinotarsa decemlineata* 'nın 4. inster larva ve yetişkinlerine karşı insektisidal etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir (Emsen *et al.* 2011). (+)- usnik asit ve *Alectoria sarmentosa* ( Ach.) likelinden izole edilen (-)-usnik asidin *Lactuca sativa* tohumları ve

*Allium cepa* bitkilerinin kotiledon dokuları üzerinde fitotoksik etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (Romagni *et al.* 2000).

Gardner and Mueller'in 1981 yılında yaptığı çalışmalar sonucunda usnik, lekanorik, evernik ve vulpinik asit gibi liken asitlerinin toksisitesinin pH değeri ile ilişkili olduğunu ve farklı pH aralıklarında spor büyümesini inhibe ederek germinasyon yüzdesini azalttığını rapor etmişlerdir. Yine usnik vulpinik, fisodik ve salazinik asitlerin otlarda tohum çimlenmesini ve kök büyümesini inhibe ettiği kaydedilmiştir. Bu asitleri içeren *Cladonia* cinsine ait likenlerin konifer ormanlarında ağaç fidelerinin büyümesini ve karayosunu sporlarının çimlenmesini inhibe ettiği bilinmektedir (Halıcı ve Aksoy 2004).

Mide hastalıklarının önemli bir etkeni olan *Helicobacter pylori* suşlarına karşı usnik asidin doza bağlı olarak güçlü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada usnik asit ve bir antibiyotik olan klaritromisin birlikte kullanımının *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde daha etkili olabileceği kaydedilmiştir (Şafak *et al.* 2009).

*Roccellia montagnei* likeninden izole edilen (+)- usnik asidin sıçanlar üzerinde doza bağlı olarak anti-enflamatuar etki gösterdiği rapor edilmiştir (Vijavakumar *et al.* 2000) *U. diffracta*'nın metanol ekstraktlarından elde edilen aktif bileşikler olarak usnik asit ve depside türü olarak difraktik asidin, farelerde ağrı kesici ve ateş düşürücü etkisi olduğu belirlenmiştir Usnik asidin oral yolla 30-100 mg/kg dozlarında uygulanması sonrasında ağrı kesici etkileri bulunmuştur. Yine usnik asidin 100-300 mg/kg dozunda ağız yoluyla alınımı lipopolisakkaritle indüklenmiş hipertermiya vasıtasıyla değerlendirilmiş ve önemli bir ağrı kesici aktivite gösterdiği kaydedilmiştir (Okuyama *et al.* 1995).

Usnik asidin antiinflatuar aktivitesi ibuprofen (ticari bir non steroidal antiinflatuar ilaç etken madde) ile kıyaslanarak araştırılmıştır. Rat pençe ödem (akut etki) ve pamuk toplanma etkisi (kronik etki) kullanılarak (+) usnik asit oral yolla 100 mg/kg dozunda ratlara verilmiş ve her iki yöntemde de ibuprofenin bazı dozlarıyla kıyaslandığında usnik asidin önemli oranda etkili olduğu görülmüştür (Vijayakumar *et al.* 2000).

Farelere oral yolla verilen sulu (+)-usnik asit süspansiyonunun polikromatik eritrosit hücrelerinde RNA biyosentezine müdahale ederek hücre proliferasyonunu etkilediği tespit edilmiştir (Al Bekairi *et al.* 1991).

### 1.5. Usnik Asit İçeren Liken Türlerinin Oksidan/Anti-oksidan Potansiyelleri

Usnik asit içeriğine sahip olan *Usnea* cinsine ait liken türlerinden biri olan *Usnea ghattensis*'in lipit peroksidasyonunu (LPO) ve serbest radikal salınım aktivitesini inhibe ederek güçlü oksidan aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Behera *et al.* 2005). Yenilebilir bir liken türü olan ve toplam fenolik içeriği yüksek bulunan *Ramalina conduplicans*'ın serbest radikal salınım aktivitesini azaltarak antioksidan özellik sergilediği kaydedilmiştir (Luo *et al.* 2010).

*Cladonia furcata*, *Lecanora atra* ve *Lecanora muradis* likenlerinin aseton ekstraktı fenolik ve flavonid içerikleri sayesinde serbest radikal salınım aktivitesini inhibe ederek ve süperoksit anyon radikal salınımını azaltarak antioksidan aktivite sergiledikleri tespit edilmiştir (Rankovic *et al.* 2011).

*Parmelia saxatilis* likeninin sulu ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise metanol ekstrelerinin sulu ekstrelerinden daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği fermik tiyosiyanat metodu (FTC) ve tiyobarbitürik asit testi (TBA) kullanılarak rapor edilmiştir (Özen *et al.* Kinalioğlu 2008). Türkiye' de yetişen bir liken türü olan *Cladonia rangiformis*'in antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada bu likenin kloroform, metanol ve sıvı ekstrelerinin önemli bir antioksidan aktivite sergilediği görülürken düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Yücel *et al.* 2007).

Bir diğer çalışmada *Evernia prunastri* ve *Pseudonevernia furfuraceae* likenlerinin aseton ekstrelerinin *in vitro* olarak antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivitesi çalışılmıştır. Araştırma sonucunda bu likenlerin doğal bir antioksidan kaynağı olduğu serbest radikal salınımı, süperoksit anyon radikal salınımı ve indirgeme gücü



metodlarıyla ortaya konmuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar her iki liken türünde antimikrobiyal aktiviteye ve insan melanoma (Femx) ile insan kolon kanseri (LS174) hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Kosanic *et al.* 2013).

Verma *et al.* yaptıkları araştırmalarında *U. ghattensis* likeninin metanolik ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleyerek yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda bu liken ekstraktının etanol tarafından hasar oluşturulan karaciğer kültürlerinde glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ile süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimleri aktiviteleri azaltarak ve laktat dehidrogenaz salınımı ile lipid peroksidasyonunu (LPO) azaltarak hepatoprotektif etki (karaciğer koruyucu) gösterdiği kaydedilmiştir (Verma *et al.* 2008).

Bir makroliken türü olan *Ramalina conduplicans* Vain. (Ramalinaceae)' ın metanolik ekstraktının antioksidan, antihelminth ve insektidal etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda usnik asit, salazininik asit ve sekikaik asit varlığı tespit edilen bu liken türünün antioksidan doza bağlı olarak aktivite sergilediği kaydedilmiştir. Aynı zamanda artan konsantrasyona bağlı olarak *Aedes aegypti* sivrisineğinin ikinci evre larvaları üzerinde inseksidal etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (Vinayaka *et al.* 2009).

### **1.6. Usnik Asit İçeren Liken Türlerinin Mutajenite /Anti-mutajenite Potansiyelleri**

*In vitro* koşullarda yapılan bir araştırmada *Evernia prunastri* (Huds.) Wild likeninin metanol ekstresinin genotoksik ve antigenotoksik özellikleri WP2, Ames (TA1535 ve TA1537) kardeş kromatid değişim (KDD) test sistemleriyle araştırılmıştır. Bakteriyal test sisteminden elde edilen sonuçlara göre bu liken ekstresinin TA1537 ve WP2 suşları üzerinde güçlü antimutajenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu liken ekstresi aflatoksin B1'in insan lenfosit hücrelerinde oluşturduğu genotoksik hasarı ve KDD frekansını azalttığı rapor edilmiştir (Alpsoy *et al.* 2013).

Geyikoğlu vd yaptığı bir çalışmada *Pseudevernia furfuracea*, *Dermatocarpon intestiniforme*, *Ramalina capitata* ve *Parmelia pulla* likenlerinin genotoksik özelliklerini insan tüm kan kültürlerinde KDD ve mikroçekirdek (MN ) testlerini kullanarak araştırmışlardır. Test edilen tüm liken ekstralarının herhangi bir genotoksik etki yapmadığı gözlemlenirken koloidal bizmut substrat genotoksitesine karşı ise antigenotoksik etki sergiledikleri kaydedilmiştir (Geyikoğlu *et al.* 2007) .

### 1.7. Usnik Asit Toksisitesi

Likenler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin pek çok yararlı etkisinin olmasının yanı sıra bazı bitkisel ve hayvansal organizmalar ve hatta insanlar üzerine inhibitör ve alerjik etkilerinin olduğu da yapılan araştırmalar sonucunda kaydedilmiştir. En yaygın olarak bilinen sekonder metabolitlerden biri olan usnik asidin insanlardaki toksisitesine dair yeterince bilgi bulunmamasıyla birlikte bugüne kadar dermal kullanımıyla ilişkili olarak rapor edilen etkiler lokal irritasyon, alerjik temas dermatit ve konjunktivitir (Ingólfssdóttir 2002; Guo *et al.* 2008).

Pramyothin *et al.* ratlardan izole edilen hepatositlerde usnik asidin hepatotoksik etkilerini çalışmışlardır. 100 ve 1000 µM usnik asitle muamele edilmiş fare primer hepatositlerinde, usnik asidin 1 saat içinde hepatik transaminaz (AST ve ALT) salınımını indüklediği, glutatyon (GSH) miktarını azalttığı ve hücre zarının bütünlüğünün kaybolmasına sebep olduğu görülmüştür. Çalışmada aynı zamanda usnik asit, bilinen en iyi hepatotoksin olan karbon tetra kloridle (CCl<sub>4</sub>) kıyaslanmıştır. Bu kıyaslama sonucunda usnik asidin CCl<sub>4</sub>'e benzer hücresel tepkilere neden olduğu rapor edilirken hepatotoksik etki mekanizmasının da CCl<sub>4</sub>'ün etki mekanizmasına benzerlik gösterebileceği düşünülmüştür (Pramyothin *et al.* 2004).

*U. longissima* Ach. likeninin içerdiği usnik asidin yüksek dozlarda bazı hayvanlarda toksik etkilere sebep olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Sığırlarda ve koyunlarda ön ve arka üyelerin paralizine (felç) yol açan ataksinin (denge bozukluğuyla ve hareketler arasındaki uyumun bozulmasıyla sonuçlanan bir sinir sistemi hastalığı)

ortaya çıkması *Parmelia molliuscula* Ach. likeninin sürekli alınmasından dolayı usnik asitten kaynaklandığı düşünülmüştür (Kingsbury 1964).

Kedilere 10 mg/kg dozunda sodyum usneate uygulandığı zaman, hipertansiyon, O<sub>2</sub> tüketiminde artış ve vücut sıcaklığının yükselmesi gibi belirtilerle metabolizma artışı gözlenmiştir (Soderberg 1953; Ingólfssdóttir 2002). Yapılan çalışmalar sonucunda sodyum usneate'ın LD<sub>50</sub> dozlarının fareler için 25 mg/kg, ratlar ve tavşanlar için 30 mg/kg ve köpekler için ise 40 mg/kg olduğu kaydedilmiştir (Virtanen and Kärki 1956).

Fosil bir liken türü olan *Xsanthoparmelia chlorochrona*'dan izole edilen (+)- usnik asit ile beslenen yerli koyunlarda uyuşma, anoreksiya ve karın ağrısı gibi semptomatik klinik belirtiler gözlemlenerek toksisiteye yol açtığı tespit edilmiştir (Dailey *et al.* 2008)

Bir gıda katkı maddesi olarak kullanılan usnik asidin erkek albino sıçanlarında karaciğer metabolizmasını etkilemek sureti ile güçlü bir şekilde glikonejezi inhibe ederek, mitokondrial NADH/NAD<sup>+</sup> oranını azaltarak ve hücre ATP düzeylerini düşürerek toksisiteye neden olduğunu rapor edilmiştir (Moreira *et al.* 2013).

Usnik asit sitotoksitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada usnik asidin 10 µM konsantrasyonlarında sıçan hepatosit hücrelerinde zamana bağlı olarak oksidatif fosforilasyon ve glikonejezi inhibe ederek hücre canlılığını azalttığı ve hepatoksisiteye yol açtığı gösterilmiştir (Sonko *et al.* 2011 ).

Tavşan derisinden elde edilen primer fibroblast kültürlerinde usnik asidin sitotoksik etkisi MTT (mikrokültür tetrazolium test) yöntemiyle araştırılmış ve araştırma sonucunda usnik asidin hücre canlılığını istatistiksel açıdan etkilemediği kaydedilmiştir (Kim *et al.* 2011).

Cheng *et al.* yaptıkları bir çalışmada (+)- usnik asidin farelerde yüksek dozlarda oral akut toksisitesine neden olduğunu gözlemlerken usnik asidin sıçan kardiyal fibroblastları üzerinde sitotoksositeye yol açmadıklarını gözlemişlerdir (Cheng *et al.* 2009).

Likenler tarafından üretilen çeşitli metabolitlerin bazı böcek, salyangoz ve nematodlar için zehirli olduğu, *Evernia prunastri* (L.) Ach. likeninden izole edilen bazı liken asitlerinin de *Toxocara canis* (köpek kurdu) larvaları üzerinde nematosidik etki gösterdiği bilinmektedir (Ahad *et al.* 1991; Purvis 2000). Yapılan bir çalışmada usnik asidin *Spodoptera littoralis*'in (yaprak kurdu) larva gelişimini azalttığı gözlenmiştir (Emmerich *et al.* 1993).

### 1.8. Genotoksosite Testleri

Son yıllarda yapılan pek çok araştırma ile mutajenik olan maddelerin genellikle kanserojen, aynı zamanda kanserojen olan pek çok maddenin de mutajenik olduğu gösterilmiştir. Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen pek çok sentetik ve doğal maddenin mutajenik veya kanserojenik potansiyel açısından test edilmesi sağlık açısından gereklidir. Ancak laboratuvar hayvanları ile yapılan çalışmalar hem çok pahalı hem de çok zaman almaktadır. Bu nedenle, *in vivo* hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik ve mutajenik potansiyellerinin ölçülebilmesi için son yıllarda birçok *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir. Kısa zaman içinde sonuç veren bu testlerle, kimyasal maddelerin belirli genetik özelliklerde oluşturduğu sonuçlar ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin mutajenik veya kanserojenik potansiyelleri arasında ilişkiler kurulmaktadır (Boyacıoğlu 2004). Kromozom Aberasyonları testi (KA), Mikroçekirdek testi (MÇ), Kardeş-Kromatid Değişimi testi (KKD), Ames testi, SCGE (Tek hücre jel elektrofozi) testi ve FISH (Flouresen *in situ* hibridizasyon) testleri genetik toksikoloji alanında kullanılan başlıca testlerdendir.

Memeli sistemlerinde KA incelenebilen hemen her hücre ve doku tipinde tespit edilebilmiştir. KA'ların çeşitli etkenlere (kimyasallara, iyonize ve iyonize olmayan

radyasyona v.b) maruz kalma sonucunda meydana geldiği pek çok *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarla ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar tümör hücrelerinin yapısal ve sayısal kromozom değişiklikleri içerdiğini göstermiştir (Lando *et al.* 1998; Emri *et al.* 2000; Demiroğlu 2003; Sugai *et al.* 2005; Pasha *et al.* 2006).

Bu test genellikle insan periferal lenfositleri kullanılarak yapılmaktadır. İndüklenmiş kromozomal aberasyonlar; kromozom-tipi aberasyonlar (simetrik aberasyonlar) ve kromatid-tipi aberasyonlar (asimetrik aberasyonlar) şeklinde iki ana grupta değerlendirilmektedir (Adler 1984). Mitoz bölünmenin metafaz safhası, kromozomlardaki kırılmaların ve yeniden birleşmelerin olduğu evredir. KA yönteminde hücreler iğ ipliklerinin inhibisyonuna neden olan bir madde (kolşisin) eklenmesiyle metafaz safhasında tutulmaktadır. Bu da kromozomların kolayca gözlenebilmesini sağlamaktadır. KA testi ile kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde daha çok kromatid gap, kromatid kırığı, kromozom gap ve kromozom kırığı denilen aberasyon çeşitlerinin oranları araştırılmıştır. Kromatid gapları kromatid kolunda boyanmamış kısımlar olarak gözükürler. Bu açıklıklar kromatid koluyla aynı uzantıdadır ve kromatid koluyla arasındaki mesafe kol kalınlığına eşit ya da küçüktür (Demiroğlu 2003).

Sitologlar tarafından mikroçekirdeğin yapısı ve orijini yüzyılın başından beri bilinmesine rağmen mutajenite potansiyellerinin ölçülmesinde kullanılması yenidir (İlbars 1997). İnsan periferal kan lenfositlerinde MÇ sıklığının kromozom hasarlarının bir göstergesi olarak kullanılması ilk kez 1976 yılında Courtyman ve Heddle tarafından önerilmiştir. Ancak daha sonra bu yöntem Fenech ve Morley (1985 a,b) tarafından geliştirilmiş ve Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (CBMN) olarak isimlendirilmiştir.

Mikroçekirdekler hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, ana çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. İnsan hücrelerinde DNA hasarlarının kromozom seviyesinde güvenilir olarak değerlendirilmesini sağlayan mikroçekirdek yöntemi genetik toksikoloji alanında

çok yoğun olarak kullanılmaktadır (Fenech 1993; Lando *et al.* 1998). MÇ sayısındaki artış çeşitli kimyasalların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak, klastojenler ise kromozom kırıkları eydana getirerek MÇ oluşumuna neden olurlar (Demirel ve Zamani 2002). Bu nedenle MÇ testi hücrelerde hem klastojenik hemde anöjenik etkilerin bir arada değerlendirilmesine olanak veren tek biyomarkırdır (Fenech 1993).

MÇ sayımı Courtyman and Heddle (1976) tarafından belirlenen kriterlere göre yapılmaktadır. Bu kriterler:

- MÇ çapı esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması,
- MÇ'ler esas çekirdeğe bağlı veya bitişik olmaması,
- Boya alma yoğunluğu esas çekirdekle aynı olması,
- Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MÇ'lerin sayılması esaslarını kapsamaktadır (Fenech 2000; Demirel ve Zamani 2002).

Sigara ve alkol kullanımı (Maffei *et al.* 2002), yaş (Thierens *et al.* 1996), cinsiyet (Barale *et al.* 1998), çeşitli kronik ve enfeksiyonal hastalıklar, yaşam tarzı, ilaçlar ile fiziksel ve kimyasal ajanlara maruziyet (Neri *et al.* 2003; Pelevina *et al.* 2005) gibi faktörler MÇ ve KA'ların oluşumunda etkili olmaktadır.

### **1.9. Oksidatif Stres**

Oksijen kullanımının doğal bir sonucu olarak aerobik organizmalarda %1-2 oranında reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ortaya çıkmaktadır. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROM oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile

biyomoleküllere hasar vermektedir (Cooke *et al.* 2003; Burçak ve Andican 2004). Oksidatif stres, basit bir şekilde vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak ifade edilmektedir. Oksidatif stres toksisitenin muhtemel bir mekanizması olarak son on yıldır toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir (Mercan 2004).

Serbest radikaller, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, alerji, diabet, katarakt gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadıklarından dolayı son yıllarda üzerinde en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller olup bu elektronlarını paylaşabilmek için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girmektedirler. Radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelmektedirler. Bir radikalın diğer moleküllerle etkileşmesi araya bir antioksidan sistem girene kadar, zincirleme reaksiyon şeklinde devam etmektedir (Akkus 1995; Aydılek ve Aksakal 2003).

Oksijenin iki eşleşmiş elektron bulundurması, onun serbest radikallerle, radikal olmayan diğer maddelere göre daha kolay reaksiyona girmesine neden olur. Bu sebeple biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden meydana gelen radikallerdir. (Onat vd 2002; Alp 2005). Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra vücudumuz içerisinde reaktif azot türleri de oluşmaktadır (Halliwell 1996).

Reaktif oksijen ve azot türleri pek çok hücresel yapıyı etkileyerek hücre hasarına neden olmaktadır. Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak seviyede meydana geldikleri zaman organizmada farklı hasarlara yol açmaktadırlar. Biyomoleküllerin çoğu (lipidler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler, enzimler vb.) bu radikallerden etkilenmektedir. Biyomoleküller arasında en kolay etkilenen bileşikler ise lipidlerdir.

Hücre membranları radikaller tarafından kolaylıkla etkilenen poliansature yağ asitleri (PUFAs) bakımından oldukça zengindir. Lipid peroksidasyonu olarak bilinen

PUFAs'nin oksidatif yolla yıkımı kendi kendini devam ettiren zincir şeklinde ilerlediği için çok hasar vericidir. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Candan 2002; Lambeth 2004; Mavi 2006).

Yağ asitleri ile birleşen radikal öncelikle bir dizi reaksiyonun başlamasına neden olmaktadır. İlk olarak yağ asidi radikalinin oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksid radikali (ROO·) meydana gelmektedir. Lipid peroksid radikalleri yağ asitleriyle reaksiyona girerek hidroperoksitleri oluşturmaktadır. Bu peroksit ürünlerinden ortamdaki metal iyonlarının (Fe ve Cu gibi) katalizörlüğünde malondialdehidlerin (MDA) de içinde bulunduğu aldehitler ile etan ve pentan gibi hidrokarbon yapıda yıkım ürünleri elde edilmektedir (Onat vd. 2002; Eken 2003).

Lipid peroksidasyonu sonucu membran geçirgenliğinin artması ile membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye Ca<sup>+2</sup> girişinde artış meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak fosfolipaz aktivitesi artarak fosfolipid kaybına neden olmaktadır. Membran geçirgenliğindeki bu değişikliğe ve potansiyel kaybına bağlı olarak toksik etkilerde artış, proteolitik etkide şiddetlenme, katabolik enzim aktivitesinde artış ve DNA hasarları gibi olumsuz durumlar meydana gelmektedir.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA ve aldehid yapıdaki diğer ürünlerin (formaldehid ve asetaldehid gibi) mutajenik ve kanserojenik etkileri olduğu rapor edilmiştir (Esterbauer *et al.* 1991; Chaudhary *et al.* 1994).

Proteinlerde serbest radikallere, aldehidlere ve diğer peroksidasyon ürünlerine karşı oldukça duyarlıdır. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asitlerin içeriklerine, amino asitlerin yapılarındaki kompozisyonlarına ve oluşan hasarın onarılabilişliğine göre değişiklik göstermektedir. Radikaller proteinlerin üç boyutlu yapısını bozarak onların normal fonksiyonlarını yerine getirememelerine neden olurlar (Halliwell and Gutteridge 1989; Yıldırım 2003).



Reaktif oksijen metabolitleri DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına, pürin-pirimidin bazlarında ve deoksiriboz şekerde modifikasyonlara ve zincirler arasında çapraz bağlanmalara neden olarak genetik hasar meydana getirmektedir. Oksidasyon sonucu DNA'da gözlenen modifikasyonlar sadece baz ve şeker seviyesinde kalmayıp, kromozomlar seviyesinde de oluşabilmektedir. Genetik hasar sonucu, genomik kararsızlık, replikasyon hataları, transkripsiyon ve haberleşme mekanizmalarında aksamalar gibi kanser oluşumu ile ilgili olan pek çok durum ortaya çıkabilmektedir (Marnett 2000; Cooke *et al.* 2003). Oksidatif stres sonucu genetik materyalde oluşan bu geri dönüşümsüz değişimlerin mutajenez, karsinogenez ve yaşlanmada ilk basamaklar olduğu kaydedilmiştir. Oksidatif DNA hasarının rol aldığı en önemli hastalık kanserdir. Yapılan çalışmalar kanser oluşumunda serbest radikallerin ve diğer reaktif metabolitlerin çok etkili olduğu görüşünü desteklemektedir. Oluşumunda oksidatif DNA hasarının etkili olduğu düşünülen hastalıklar arasında Alzheimer, Huntington, Parkinson, Kardiyovasküler hastalıklar (ateroskleroz, koroner kalp hastalıkları, hipertansiyon, kalp yetmezliği, kardiyomiyopati ve kalp krizi), Tip 1-Tip 2 diyabet hastalıkları ve katarakt gibi hastalıklar olduğu rapor edilmiştir (Halliwell and Gutteridge 1989; Lovell *et al.* 1998; Holvoet *et al.* 1995; Maritim *et al.* 2003).

Organizmalarda meydana gelebilen zararlı oksidatif reaksiyonlar sonucu üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türleri metabolik ve fizyolojik süreçlerde organizmaların bünyelerindeki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalarla yok edilir. Belirli koşullar altında oksidanların artışı ve antioksidanların azalışı önlenemez, bunun sonucunda çeşitli hasarlara neden olur (Halliwell and Gutteridge 2000). Farklı oksidan ve antioksidan türlerinin serum (ya da plazma) konsantrasyonları ayrı ayrı laboratuarda ölçülebilir, ancak bu ölçümler hem çok zaman alır, hem fazla iş gücü gerektirir hem de çok pahalı ve oldukça karmaşık teknikler gerektirir (Tarpey *et al.* 2004). Yani farklı oksidan ve antioksidan moleküllerinin ayrı ayrı ölçümü pratik değildir. Bir örneğin toplam oksidan durumu (TOD) hazırlanan kitlerle ölçülür ve bu total peroksit (TP), serum oksidasyon aktivitesi (SOA), reaktif oksijen metabolitleri (ROM) v.b şekilde isimlendirilir (Nakamura *et al.* 1897; Halliwell and Gutteridge 2000;

Harma *et al.* 2003; Yanik *et al.* 2004; Ceylan *et al.* 2005; Yeni *et al.* 2005) . Aynı şekilde bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi (TAK) hazırlanan kitlerle ölçülür ve bu total antioksidan kapasite (TAK), toplam antioksidan aktivite (TAA), toplam antioksidan güç (TAOP), toplam antioksidan yanıt v.b şekilde isimlendirilir (Benzie and Strain 1996; Koracevic *et al.* 2001; Erel 2004; Ayçiçek *et al.* 2006).

### 1.10. Antioksidan Sistem

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların neden olduğu hasarları en aza indirmek için biyolojik sistemlerde çeşitli antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir (Yıldırım 2003).

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu engelleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya da antioksidan savunma denir (Çavdar vd 1997). İyi bir antioksidanın taşıması gereken özellikler; ortamdaki serbest radikalleri gidermesi, antioksidan sistemdeki diğer antioksidanlarla etkileşimler yapabilmesi, redoks metallerinin şelatörü olarak görev yapabilmesi, dokulardaki ve biyolojik sıvılardaki yoğunlukları fizyolojik açıdan uygun seviyelerde olması, emiliminin oldukça hızlı olması ve hem membran hem de su içeren ortamlarda işlevsel olmasıdır (Valko *et al.* 2006).

Yukarıdaki literatür bilgilerine dayanılarak şunlar söylenebilir:

- Likenler ve sentezledikleri metabolitler eski çağlardan beri halk hekimliğinde birçok hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan organizmalardır.
- Likenler ve sentezledikleri sekonder metabolitlerigöstermiş oldukları anti-oksidan ve anti-mutajen özelliklerden dolayı farmakoloji alanında da sıklıkla kullanılmaktadır.
- Günümüzde kullanılan sentetik anti-oksidanların ciddi yan etkilerinin varlığından dolayı doğal anti-oksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır.
- Tez kapsamında test edilen usnik asidin doza bağlı biyokimyasal ve genetik etkileri hakkında literatürde sınırlı düzeyde bilgi mevcuttur. Bu nedenlerle, mevcut tez

alışmasında usnik asidin oksidan/antioksidan ve mutajenik/non-mutajenik etkilerinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Scirpa *et al.* (1999) tarafından İtalya’da yapılan klinik bir çalışmada, insan papillamavirüsle enfekte olmuş 18-45 yaşları arasında 100 kadın hasta üzerinde, usnik asit (UA) ve çinko sülfat içeren formülasyonlar kullanılmış ve radyo cerrahide usnik asidin adjuvan (bir reçetede yer alan ve diğer ilaçlara ait etkilerin ortaya çıkmasında yardımcı nitelik taşıyan madde) olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Sonuçlar Zn-UA formülasyonu uygun görülürken hastaların %8’inde tahriş edici etkiler gözlemlenmiştir.

Han *et al.* (2004) UA’in toksisitesi ve içerdiği lipokinetiks’in karaciğer toksisitesi üzerindeki rolünü araştırdıkları çalışmada hepatosit hücre kültüründe usnik asit ile muamelenin 16 saatte %98 oranında nekroza yol açtığını ancak apoptozise rastlanmadığını rapor edilmiştir. Usnik asidin izole edilmiş karaciğer mitokondrilerinin inhibisyonuna neden olduğu ve oksidatif fosforilasyonu engellediği gözlenmiştir.

Yücel *et al.* (2007) Türkiye’de yetişen bir liken türü olan *Cladonia rangiformis*’in antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada bu likenin kloroform, metanol ve sulu ekstralarının önemli antioksidan aktiviteler sergilediği gözlenirken düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Mutlu (2008) Türkiye’de yayılış gösteren *Evernia divaricata* (L.) Ach., *Flavo cetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt ve A. Thell, *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fühnr. *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach. ve *Usnea filipendula* Stirt. likenlerinin su, etanol ve aseton ekstralarının antioksidan etkilerini araştırdığı çalışmasında ilgili likenlerin tümünün antioksidan etkiye sahip olduğunu rapor etmiştir. *E. divaricata* ekstraları antioksidan aktivite bakımından; Su<Etanol<Aseton şeklinde sıralanmıştır. Aynı çalışmada fenolik bileşik miktarı ile antioksidan aktivite arasında ilişki olduğu da rapor edilmiştir. Nitekim antioksidan aktivitenin yüksek olduğu liken türlerinde fenolik bileşiklerin de yüksek olduğu gözlenmiştir.

Luo *et al.* (2009) Çeşitli liken türlerinin *in vitro* da antioksidan etkilerinin araştırdıkları çalışmalarında *Umbilicaria antarctica*, *Cladonia furcata*, *Sphaerophorus globosus* ve *Usnea antarctica* aseton ekstraktları metanol ekstraktlarından daha güçlü antioksidan etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. İlgili likenler içerisinde *Umbilicaria antarctica*'nın aseton ekstraktından izole edilen lekanorik asit nedeniyle en güçlü antioksidan etkiyi gösterdiği gözlemlenmiştir.

Nedeljka *et al.* (2011) Usnik asit içeren bir liken türü olan *Toninia candida*'nın metanol, kloroform ve eter ekstraktlarının içerdikleri fenolik bileşikler sayesinde güçlü antioksidan aktivite sergilediğini bildirmiştir.

Song *et al.* (2012), çeşitli likenlerden izole edilen usnik asidin anti-anjiogenez aktivitesini *in vivo* şartlarda piliç koriyoallontoik membran modelinde ve vasküler endotelial gelişimini ise fare korneal anjiogenez modelinde değerlendirmişlerdir. Çalışmalar sonucunda usnik asidin her iki deney modelinde de anjiogenezi güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.

Sahu *et al.* (2012) zayıflama preparatlarında gıda takviyesi olarak kullanılan usnik asidin insan hepatoblastoma HepG2 hücre kültürlerinde etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda usnik aside maruz bırakılmış hücrelerde usnik asidin oksidatif stres oluşturarak sitotoksisteye neden olduğu rapor edilmiştir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEMLER**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması**

Bu çalışmaya yaşları 20 ile 25 arasında ( $21,3\pm 1,8$ ) bayan, sigara ve alkol kullanmayan, belirli bir hastalığı saptanmayan ve mesleği dolayısıyla fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalmamış 5 gönüllü birey dahil edildi. Heparinize enjektöre alınan periferik kan numuneleri, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Toksikoloji ve Doku Kültürü Laboratuvarlarında yürütülen biyokimyasal ve genetik araştırmalarda kullanıldı.

90 µg/ml usnik asit 4 ml aseton içerisinde çözüldükten sonra hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Yapılan ön denemelerden elde edilen sonuçlar ve mevcut literatür bilgileri doğrultusunda usnik asidin kültürlere uygulanacak olan dozları tespit edildi. Usnik asit 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında kültürlere uygulandı. Genotoksisite araştırmaları 72 saatlik tam kan kültürleri üzerinde yapıldı. Biyokimyasal araştırmalar ise 2 saatlik tam kan kültürleri üzerinde yapıldı. Bu sürenin sonunda kültürler sonlandırılarak uygulanacak olan test tekniklerine uygun prosedürler izlenerek preparatlar elde edildi. Elde edilen preparatlar daha sonra analiz edilmek üzere uygun koşullarda saklandı. Negatif kontrol grubu (Kontrol<sup>-</sup>) olarak kurulan kültürlere herhangi bir ekstre eklenmedi. Ayrıca TAK analizlerinde pozitif kontrol (Kontrol<sup>+</sup>) olarak askorbik asit (10µM); TOD analizlerinde pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (25 µM); KA ve MÇ testleri için ise pozitif kontrol olarak mitomisin-C ( $10^{-7}$ M) kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler**

Çalışmada kullanılan (+)-usnik asit (CAS No: 7562-61-0) Sigma-Aldrich® firmasından, kromozom medium B Biochrom® firmasından, sitokalazin-B, L-glutamine, kolsişin,

giemsa, askorbik asit, hidrojen peroksit, mitomisin-C Sigma® firmasından, potasyum klorür (KCl), glasiyal asetik asit ve sodyum hidrojen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) Riedel-de Haent® firmasından, metanol ve potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Fluka® firmasından, sodyum heparin Roche® firmasından, TAS ve TOS kitleri Rel Assay Diagnostics® firmasından temin edilmiştir.

### 3.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar

Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlarla ilgili bilgiler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar

<b>Aletler ve Cihazlar</b>	<b>Temin Edildikleri Firmalar</b>
Distile su cihazı	Easypure RF compact ultarpure ws, USA
Etüv	Heraeus FB 420, Germany
Hassas terazi	Sartorius AG, Germany
Mikroskop	Prior T-100 mA, England
Otomotik pipet	Finpipette Labsystems, Finland
pH metre	Handylab - 2BNC
Santrifüj	Heraeus 4600, Germany
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA
Su banyosu	Nüve BM 101, Nüve M.S.L.T.A, Ankara

### 3.1.4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

#### **Hipotonik çözeltinin hazırlanışı**

0,5592 gr KCl tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. Konsantrasyonu 0,075 M olan KCl çözeltisi kullanılmadan önce etüvde 37°C’ye kadar ısıtıldı.

**Tespit (fiksatif) çözeltilisinin hazırlanışı**

1 kısım Glasiyel asetik asit'in üzerine 3 kısım metanol ilave edilerek iyice karıştırıldı. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlandı. Kullanmadan önce buzdolabında (+4°C'de) soğutuldu.

**Giemsa boya çözeltilisinin hazırlanışı**

A Çözeltisi:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'ten 11,88gr tartılarak 1litre distile suda çözüldü.

B Çözeltisi:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ten 9,08gr tartılarak 1 litre distile suda çözüldü.

A çözeltisinden 30 ml şaleye konuldu. Üzerine; pH metre 6,8'i gösterinceye kadar B çözeltisinden ilave edildi. Sonra üzerine 5 ml Giemsa boyası eklendi. Pipetajla karıştırıldı. Üzerinin yağı kurutma kâğıdı ile alındı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

**3.2. Yöntemler****3.2.1. Genotoksisite testleri**

Genotoksisite araştırmaları, güvenilir ve oldukça yaygın olarak kullanılan Kromozom aberasyonları (KA) ve Mikroçekirdek (MÇ) teknikleri kullanılarak yürütüldü. Tüm kromozom çalışmalarında olduğu gibi bu araştırmada da özellikle hücre kültürlerindeki kontaminasyon ihtimalini azaltmak ve çalışma sırasında optimum miktarda hücre elde edebilmek için sterilite, pH ve sıcaklık koşullarına dikkat edildi.



**Kromozom Aberasyonları (KA) Yöntemi**

- 1) Protokol numarası verilmiş steril hücre kültür tüplerine (cellstar) önceden hazırlanmış ve 37°C'ye getirilmiş besiyerinden (Chromosome Medium B) 6 ml konuldu.
- 2) Besiyerinin üzerine 0,5 ml tam kan eklendi.
- 3) Tüplerdeki kültürler son konsantrasyonları 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml olacak şekilde test edilen liken asidi (usnik asit) ilave edildi.
- 4) Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı ve kapakları kapatılarak 37°C'lik etüve bırakıldı.
- 5) İnkübasyon başlangıcından 70 saat 15 dk sonra, colcemid çözeltisinden (+4°C de muhafaza edilmiş, 10 µg/ml konsantrasyonunda) 0,1 cc tüm kültürler eklendi.
- 6) Tüpler tekrar etüve yerleştirilerek (37°C'de) 1 saat 45dk daha beklendi.
- 7) 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler santrifüj işlemine alındı.
- 8) Kültürler 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- 9) Santrifüj süresinin sonunda süpernatant pastör pipeti ile atıldı.
- 10) Tüpte kalan çökeltinin (pellet) üzerine 8 ml Hipotonik çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi.
- 11) Hipotonik çözelti eklenen tüpler 37°C'lik etüvde 15-20 dk bekletildi.
- 12) Bekleme süresi sonunda etüvden çıkarılan tüpler 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 13) Tüpte kalan pellet üzerine taze hazırlanmış soğuk tespit çözeltisinden yavaş yavaş 7 ml eklenerek 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 14) Bir önceki basamak iki kez daha tekrar edildi.
- 15) Son süpernatant da atıldı ve pellet pastör pipeti ile yavaş yavaş karıştırıldı.
- 16) Pipetle çekilen pellet önceden üzerine protokol numarası yazılmış, temizlenmiş ve soğutulmuş (+4°C) lamlara 45°'lik açı ile yayılarak lamlar oda ısısında karanlık bir ortamda 3 gün kurumaya bırakıldı.
- 17) 3. günün sonunda preparatlar 15 dk. Giemsa boyasında bekletildi.
- 18) Boyama işleminin sonunda preparatlar tekrar distile sudan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

19) Kuruyan lamalar entellan kullanılarak kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi. Preparatlar ışık mikroskopunda immersiyon ( $\times 100$ ) objektifi ile incelendi. Her bir bireyden 30 metafaz plağı incelendi. Bu metafazlarda kromatid ve kromozom gap'leri ile kromatid ve kromozom kırıkları değerlendirmeye alınarak hücre başına ortalama KA değeri elde edildi.

### **Mikroçekirdek (MÇ) Yöntemi**

KA yönteminde olduğu gibi kültür ortamı hazırlandı. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra, sitokalazin-B'den son konsantrasyonu  $3\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde tüm kültürler ilave edildi. 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler santrifüj işlemine alındı. Santrifüj işlemleri, hipotonik ve tespit çözeltilerinin ilave edilmesi ile yaymaların yapılmasında KA için verilmiş olan protokol uygulandı. Yayma işlemini takip eden 3. günün sonunda preparatlar 15dk. Giemsa boyasında bekletildi. Boyama işleminin sonunda preparatlar tekrar distile sudan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamalar entellan kullanılarak kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi. Preparatlar ışık mikroskopunda immersiyon ( $\times 100$ ) objektifi ile incelendi. Mikroçekirdek oluşumunu değerlendirmek için hazırladığımız sitokalazin-B'li kültürlerde elde edilen binükleuslu hücrelerde MÇ değerlendirme kriterleri dikkate alındı. Mononükleuslu, trinükleuslu veya daha fazla çekirdekli hücreler değerlendirme dışı bırakıldı. Her bir kültürde en az 1000 binükleuslu hücre incelenerek MÇ/1000 hücre değerleri hesaplandı.

### **3.2.2. Biyokimyasal analizler**

Usnik asidin doza bağlı olarak 2 saatlik periferik kan kültürleri üzerine biyokimyasal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) ölçüldü.

### **Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)**

TAK düzeyi tespitinde, ilk olarak Tomasch *et al.* (2001) tarafından uygulanan fotomerik yöntem kullanıldı. Bu yöntem 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat=ABTS+) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitenin tespitini temel almaktadır. Tespit işleminde Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TAS (total antioxidant status) ticari kitleri kullanıldı (Erel 2004).

#### **Kit Bileşenleri**

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10 ml

30 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 660 nm'de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 75 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm'de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak TAK düzeyleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

$$\text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)} = [ (\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Örneğin değeri}) ] / [ (\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Standart 2'nin absorbansı}) ] \times 20$$

### **Toplam Oksidan Durum (TOD)**

TOD (total oksidan durum), tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-o-dianisidin yapısını ferik iyona oksitlerler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kat hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar “xylenol orange” ile renkli bir kompleks meydana getirirler.

Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Araştırmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS (total oxidant status) ticari kitleri kullanıldı.

#### Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10ml

75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm'de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 530 nm'de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

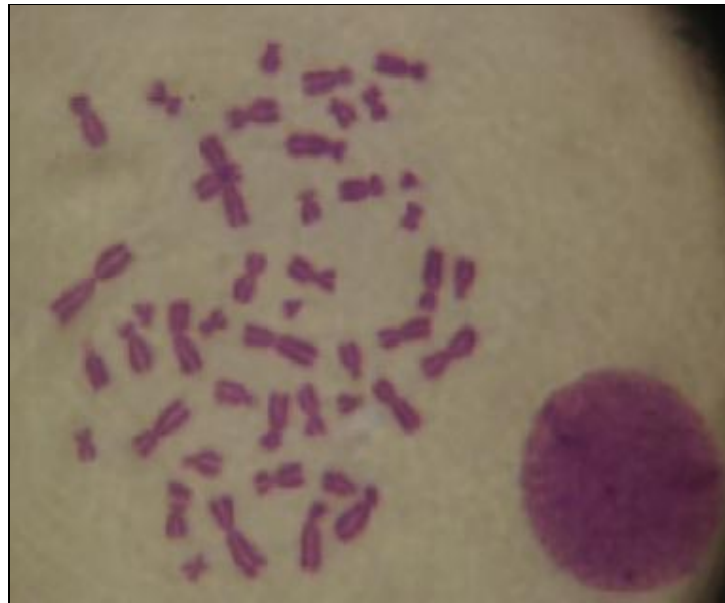
$$\text{TOD } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) = (\Delta\text{Örneğin değeri}/\Delta\text{Standart 2'nin değeri}) \times (\text{Standart 2 değeri})$$

### 3.3. İstatiksel İşlemler

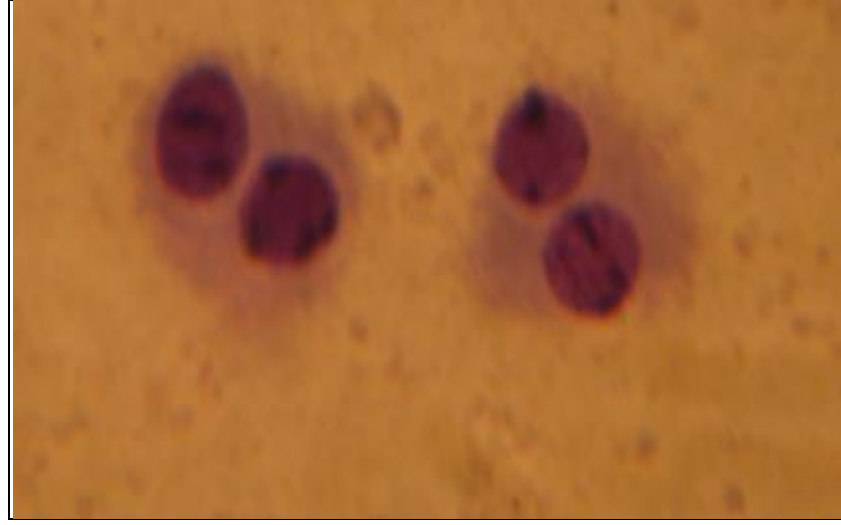
Çalışmadan elde edilen bulguların istatiksel yönden değerlendirilmesinde S.P.S.S 18 programı kullanıldı. Tespit edilen KA ve MÇ analizlerinde belirlenen ortalamalar ile TAK ve TOD düzeylerinin kontrol ve deney grupları arasında değişiklik gösterip göstermediği varyans analizi kullanılarak belirlendi (Seymen vd 2000; Bukowska and Kowalska 2004). Varyans analizi için one way Anova testlerinden Duncan testi kullanıldı. Elde edilen veriler 0.05 anlam seviyesi göz önünde bulundurularak yorumlandı.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Farklı konsantrasyonlarda usnik asidin ilave edildiği insan tam kan kültürlerinden elde edilen biyokimyasal sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Sonuçlarımız usnik asidin kontrol grubuna (Kontrol) kıyasla 10, 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının TAK düzeylerini değiştirmediğini; ancak 1 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarının ise TAK düzeylerini yükselttiğini ortaya koymuştur. 200 µg/ml konsantrasyonu TAK düzeyini istatistiksel açıdan önemli derecede azaltmıştır. Diğer taraftan, söz konusu usnik asit çalışılan tüm konsantrasyonlarda TOD düzeyini değiştirmemiştir. Ayrıca Çizelge 4.2’de sunulan sitogenetik analiz sonuçlarımıza göre in vitro koşullarda usnik asite maruz bırakılan kùltürlerden elde edilen KA/hücre ve MÇ/1000 hücre değerleri de kontrol grubu değerinden (Kontrol) farklı bulunmamıştır. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, hidrojen peroksit ve mitomisin-C’ nin sırasıyla TAK, TOD, MÇ ve KA oranlarını istatistiksel açıdan önemli derecede arttırdığı da tespit edilmiştir. Mikroçekirdek ve kromozom aberasyonu test tekniklerine uygun olarak hazırlanmış preparatlardan elde edilen örnek MÇ ve KA fotoğrafları sırasıyla şekil 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.



**şekil 4.1.** 200 µg/ml usnik asit uygulanmış insan lenfosit hücre metafaz plağı örneği (1000X)



**Şekil 4.2.** 200 µg/ml usnik asit uygulanmış insan lenfosit hücrelerinde örnek binükleotid hücre fotoğrafı (1000X)

**Çizelge 4.1.** *In vitro* koşullarda usnik asidin biyokimyasal etkileri

Gruplar	TAK (mmol Trolox Equiv./L)	TOD (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv./L)
Kontrol <sup>-</sup>	6.28 ± 0.65 <sup>b</sup>	12.53 ± 2.58 <sup>a</sup>
Kontrol <sup>+</sup>	14.08 ± 0.97 <sup>d</sup>	39.32 ± 4.64 <sup>c</sup>
1 µg/ml	8.46 ± 0.53 <sup>c</sup>	12.27 ± 2.52 <sup>a</sup>
5 µg/ml	9.25 ± 0.64 <sup>c</sup>	12.36 ± 2.57 <sup>a</sup>
10 µg/ml	6.23 ± 0.52 <sup>b</sup>	12.48 ± 2.76 <sup>a</sup>
25 µg/ml	6.38 ± 0.66 <sup>b</sup>	12.39 ± 2.58 <sup>a</sup>
50 µg/ml	6.33 ± 0.62 <sup>b</sup>	12.24 ± 2.49 <sup>a</sup>
100 µg/ml	6.27 ± 0.59 <sup>b</sup>	12.62 ± 2.81 <sup>a</sup>
200 µg/ml	5.78 ± 0.49 <sup>a</sup>	13.66 ± 2.75 <sup>b</sup>

\*Değerler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=5). Aynı sütundaki farklı harfler P<0.05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. TAK için kontrol<sup>+</sup> = Askorbik asit (10µM); TOD için kontrol<sup>+</sup> = hidrojen peroksit (25 µM)

**Çizelge 4.2.** *In vitro* koşullarda usnik asidin sitogenetik etkileri

Gruplar	MÇ/1000 hücre	KA/hücre
Kontrol <sup>-</sup>	4.22 ± 0.76 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>
Kontrol <sup>+</sup>	8.96 ± 1.23 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.11 <sup>b</sup>
1 µg/ml	4.24 ± 0.49 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>a</sup>
5 µg/ml	4.17 ± 0.51 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>a</sup>
10 µg/ml	4.28 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>a</sup>
25 µg/ml	4.18 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>
50 µg/ml	4.23 ± 0.47 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>a</sup>
100 µg/ml	4.25 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.05 <sup>a</sup>
200 µg/ml	4.19 ± 0.45 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>

\*Değerler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=5). Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. KA ve MÇ testleri için kontrol<sup>+</sup> = Mitomisin-C (10<sup>-7</sup>M)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut çalışmada, usnik asidin genotoksik etkili olmadığı tespit edilmiştir. Nitekim, elde ettiğimiz sonuçlar kontrol değerlerine kıyasla usnik aside maruz bırakılan insan lenfositlerinde KA/hücre ve MÇ/1000 hücre oranlarında önemli bir değişikliğin olmadığını göstermiştir. KA testi, biyolojik ve kimyasal ajanlara maruziyetin çok önemli ve faydalı bir indikatörü olarak kabul edilmektedir (Padovani *et al.* 1997). Benzer şekilde MÇ testi, klastojenik ve anojenik aktivitelerde hem kromozom kırığı hem de kromozom kaybı ya da ayrılmamasına dair ölçüm olanakları sağlamaktadır (Karaman *et al.* 2009). Bulgularımız daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. *Ramalina farinacea* ve *Cladonia foliacea* likenlerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada usnik asidin insan lenfositlerinde MÇ indüksiyonuna yol açmadığı ve bu nedenle non-genotoksik etkili olduğu önerilmiştir (Koparal *et al.* 2006). Yine *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında (metabolik aktivitenin varlığı ve yokluğunda) usnik asit, fisodik asit ve fisodalik asidin mutajenik aktiviteleri araştırılmıştır. Araştırmacılar Ames Salmonella testi ile usnik ve fisodik asidin test suşları üzerinde mutajenik etki sergilemediğini, aksine fisodalik asidin ise TA100 suşu üzerinde doza bağlı olarak mutajenik etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir (Shibamoto and Wei 1984). Başka bir çalışmada, ana bileşeni usnik asit olan *Usnea florida* (L.) Wigg. ex Web. em Clerc., *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. Vainio ve *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach. likenlerinin sulu ekstrelerinin genotoksik etkileri insan tüm kan kültürlerinde KA ve MÇ testleri ile değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmanın sonuçlarına göre, üç liken ekstresinin de genotoksik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Turkez *et al.* 2012). Yine, usnik asit içerdiği bilinen *Pseudevernia furfuracea*, *Ramalina capitata* ve *Rhizoplaca melanophthalma* likenlerinin sulu ekstrelerinin genotoksik etkileri kardeş kromatid değişimi (KKD) ve MÇ testleri ile insan kan hücre kültüründe incelenmiştir. Araştırmacılar, her iki test sisteminde de liken ekstrelerinin non-mutajenik özellik sergilediğini rapor etmiştir (Geyikoğlu *et al.* 2007). Diğer taraftan *in vitro* ve *in vivo* şartlarda yürütülen bir çalışmada usnik asidin genotoksikite potansiyeli V79 hücre kültürleri ve Swiss fareleri üzerinde araştırılmıştır. Araştırma sonucunda usnik asidin mikroçekirdek oluşumuna



yol açmadığı tespit edilirken, yüksek dozlarda DNA hasarına neden olduğu (comet testi ile) rapor edilmiştir (Leandro *et al.* 2013).

Antioksidanlar, oksitleyici zincir reaksiyonlarının başlamasını ya da yayılmasını engelleyerek oksidasyon sürecini inhibe eden veya geciktiren bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda bütillenmiş hidrokianizol (BHA), bütillenmiş hidrokstitoluen (BHT) ve tert-bütillhidrokinon (TBHQ) içeren sentetik antioksidanların pek çoğu gıda sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, çeşitli organlar üzerinde toksisite ve karsinogenisiteye neden olduğu tespit edilen sentetik antioksidanların kullanımına sınırlamalar getirilmiştir (Heng *et al.* 2010). Bu nedenle, doğal kaynaklı, daha etkili ve daha az zararlı antioksidanların geliştirilmesi ve kullanımının oldukça gerekli olduğu rapor edilmiştir (Heng *et al.* 2010). Bilindiği gibi, memeli hücrelerinde nükleik asitler ve proteinler gibi biyolojik makromoleküller kendilerini antioksidanlar sayesinde korurlar (Kedziora-Kornatowska *et al.* 2004). Bu çalışmanın sonuçları, test edilen usnik asidin kuvvetli olmayan antioksidan etki sağladığını ortaya koymaktadır. Bulgularımıza benzer olarak, *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) likeninden izole edilmiş usnik asidin antioksidan ve pro-oksidan etki potansiyeli UV-B ışınları altında bir insan lenfosit hücre hattı (Jurkat hücreleri) kullanılarak araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, usnik asidin doza bağlı olarak pro-oksidan ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Kohlhardt-Floehr *et al.* 2010). Yapılan diğer bir çalışmada, indometazin tarafından indüklenen gastrik ülserli sıçanlarda usnik asidin glutatyon (GSH) ile süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak, lipid peroksidasyonu azaltarak ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ederek antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Odabaşoğlu *et al.* 2006). Usnik asidin pro-oksidan/antioksidan aktiviteleri farklı araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Toledo Marante *et al.* 2003; Valencia-Islas *et al.* 2007). Daha önce yayımlanmış olan çalışmalarda usnik asit içerdiği belirlenmiş olan *Usnea ghattensis* (Behera *et al.* 2006), *Hypogymnia physodes* ve *Parmelia sulcata* (Kosanić *et al.* 2011), *Flavoparmelia caperata* ve *Evernia prunastri* (Mitrović *et al.* 2011) liken ekstrelerinin antioksidan özelliğe sahip oldukları kaydedilmiştir (Duman *et al.* 2008).

Mevcut çalışmamızın sonuçlarına göre, usnik asit en yüksek uygulama dozunda (200 µg/ml) TOD seviyesinde anlamlı artışlara neden olmuştur. Söz konusu usnik asidin sitotoksik etkisi oksidatif stresi indüklemesine atfedilebilir. Likenlerin 1000'den fazla sekonder metabolitinin hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullar altında doza bağlı toksisitesi hakkında bilinenler oldukça yetersizdir. Ancak literatürde temel likenik metabolit olarak usnik asidin toksik etkileri hakkında sınırlı bilgi vardır. Daha önceki çalışmalarda usnik asidin keratinosit kültürlerinde sitotoksositeye neden olduğu ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Kumar and Muller 1999). Bu *in vitro* çalışmanın yanı sıra usnik asit muamelesinin *in vivo* da farelerin polikromatik eritrositlerinin çoğalmasını inhibe ettiği de rapor edilmiştir (Al Bekairi *et al.* 1991). Ayrıca, mevcut çalışmada test edilen liken türlerinin insan kan hücreleri üzerinde herhangi bir genetik hasara yol açmaksızın, artan konsantrasyonlara bağlı olarak sitotoksik etkiler gösterdiğini kanıtlayan önemli bulgular sunmaktadır. Bu bulguları destekler nitelikte, usnik asidin DNA hasarı yapmadığı ancak hücrelerin normal metabolik sürecinin bozulmasına ve oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiştir (Mayer *et al.* 2005). *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen bir başka çalışmada usnik asidin primer mürin hepatosit kültürlerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olarak ve doğrudan mitokondri fonksiyonlarını inhibe ederek hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmiştir (Han *et al.* 2004). Bulgularımızı destekler nitelikte da Silva Santos *et al.* (2006) usnik aside bağlı olarak oluşan hepatoksisite de oksidatif stres ve mitokondri inhibisyonunun etkili olabileceğini önermiştir.

Sonuç olarak, bulgularımız laboratuvarlarımızda test edilen usnik asidin mutajenik etkiye sahip olmadığını açıkça göstermiştir. Üstelik, usnik asitin kültürlere ilave edildiği doza bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Böylece, doğal antioksidan terapileri için usnik asit gibi liken sekonder metabolitlerinin biyo-kaynaklar olarak kullanım potansiyellerine sahip oldukları açıkça ortaya konmuştur.

## KAYNAKÇA

- Abo-Khatwa, AN., Al-Robai, AA., Al-Jawhari, DA., 1996. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria, *Nat Toxins*, 4, 96.
- Adler, I D., 1984. Cytogenetic tests in mammals. *Mutagenicity testing* (Eds). Venitt, S. and Parry, J. M., IRL Press, Washington.
- Ahad, AM., Goto, Y., Kiuchi, F., Tsuda, Y., Kondo K. and Sato T., 1991. Nematocidal principles in "oakmoss absolute" and nematocidal activity of 2,4-dihydroxybenzoates. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 39, 1043.
- Akkus, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. baskı. Mimoza Yayınları Konya.
- Al-Bekairi, AM., Qureshi ,S., Chaudhry, MA., Krishna, DR. and Shah, AH., 1991. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 33, 217-220.
- Alp, HH., 2005. Hiper ve Hipotroidili Hastalarda Homosistein S-Adenozilmetiyonin ve Antioksidan Düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alpsoy ,L., Orhan, F., Nardemir, G., Agar, G., Gulluce, M., Aslan ,A. , 2013. Antigenotoxic potencies of a lichen species, *Evernia prunastri*. *Toxicol Ind Health*.
- Anonymus, 2004 <http://ntp-server.niehs.nih.gov/>
- Armstrong, RA., 2004. Lichens, lichenometry and global warming. *Microbiologist*, 5(3), 32-35.
- 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. ve Kaya E., 1998. Likenlerin ekonomik önemi ve Oltu bölgesinden tespit edilen önemli liken türleri. Geçmişten geleceğe Oltu ve Çevresi Sempozyumu, Erzurum.
- Aycicek, A., Iscan, A., Erel, O., Akcali, M. and Selek, S., 2006. Total antioxidant/oxidant status in meningism and meningitis. *Pediatric Neurology* (Chippewa Falls, WI), 35 (6), 382-386.
- Aydilek, N. ve Aksakal, M., 2003. Testosteronun Tavşanlarda Karaciğer Antioksidan Sistemi Üzerine Etkisi. *YYU Vet Fak Derg.*, 14 (2), 22-25.
- Bačkorová,M., Bačkor,M., Mikeš,J., Jendželovský,R., Fedoročko,P., 2011. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology in Vitro*, 25( 1), 37–44.
- Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del Ry S., Andreassi, MG., Ballardini, M., Bulleri, M., He J., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F. and Landi, S., 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (New York, NY), 31 (3), 228-242.
- Baron, G., 1999. *Understanding Lichens*. Richmond Publishing Slough, England.
- Barton, DHR., Deflorin, AM., Edwards, OE., 1956. The synthesis of usnic acid. *J Chem Soc*, 530–534.

- Behera, BC., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U., 2006. Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, 39(1), 80–85
- Behera, BC., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U., 2005. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytother Res*, 19(1), 58-64.
- Benzie, IF. and Strain, JJ., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* (New York, NY), 239, 70-76.
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. and Cosic, V., 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology* (London), 54 (5), 356-361.
- Bezivin, C., Tomasi, S., Rouaud, I., Delcros, JG., Boustie, J., 2004. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convolute*. *Planta Med.*, 70 , 874–877
- Boustie, J. and Grube, M., 2005. Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3 (2), 273-287.
- Boyacıoğlu, M., 2004. İzmir körfezi sedimentlerinde direkt mutajenlerin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21 (1-2), 23-27.
- Bukowska, B. and Kowalska, S., 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters* (Amsterdam), 152 (1), 73-84.
- Burçak, G. ve Andican, G., 2004. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med.*, 35, 159-169.
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F. and Verotta, L., 2009. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Medica*, 75 (6), 607-613.
- Campanella, L., Delfinia, M., Ercolea, P., Iacoangelib, A., Risuleo, G., 2002. Molecular characterization and action of usnic acid, a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochimie*, 84 (4), 329–334.
- Candan, S., 2002. Nikel ve oksidatif stres. *Uzmanlık Tezi*, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya anabilim Dalı, Ankara.
- Cansaran, D., Kahya, D., Yurdakulola, E. ve Atakol, O., 2006. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung*, 61 (11-12), 773-776.
- Cetin, H., Tufan-Cetin, O., Turk, AO., Tay, T., Candan, M., Yanikoglu, A., Sumbul, H., 2012. Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Nat Prod Res.*, 26(4), 350-355.
- Ceylan, E., Gulsun A., Gencer M. ve Aksoy N., 2005. A new parameter in the detection of tuberculosis activity: reactive oxygen metabolites. *Respiration*, 72 (2), 156-159
- Chaudhary, AK., Nokubo, M., Reddy, GR., Yeola, SN., Morrow, JD. and Blair, IA., 1994. Detection of endogenous malonaldehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, 265, 1580-1582.

- Cheng ,YB., Wei, LL., Gu, N., Si, KW., Shi, L., Li, XQ., Li, C., Yuan, YK., 2009. Oral acute toxicity of (+)-usnic acid in mice and its cytotoxicity in rat cardiac fibroblasts. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 29 (8),1749-1751.
- Cocchietto M, Skert, N, Nimis, PL, Sava, G., 2002.A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* , 89, 137–146.
- Cooke, MS. , Evans, MD., Dizdaroğlu ,M. and Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal* (Bethesda, MD), 17, 1195-1214.
- Çavdar, C., Sifil A. ve Çamsarı T., 1997. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *J Turk Nephrol.*, 3-4, 92-95.
- Cetin, H., Tufan-Cetin O., Turk, AO., Tay, T., Candan, M., Yanikoglu, A.ve Sumbul, H., 2008. Insecticidal activity of major lichen compounds, (-)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L.. *Parasitology Research* (Berlin), 102 (6), 1277-1279.
- da Silva Santos NP, Nascimento, SC., Wanderley, MS., Pontes-Filho ,NT., da Silva, JF., de Castro ,CM., Pereira, EC., da Silva, NH., Honda, NK., Santos-Magalhães, NS., 2006 . Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm.*, 64(2),154-160.
- Dailey, RN., Montgomery, DL., Ingram ,JT., Siemion, R., Vasquez, M., Raisbeck, MF. ,2008.Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep. *Vet Pathol* , 45 (1),19-25.
- Demirel, S. ve Zamani, A. G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg.*, 12 (3), 123-127.
- Demiroğlu, C., 2003. Ereğli demir-çelik fabrikası kok fırını işçilerinde genotoksik hasarın mikroçekirdek ve kromozomal aberasyon teknikleri ile araştırılması. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara. der Bundesrepublik Deutschland
- Dilsizoğlu, A., Kavuncuoğlu, Z. and Oba, D., 2004. Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. *Tübitak Bilim ve Teknik*, 439, 86-89.
- Dobrescu, D., Tănăsescu, M., Mezdrea, A., Ivan, C., Ordosch, E., Neagoe, F., Rizeanu, A., Trifu, L. and Enescu, V., 1993. Contributions to the complex study of some lichens--*Usnea* genus. Pharmacological studies on *Usnea barbata* and *Usnea hirta* species. *Romanian Journal of Physiology*, 30 (1-2), 101-107.
- Dobson, FS. , 2000. *Lichens An Illustrated Guide to the British and Irish Species.* Cambrian Printers, England.
- Dobson, FS., 2005. *Lichens: An Illustrated Guide to British and Irish Species, by Fifth Edition* Richmond Publishing.
- Duman,D., Aras ,S. ve Atakol, O., 2008. Determination of Usnic Acid Content in Some Lichen Species Found in Anatolia. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2 (3), 41-44.
- De Carvalho, EAB., Andrade, PP., Silva, NH., Pereira, EC., Figueiredo, RCBQ., 2005. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: an ultrastructural study. *Micron*, 36 (2), 155–161.
- Eken, A., 2003. Hiberbarik oksijen tedavisi, oksidatif stres ve genetik toksisite arasındaki ilişkinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Elo, H, Matikainen, J, Pelttari, E.,2007. Potent activity of the lichen antibiotic (+)- usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Naturwissenschaften*, 94, 465–468.
- Emmerich, R., Giez, I., Lange, OL. and Proksch, P., 1993. Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphageous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry*, 33, 1389.
- Emri, G., Wenczl, E.,Van, Erp, P., Jans, J., Roza, L., Horkay, I. and Schothorst, AA., 2000. Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *Journal of Investigative Dermatology (New York, NY)*, 115 (3), 435- 440.
- Emsen, B. ,Bulak,Y. ,Yildirim, E., Aslan ,A., Ercisli, S. 2012. Activities of two Major Lichen Compounds,Diffaractaic Acid and Usnic Acid againts *Leptinotarsa decemlineata* Say,1824(Coleoptera:Chrysomelidae ). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*,22 (1), 5-10
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry (Toronto)*, 37 (4), 277-285.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry (Toronto)*, 37 (2), 112-119.
- Esterbauer, H., Schaur RJ. and Zollner H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine (New York, NY)*, 11, 81-128.
- Einarsdóttir, E., Groeneweg, J., Björnsdóttir,GG., Harðardóttir, G., Omarsdóttir, S., Ingólfssdóttir, K., Ögmundsdóttir, HM., 2010. Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid. *Planta Med* , 76 (10),969-974.
- Fazio, AT., Adler ,MT., Bertoni, MD., Sepúlveda ,CS., Damonte ,EB. and Maier ,MS., 2007. Lichen secondary metabolites from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their antiviral activities. *Zeitschrift für Naturforschung*, 62 (7-8), 543-549.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis blocks micronucleus technique. A detailed description on the method and its application to genotoxicity studies in human Population. *Mutation Research*, 285, 35-44.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455 (1-2), 81-95.
- Francolini, I., Norris, P., Piozzi, A., Donelli, G., Stoodley, P., 2004. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 4360–4365.
- Geyikoglu, F., Turkez, H., Aslan, A., 2007. The protective roles of some lichen species on colloidal bismuth subcitrate genotoxicity. *Toxicol Ind Health.*, 23 (8), 487-92.
- Ghione, M., Parrello, D., Grasso, L.,1988. Usnic acid revisited, its activity on oral flora. *Chemioterapia*, 7, 302–305.
- Gilbert, O., 2000. What is a lichen? In: *Lichens*. The Bath Press, 28-30,Great Britain.
- Giray, B., Erkekoğlu, P., Şahin, G., 2009. Zayıflama Amacıyla Kullanılan Çok Etken Maddeli Bazı Preparatların Toksikolojik Açından Değerlendirilmesi: Fen-Phen ve Usnik Asit. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 29 (2), 131-148

- Gollapudi, SR., Telikepalli, H., Jampani, BH., Mirhom, WY., Drake, DS., Bhattiprolu, KR., Velde, DV. and Mitscher, LA., 1994. Alectosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen, *Alectoria sarmentosa*. *Journal of Natural Product*, 57 (7), 934-938.
- Guo, L., Shi, Q., Fang, JL., Mei, N., Ali, AA., Lewis, SM., Leakey, JE., Frankos, VH., 2008. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. *Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 26, 317.
- 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. and Gutteridge, JMC., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2.ed. Clarendon Pres, Oxford.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidant in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N., 2004. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, 67, 439-451.
- Harma, M., Harma, M. and Erel, O., 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatiform mole. *Swiss Med Wkly.*, 133 (41-42), 563-566.
- Harmala, P., Hiltunen, R., Caldentey, KM., Laakso, T. and Kauppinen, V., 1992. Isolation and *in vitro* cultivation of lichen algae and their antimicrobial properties. *Fitoterapia*, 63 (3), 3217-3225.
- Heng ,YJ., Di Quinzio ,MK., Permezel, M., Rice ,GE., 2010. Georgiou HM. Temporal expression of antioxidants in human cervicovaginal fluid associated with spontaneous labor. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(7), 951-7.
- Holvoet, P., Perez, G. and Zhao, Z., 1995. Malonaldehyde-modified low density lipoprotein in patients with atherosclerotic disease. *Journal of Clinical Investigation (New York, NY)*, 95, 2611-2619.
- Honegger, R., 1998. The lichen symbiosis, what is so spectacular about it?. *Lichenologist*, 30, 193-212.
- Huneck, S. and Yoshimura, I., 1996. *Identification of lichen substances*. Springer and Berlin Heidelberg, New York.
- Huneck, S., 2001. New results on the chemistry of lichen substances. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 81, 1-276.
- Ingólfssdóttir, K., 2002. Molecules of interest: usnic acid. *Phytochemistry*, 61, 729-736.
- İlbars, H., 1997. Kuaförlerde ve kozmetik üretim yerinde çalışan bireylerde olası genotoksik etkilerin mikroçekirdek testi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Jahns, HM., 1983. "Collins guide to Ferns Mosses & Lichens". *Nordic Journal of Botany*, 4 (2), 260,
- Jahns, HM., 1980. *Collins Guide to the Ferns, Mosses and Lichens of Britain and Northern and Central Europe*. Collins Graron Street, London.
- Jin, J., Dong, Y. and He, L., 2005. The study on skin wound healing promoting action of sodium usnic acid. *Zhong Yao Cai.*, 28 (2), 109-111
- Karaman, A., Kadı, M. ve Kara, F., 2009. Sister chromatid exchange and micronucleus studies in patients with Behç, et's disease. *Journal of Cutaneous Pathology*, 36, 831-837.

- Kedziora-Kornatowska, K., Czuczejko, J., Pawluk, H., Kornatowski, T., Motyl, J., Szadujkis-Szadurski, L., *et al.*, 2004. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9 (4A), 635-641.
- Kim, S., Greenleaf, R., Miller, MC., Satish, L., Kathju, S., Ehrlich, G., Post, JC., Sotereanos, NG., Stoodley, P., 2011. Mechanical effects, antimicrobial efficacy and cytotoxicity of usnic acid as a biofilm prophylaxis in PMMA. *J Mater Sci Mater Med.*, 22 (12), 2773-2780.
- Kingsbury, JM., 1964. "Poisonous Plants of the United States and Canada" Kingsbury. J.M. (Ed), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 86.
- Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J. and Truscott, TG., 2010. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB79 light irradiation-studies on human cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101 (1), 97-102.
- Koparal, AT., Tüylü, BA., Türk,H., 2006. *In vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Nat Prod Res*, 20, 1300.
- Kosanić, M., Ranković, B., Vukojević, J., 2011. Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of Food Science and Technology*, 48 (5), 584-590
- Krishna, DR, Venkataramana, D., 1992. Pharmacokinetics of D(+)-usnic acid in rabbits after intravenous and oral administration. *Drug Metab Dispos*, 20, 909-911.
- Kumar, KC. and Muller, K., 1999. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of Natural Products*, 62, 821-823.
- Lambeth, JD., 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3), 181-189.
- 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.
- Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T.,Marre, R., 1995. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 39,2541-2543.
- Lawrey, JD., 1986. Biological role of lichen substances. *The Byrologist*, 89, 111-122.
- Leandro, LF., Munari, CC., Sato, VL., Alves, JM., de Oliveira, PF., Mastrocola, DF., Martins, SP., Moraes, TD., de Oliveira, AI., Tozatti, MG., Cunha, WR., Tavares, DC., 2013. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. *Mutat Res*.
- Guo, L., Shi, Q., Fang, JL., Mei, N., Ali, AA, Lewis, SM, Leakey, JE, Frankos, VH., 2008. Review of Usnic Acid and *Usnea Barbata* Toxicity . *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 26, 317-338
- Loppi, S., Frati, L., Paoli, L., Bigagli, V., Rossetti, C., Bruscoli, C., Corsini, A., 2004. Biodiversity of epiphytic lichens and heavy metal contents of *Flavoparmelia caperata* thalli as indicators of temporal variations of air pollution in the town of Montecatini Terme (central Italy). *Science of The Total Environment*, 326 (1-3), 113-122.



- Lovell, MA., Gabbita, SP. and Markesbery, WR., 1999. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *Journal of Neurochemistry* (New York, NY), 72, 771-776.
- Luo, H., Yamamoto, Y., Kim, JA., Jung, JS., Koh, YJ. and Hur, JS., 2009. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biology*, 32 (7), 1033-1040.
- Luo, H., Wei, X., Yamamoto, Y., Liu, Y., Wang, L., Jung, JS., Hur, JS., 2010. Antioxidant activities of edible lichen *Ramalina conduplicans* and its free radical-scavenging constituents. *Mycoscience*, 51 (5), 391-395.
- Maffei, F., Forti, GC., Castelli, E., Stefanini, GF., Mattioli, S. and Hrelia, P., 2002. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutation Research/DNA Repair* (Amsterdam), 514 (1-2), 49-58.
- Maritim, AC., Sanders, RA. and Watkins, JB., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants. *J. Biochem. Molecular Toxicology*, 17 (1), 24-37.
- Halliwell, B. and Gutteridge, JMC., 2000. *Free radicals in biology and medicine*. Third ed. Oxford: Oxford Science Publications, 617-624.
- Marnett, LJ., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-370.
- Mavi, A., 2005. İnsan Eritrosit ve Lökositlerinden Süperoksit Dismutaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum
- Mayer, M., O'Neill, MA., Murray, KE., Santos-Magalhães, NS., Carneiro-Leão, AMA., Thompson, AM. and Appleyard VCL., 2005. Usnic acid, a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anticancer Drugs*, 16 (8), 805-809.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg.*, 15 (1-2), 91-96.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, L., Đačić, D., Čurčić, M. and Marković, S., 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 5428-5448
- Moreira, CT., Oliveira, AL., Comar, JF., Peralta, RM., Bracht, A., 2013. Harmful effects of usnic acid on hepatic metabolism. *Chem Biol Interact.*, 203 (2), 502-511.
- Mutlu, S., 2008. Bazı liken türlerinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Müller, K., 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (1-2), 9-16.
- Nakamura, K., Endo, H. and Erel, O., 1997. Serum oxidation activities and rheumatoid arthritis. *International Journal of Tissue Reactions* (Geneva), 9 (4), 307-316.
- Nash, I. and Thomas, H., 1996. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, 304.
- Nash III, T.H. (1996), *Lichen Biology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Nedeljko, TM., Perica, JV., Pavle, ZM., 2012. Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (2), 291-298
- Neri, M., Fucic, A., Knudsen, LE., Lando, C., Merlo, F. and Bonassi, S., 2003. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutation Research/DNA Repair* (Amsterdam), 544 (2-3), 243-254.

- O kuyama, E., Umeyama, K., Yamazaki, M., Kinoshit, Y., Yamamoto, Y., 1995. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med*, 61, 11
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y. ve Halici, M., 2005. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76 (2), 216-219.
- Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, ET., 2002. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Ozen, T., Kinalioğlu, K., 2008. Determination of antioxidant activity of various extracts of *Parmelia saxatilis*. *Biologia*, 63(2), 211-216.
- Padovani, L., Tronati, L., Mauro, F., Testa, A., Appolloni, M., Azzidei, P., Caporossi, D., Tedeschi, B. and Vernole, P., 1997. Cytogenetic effects in lymphocytes from children exposed to radiation fall-out after the chernobyl accident. *Mutation Research*, 395, 249-254.
- Pasha, SA., Sankar, S., Reddy, SC., Das, PG. and Jamil, K., 2006. Lead-induced genotoxicity in lymphocytes from peripheral blood samples of humans: *in vitro* studies. *Drug and Chemical Toxicology (New York, NY)*, 29 (1), 111-124.
- Pelevina, II., Aleshchenko, AV., Gotlib, VI., Kudriashova, OV., Semenova, LP. And Serebrianyi, AM., 2005. Effect of low dose irradiation on the reaction of blood lymphocytes of individuals with the somatic diseases. *Radiats Biol Radioecol.*, 45 (4), 412-415.
- Pires, RH., Lucarini, R. and Mendes-Giannini, MJ., 2011. Effect of Usnic Acid on *Candida orthopsilosis* and *C. Parapsilosis*. *Agents Chemother*, 56 (1), 595.
- Pramyothin, P, Janthasoot, W, Pongnimitprasert, N, Phrukudom, S., Ruangrunsi, N., 2004. Hepatotoxic effect of (+)usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol* , 90, 381–387.
- Purvis, OW., Coppins, BJ., Hawksworth, DL., James, PW. and Moore, DM., 1992. The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. Natural History Museum publications in association with the British Lichen Society, 710, London.
- Rabelo, TK., Zeidán-Chuliá, F., Vasques, LM., Dos Santos, JPA., Da Rocha, RF. Pasquali, MA., Rybarczyk-Filho, JL., Araújo, AA., Moreira, JC., 2012. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology in vitro*, 26(2), 304–314.
- Ranković, BR, Kosanić, MM., Stanojković, TP., 2011. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complement Altern Med.*, 11, 97.
- Ribeiro-Costa, RM., Alves, AJ., Santos, NP., Nascimento, SC., Goncalves, EC., Silva, NH., Honda, NK. and Santos-Magalhães, NS., 2004. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *Journal of Microencapsulation (London)*, 21 (4), 371-784.
- Richardson, DHS., 1975. *The Vanishing Lichens*. David and Charles Newton Abbot.
- Richardson, DHS., 1992. *Lichens as Pollution Monitors*. Richmond Publishing.
- Romagni, JG., Meazza, G., Nanayakkara, NP., Dayan, FE., 2000. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett*, 480, 301–305.

- Rowe, JG., Saenz, MT., Garcia, MD. and Gil, AM., 1991. Additional contribution to the study of the antimicrobial activity and identification of lichenic substances in some lichens from Southern Spain. *Annales Pharmaceutiques Francaises (Paris)*, 49 (5), 278-285.
- Safak, B, Ciftci, IH, Ozdemir, M, Kiyildi, N, Cetinkaya, Z, Aktepe, OC, Altindis, M, Asik, G., 2009. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of usnic acid. *Phytother Res.*,23 (7), 955-57.
- Sahu,SC., Amankwa-Sakyi,M., O'Donnell Jr,MW. and Sprando,RL., 2011. Effects of usnic acid exposure on human hepatoblastoma HepG2 cells in culture. *Journal of Applied Toxicology*, 32 (9), 722-730.
- Scirpa, P., Scambia, G., Masciullo, V., Battaglia, F., Foti, E., Lopez, R., Villa, P., Malecore, M., Mancuso, S., 1999. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as postsurgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. *Minerva Ginecol*, 51, 255.
- Seymen, P., Seymen, HO., Özdemir, A., Belce, A., Gümüştaş, K., Türkmen, F ve Barut, Y Ö., 2000. Cuprophan ve polisülfon dializörlerinin oksidan /antioksidan dengesi üzerine etkileri. *Cerrahpaşa J Med.*, 31 (2), 74-81.
- Shibamoto, T. and Wei CI., 1984. Mutagenicity of lichen constituents. *Environmental Mutagenesis*, 6, 757-762.
- Shibata, S., Ukita, T., 1948. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and its derivatives. *Jpn J Med*, 1, 152-155
- Soderberg, U. ,1953.A note on the action of usnic acid on anaesthetized cats. *Acta Physiol Scand*, 28, 202.
- Sokolov , DN., Zarubaev , VV., Shtro , AA., Polovinka , MP., Luzina , OA., Komarova , NI., Salakhutdinov , NF., Kiselev , OI., 2012. Anti-viral activity of (-) and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 7060–7064
- Song ,Y., Dai, F., Zhai, D., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B. , Luo, J., Liu, M., Yi, Z., 2012. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis*, 15, 421–432
- Sonko, BJ., Schmitt, TC., Guo, L., Shi, Q., Boros, LG., Leakey, JE., Beger, RD.,2011. Assessment of usnic acid toxicity in rat primary hepatocytes using <sup>13</sup>C isotopomer distribution analysis of lactate, glutamate and glucose. *Food Chem Toxicol.*, 49(11),2968-2974.
- Sugai, T., Habano, W., Jiao, YF., Suzuki, M., Takagane, A. and Nakamura, S., 2005. Analysis of genetic alterations associated with DNA diploidy, aneuploidy and multiploidy in gastric cancers. *Oncology*, 68 (4-6), 548-557.
- Taguchi, H., Sankawa, U., Shibata, S., 1969. Biosynthesis of natural products. VI Biosynthesis of usnic acid in lichens. A general scheme of biosynthesis of usnic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 17, 2054–2060.
- Tamer, AÜ., Özdemir, A., Türe, C., 1991. Likenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma. *Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dergisi*, 3(2), 49-54,
- Tarperly, MN., Wink, DA. and Grisham, MB., 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American*

- Journal of Physiology (Bethesda, MD), Regul Integr Comp Physiol, 286 (3), 431-444.
- Taylor, TN., Hass, H., Remy, W. and Kerp, H., 1995. The oldest fossil lichen. *Nature*, 378, 244.
- Tomasch, R., Wagner, KH. and Elmadfa, I., 2001. Antioxidative power of plant oils in humans: the influence of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol. *Annuals Nutrition Metabolism*, 45, 110–115.
- Thierens, H., Vral, A. and De Ridder, L., 1996. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutation Research/DNA Repair (Amsterdam)*, 360 (2), 75-82.
- Toledo Marante, F.J., Garcia Castellano, A., Estevez Rosas, F., Quintana Aguiar, J., Bermejo Barrera, J., 2003. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*, phytotoxicity and antioxidative activity. *J. Chem. Ecol.*, 29, 2049–2071
- Turkez, H., Aydın, E. and Aslan, A., 2012. Effects of Lichenic Extracts (*Hypogymnia physodes*, *Ramalina polymorpha* and *Usnea florida*) on Human Blood Cells: Cytogenetic and Biochemical Study. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (3), 889-896
- Valencia-Islas, N., Zambrano, A., Rojas, JL., 2007. Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico City. *J. Chem. Ecol.*, 33, 1619–1634
- Valko, M., Rhodes, C.J., Mancol, J., Izakovic, M. and Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions (Limerick)*, 160, 1-40.
- Vartio, K.O., 1973. Antibiotics in lichens. Academic Press, 547-561, New York.
- Verma, N., Behera, BC., Makhija, U., 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of a lichen *Usnea ghattensis in vitro*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 151 (2-3), 167-81.
- Vijayakumar, CS., Viswanathan, S., Reddy, MK., Parvathavarthini, S., Kundu, AB., Sukumar, E., 2000. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid, *Fitoterapia*, 71, 564-566.
- Vinayaka, KS., Praveen Kumar, SV., Prashith Kekuda, TR., Krishnamurthy, YL., Mallikarjun, N. and Swathi, D., 2009. Proximate Composition, Antioxidant, Anthelmintic and Insecticidal Activity of a Macrolichen *Ramalina conduplicans* Vain. (Ramalinaceae). *European Journal of Applied Sciences* 1 (3), 40-46.
- Virtanen, OE. and Karki N., 1956. On the toxicity of an usnic acid preparation with the trade name USNO.
- Vokou D., Pirintsos S., Loppi S., 1999. Lichens as bioindicators of temporal variations in air quality around Thessaloniki, northern Greece. *Ecological Research*, 14(2), 89–96.
- Wei, LL., Cheng, YB., Si, KW., Gu, N., Li, XQ., Li, C., Yuan, YK., 2008. [In vitro effect of (+)-usnic acid on *Toxoplasma gondii* tachyzoites]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.*, 30, 26 (6), 438-41.
- Yanik, M., Ere, I. O. ve Kati, M., 2004. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatr*, 16 (4), 200-203.
- Yazıcı, K. and 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.

- Yeni, E., Gulum M., Selek S., vd, 2005. Comparison of oxidative/antioxidative status of penil corpus cavernosum blood and peripheral venous blood. Int J Impot Res., 17 (1), 19-22.
- Yıldırım, A., 2003. İntakt ve Adrenalektomili Sıçanların Eritrosit ve Mide Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum.
- 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 (Tokyo) , 43,1388–1390.
- Yücel,O., Odabaşoğlu, F., Güllüce, M., Çalık, ZZ., Çakır, A., Aslan, A., Yazıcı ,K. and Halıcı ,M., 2007.Antioxıdan And Antımicrobial Properties Of A Lıchen Species, *Cladonia rangıformıs* Growing In Turkey. Turkish J. Pharm. Sci. ,4 (2) 101-109.

## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011-2013 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.