

**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN
BAZI *RAMALINA* (ACH.)TÜRLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Serpil KILIÇ YAYLA

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Zekiye KOCAKAYA**

Yozgat - 2020

**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN
BAZI *RAMALINA* (ACH.)TÜRLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Serpil KILIÇ YAYLA

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Zekiye KOCAKAYA
İkinci Danışman
Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK**

**Bu çalışma, Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 6601-FBE/19-324 kodu ile desteklenmiştir.**

Yozgat - 2020

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Likenlerin Genel Özellikleri	3
2.2. Likenlerin Sınıflandırılması	5
2.2.1.Yapıya Katılan Mantarların Cinsine Göre Likenler:	5
2.2.2.Morfolojik Şekilleri ve Üzerinde Yaşadıkları Ortama Göre Likenler	5
2.3. Likenlerde Üreme.....	6
2.4. Liken Metabolitleri.....	6
2.5. Likenlerin Kullanım Alanları.....	8
2.5.1.Besin Olarak Kullanımı	8
2.5.2.Tıp Alanında Kullanımı	8
2.5.3.Endüstri Alanında Kullanımı	9
2.5.4.Doğaya Katkıları ve Ekolojik Rollerini	9
2.6. Likenlere Uygulanan Aktivite Testlerine Ait Genel Bilgiler	10
2.6.1. Antioksidanlar ve Genel Özellikleri	10
2.6.2. Antimikrobiyaller ve Genel Özellikleri	24
2.6.3.DNA Koruyucu Etki (DNA Cleavage) Değerlendirme Testlerinin Özellikleri	33
2.6.4.Sitotoksikite Tayini	34
2.7. <i>Ramalina</i> Cinsi ve Çalışılan Türleri Hakkında Bilgiler	36
2.7.1. <i>Ramalina digitellata</i> (Nyl.) Nimis:	37
2.7.2. <i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.:.....	37
2.7.3. <i>Ramalina polymorpha</i> (Lilj.) Ach.....	39
2.7.4. <i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach.....	38
2.7.5. <i>Ramalina</i> Cinsi Türleri İle İlgili Yapılan Aktivite Çalışmaları	40

2.8. Çalışmada Test Edilen Mikroorganizmalar Hakkında Bilgiler.....	42
2.8.1. Çalışmada Test Edilen Gr (-) Bakteriler	42
2.8.2. Çalışmada Test Edilen Gr (+) Bakteriler	44
2.8.3. Çalışmada Test Edilen Mantar.....	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	46
3.1. Materyal	46
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Liken Türleri	46
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma Suşları.....	46
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Örnekleri	47
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	48
3.2. Yöntem.....	48
3.2.1. Örneklerin Tayin Yöntemi	48
3.2.2. Moleküler Analiz Yöntemleri	49
3.2.3. Ekstrelerin Hazırlanışı	49
3.2.4. Kimyasal Kompozisyon Analizleri.....	50
3.2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK - HPLC) ile Usnik Asit Miktar Tayini	50
3.2.6. Antioksidan Aktivite Tayini	51
3.2.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	52
3.2.8. DNA Koruyucu Aktivitenin Belirlenmesi	52
3.2.9. Sitotoksosite Tayini	53
4. BULGULAR.....	56
4.1. Likenlerin Teşhisi ve Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi	56
4.2. Liken Ekstrelerinin Kimyasal Kompozisyon Analizleri	57
4.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini.....	57
4.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini	57
4.2.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK-HPLC) ile Usnik Asit Miktar Tayini	58
4.3. Liken Ekstrelerinin Biyolojik Aktiviteleri	60
4.3.1. Antioksidan Aktivite Tayini	60
4.3.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	62
4.3.3. DNA Koruyucu Aktivitenin Belirlenmesi	64

4.3.4. Sitotoksisite Tayini	65
5. TARTIşMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİş.....	92



**TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN
BAZI RAMALİNA (ACH.)TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Serpil KILIÇ YAYLA

**YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

2020; Sayfa: 92

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Zekiye KOCAKAYA

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye’de yayılış gösteren, *R. digitellata* Nyl., *R. fastigiata* (Ach.), *R. fraxinea* (L.) Ach. ve *R. polymorpha* (Lilj.) Ach türlerinden elde edilen metanol ekstrelerinin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ile sitotoksik etkilerinin ve DNA koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Dört liken türü için usnik asit miktarları YBSK yöntemi ile tespit edilmiş olup en yüksek miktar *R. digitellata*’ da ($1574,53 \pm 0,81$ mg/g_{ekstre}) bulunmuştur. En yüksek toplam fenol içeriği *R. digitellata*’da ($144,69$ mg_{GAE}/g_{ekstre}), toplam flavonoit miktarı ise *R. fastigiata*’ da ($20,40$ mg_{GAE}/g_{ekstre}) tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite için DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ve ABTS [2,2’-azino-bis (3-etilbenzenotiyazolin-6-sülfonik asit)] yöntemleri kullanılmış olup, *R. fraxinea* en yüksek DPPH radikali inhibisyonu ve en yüksek ABTS radikal süpürücü aktivite göstermiştir. Antimikrobiyal aktivitenin araştırılmasında disk difüzyon yöntemi kullanılmış, en iyi etki *P. mirabilis* üzerine 12,5 mm’lik zon ile *R. digitellata*’nın metanol ekstresinde gözlenmiştir. Sitotoksik aktivite ise insan akciğer kanseri (A549) ve meme kanseri (MDA-MB-231) hücre hattı üzerine MTT testi ile saptanmıştır. A549 üzerine *R. digitellata* (% 21 canlılık 1000 µg/mL), MDA-MB-231 üzerine ise *R. fastigiata* (% 4,05 canlılık 1000 µg/mL) en iyi sitotoksik etkiyi sergilemiştir. Aynı zamanda çalışılan tüm türlerin DNA koruyucu etkisi olduğu pBR322 plazmid DNA’sı kullanılarak gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Ramalina*, Antioksidan, Sitotoksikite, Antimikrobiyal, pBR322

**DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME SPECIES
OF *RAMALINA* (ACH) DISTRIBUTED IN TURKEY**

Serpil KILIÇ YAYLA

**YOZGAT BOZOK UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology
Master of Science Thesis**

2020; Pages: 92

Thesis Supervisor: Asst. Prof. Dr. Zekiye KOCAKAYA

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate antimicrobial, antioxidant activities and cytotoxic effects and DNA protective effects of methanol extracts obtained from *R. digitellata* (Nyl), *R. fastigiata* (Ach.), *R. polymorpha* (Lilja.) Ach and *R. fraxinea* (L.) Ach. species that distributed in Turkey. The amount of usnic acid for four lichen species was determined by HPLC and the highest amount was found in *R. digitellata*. The highest total phenol content was determined in *R. digitellata* (144,6 9mg_{GAE} / g_{extract}), and the total amount of flavonoids in *R. fastigiata* (20,40 mg_{GAE} / g_{extract}). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid)] methods have been used for antioxidant activity, *R. fraxinea* showed the highest DPPH inhibition and ABTS activity. Disc diffusion method was used to investigate antimicrobial activity, and the best effect was observed in the methanol extract of *R. digitellata* with a 12.5 mm zone on *Proteus mirabilis*. Cytotoxic activity was determined by MTT test on human lung cancer (A549) and breast cancer (MDA-MB-231) cell line. *R. digitellata* (21% viability 1000 µg / mL) on A549 and *R. fastigiata* (4.05 % viability 1000 µg / mL) showed the best cytotoxic effect on MDA-MB-231. At the same time, DNA protective effect was investigated by using pBR322 plasmid DNA and all studied species were found to have DNA protective effects.

Key words: *Ramalina*, Antioxidant, Cytotoxicity, Antimicrobial, pBR322.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, ilgisini asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana çok şey katan, ayrıca görüş ve önerileriyle tez çalışmamın hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli ve kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Zekiye KOCAKAYA'ya gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım süresince bilgisini, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli eş danışmanım Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bilgisini ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Selen İLGÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Antimikrobiyal çalışmalarında bilgi ve tecrübesiyle katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Ahmet CEYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezin düzenlenme aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Esra Özge AYGÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi çok sevgili Gökçenur İLİK'e çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca kararlarımda hep arkamda duran, desteğini esirgemeyen ve bu günlere gelebilmem için bana gereken gücü veren canım annem Aysel ÇINAR'a, her zaman beni sabırla dinleyip karar vermemde yardımcı ve yol gösterici olan kıymetli abim Cem KILIÇ'a, her türlü fedakârlığıyla her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Özkan YAYLA'ya ve varlığıyla, sevgisiyle güç bulduğum canım oğlum Zeki Ozan YAYLA'ya minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde 6601-FBE/19-324 kodu ile maddi imkan sağlayan Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Reaktif oksijen (ROS) ve azot türleri (RNS)	13
Tablo 2.2. Antioksidan Sistemin Başlıca Elemanları	20
Tablo 2.3. Enzimatik Antioksidan Savunma Mekanizması	24
Tablo 2.4. Antibiyotik gelişimi ve direncin evrimi zaman çizelgesi [124]	28
Tablo 3.1. Toplanan örneklerin lokalite bilgileri.....	46
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma Suşları	47
Tablo 3.3. YBSK gradient akış tablosu	51
Tablo 4.1. Gen Bankasından indirilen ve yeni elde ettiğimiz sekanslar	56
Tablo 4.2. Likenlerin metanol ekstraktlarındaki toplam fenol ve flavonoid içerikleri .	58
Tablo 4.3. Usnik asit standardına ait kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısı	58
Tablo 4.4. Ekstrelerin içerdiği usnik asit miktarı	58
Tablo 4.5. <i>Ramalina</i> türlerinin DPPH• Radikalini Süpürücü Etki Tayini % inhibisyon değerleri.....	61
Tablo 4.6. <i>Ramalina</i> türlerinin ABTS ⁺ • radikali süpürücü aktiviteleri.....	62
Tablo 4.7. <i>Ramalina</i> ekstraktlarının çalışılan mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonları (mm).....	62
Tablo 4.8. <i>Ramalina</i> türlerinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkileri.....	69
Tablo 4.9. <i>Ramalina</i> türlerinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa olan etkileri	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Liken tallusunun anatomik yapısı	4
Şekil 2.2. <i>Ramalina digitellata</i>	37
Şekil 2.3. <i>Ramalina fastigiata</i>	38
Şekil 2.4. <i>Ramalina fraxinea</i>	39
Şekil 2.5. <i>Ramalina polymorpha</i>	39
Şekil 4.1. <i>Ramalina</i> cinsine ait ITS bölgesi filogenetik analizi	57
Şekil 4.2. <i>R. digitellata</i> ekstresine ait kromatogram	59
Şekil 4.3. <i>R. fastigiata</i> ekstresine ait kromatogram	59
Şekil 4.4. <i>R. fraxinea</i> ekstresine ait kromatogram	60
Şekil 4.5. <i>R. polymorpha</i> ekstresine ait kromatogram	60
Şekil 4.6. <i>Ramalina</i> ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri	63
Şekil 4.7. <i>Ramalina</i> ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri (Devam)	64
Şekil 4.8. Plasmid DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 65	
Şekil 4.9. MTT Testi	66
Şekil 4.10. <i>R. digitellata</i> ve <i>R. fastigiata</i> ekstrelerinin A549 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi	67
Şekil 4.11. <i>R. polymorpha</i> ve <i>R. fraxinea</i> ekstrelerinin A549 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi	67
Şekil 4.12. <i>R. digitellata</i> ekstresinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi	67
Şekil 4.13. <i>R. fastigiata</i> ekstresinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi	68
Şekil 4.14. <i>R. fraxinea</i> ekstresinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi	68
Şekil 4.15. <i>R. polymorpha</i> ekstresinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi	68
Şekil 4.16. <i>R. digitellata</i> ve <i>R. fastigiata</i> ekstrelerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi	69
Şekil 4.17. <i>R. polymorpha</i> ve <i>R. fraxinea</i> ekstrelerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi	70
Şekil 4.18. <i>R. digitellata</i> ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi. 70	
Şekil 4.19. <i>R. fastigiata</i> ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi.. 70	
Şekil 4.20. <i>R. fraxinea</i> ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi.... 71	
Şekil 4.21. <i>R. polymorpha</i> ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi	71

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzenotiyazolin-6-sülfonik asit)
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MTT	: 3-(4,5dimetiltiyazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromit)
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
TE	: Troloks Eşdeğeri
TEAC	: Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite
UV	: Ultraviyole
g	: Gram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
µL	: Mikrolitre
cm	: Santimetre

1. GİRİŞ

Likenler, bir mantar (mikobiyont) genellikle Ascomycetes veya nadiren Bazidiomycetes ve fotosentetik bir ortak (fotobiyont) yani yeşil bir alg veya siyanobakteri arasındaki simbiyotik bir ilişkiden meydana gelen organizmalardır [1, 2]. Ayrıca, son zamanlarda yapılan araştırmalara göre bakterilerin, likenlerin ayrılmaz bir üçüncü ortağı olduğu tespit edilmiştir [3].

Alg ve mantarlar arasında bazı fizyolojik iş bölümü vardır. Alg klorofile sahip olduğundan fotosentez yaparak birliğe organik madde sağlarken mantar ise su ve madensel maddelerin alınmasını sağlamaktadır. Mantar algden hücrelerinin içerisine hiflerini göndererek bir parazit gibi fotosentez ürünlerinden yararlanır. Ancak bu durum parazitlik olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü algin fotosentezi için gerekli su ve suda erimiş madensel tuzları mantar liken tallusuna sağlamakta ve likene şeklini kazandırmaktadır[4].

Burada iki canlı grubu karşılıklı bir fayda elde ediyor gibi görünse de, asıl kazancı mantar, algten besin temin ederek sağlamaktadır. Dolayısıyla, alg-mantar simbiyozunda baskın canlı türü mantar olduğundan, likenler Fungi (mantarlar) âlemi içerisinde sınıflandırılmakta ve liken oluşturan mantarlar olarak isimlendirilmektedir [5, 6].

Likenlerin spesifik, hatta olağanüstü habitat aralığı, yavaş büyümeleri ve uzun ömürlü olmaları, onların farklı fiziksel ve biyolojik etkilere karşı çok sayıda koruyucu sekonder metabolit üretebilmelerini sağlamaktadır [7]. Biyolojik öneme sahip birkaç sekonder metabolite örnek olarak; usnik asit, sekikaik asit, diffrataik asit, salazinik asit, nortistik asit, protosetrarik asit ve divarikatik asitler verilebilir [8]. Bu benzeri olmayan metabolitler likenlere özgü olup diğer bitki kaynaklarında bulunmamaktadır ve antiviral, antimikrobiyal, antiproliferatif, antimitotik, antioksidan aktivitelere sahiptir [9].

Likenler tarihsel olarak geçmişten günümüze kadar olan süreçte alkol ve parfüm endüstrisinde gıda ve boya olarak kullanılmıştır. Ayrıca, birçok ülkede insan hastalıklarının tedavisi için kullanılmaktadır [10].

Ramalina cinsinin türleri, çok sayıda bilimsel çalışmanın konusu olmuştur. Toplam 246 *Ramalina* türünün 118'i biyolojik aktivite değerlendirmesi için çeşitli çalışmalarda test edilmiştir. Sekonder metabolitler olarak usnik asit, depsidler, depsidonlar, yağ asitleri, steroller ve monosiklik aromatik bileşikler gibi dibenzofuran türevleri izole edilmiştir. Sonuçlar biyolojik aktivitelerinin antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, sitotoksik, antiviral ve anti-inflamatuvar olarak geniş ve umut verici bir spektrumda olduğunu göstermektedir [8].

İlaça dirençli mikroorganizmaların gelişmesi ve hastalıkların tedavisinde zorlukların artması nedeniyle, etkili alternatif antimikrobiyal ilaç geliştirme gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bununla ilgili olarak, likenler doğal antimikrobiyal ajanlar olarak yeni tasarlanmış ilaçlar üretmede alternatif bir kaynak olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [11].

Modern yaşantımızda, sürekli olarak bedenimizde serbest radikallerin oluşmasına sebep olan dış kaynaklı maddelere maruz kalırız [12]. Serbest radikaller, antioksidanların homeostazının dengesizliğinin bir sonucu olarak oluşan oldukça reaktif atomlardır [13]. Satın aldığımız birçok besin zirai amaçlı kullanılan kimyasal maddeler içermektedir. Bunların tüketilmesi vücudumuzda yan ürün olarak serbest radikallerin üretilmesine yol açmaktadır. Aynı durum reçete edilen birçok ilaç içinde geçerlidir. Aynı zamanda, bedenimizdeki stres reaksiyonunu düzenleyen hormonlar da (katekolaminler ve kortizol) son derece tahrip edici etkiye sahip serbest radikallere dönüşmektedirler [12].

Sıkça kullanılan sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etkilere sahip olduğundan şüphelenilmektedir. Bunun sonucu olarak da doğal kaynaklardan antioksidan etkili bileşiklerin elde edilmesine yönelik yapılan çalışmalara ilgi artmıştır. Bu nedenle, oksidatif stres ve fizyolojik işlev bozukluklarına karşı koruyucu etkileri için doğal antioksidanların kullanılması oldukça önemlidir. Yeni doğal antioksidan kaynaklar arayışında, likenlerle ilgili yapılan çalışmalarda önemli bir yere sahiptir. Son zamanlarda, çok sayıda çalışma likenlerin serbest radikallerin nötralizasyonunda önemine işaret etmektedir. Likenler, antioksidan özellikleri iyi bilinen fenolik maddeler bakımından da oldukça zengindir [14]

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Likenlerin Genel Özellikleri

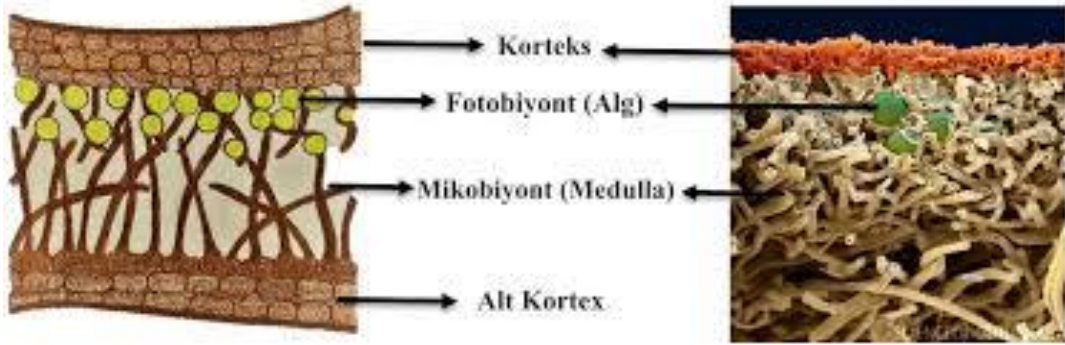
Likenler, mantarlar (mikobiyontlar) ve algler ve / veya siyanobakteriler (fotobiyontlar) arasındaki simbiyotik bir yaşam formudur [15].

Fotobiyontlar olarak likenlerin yapısına katılan algler genellikle Cyanobacteria (Cyanophyta, Mavi-Yeşil Algler), Chlorophyta (Yeşil Algler), nâdir olarak da Chrysophyta (Altın Rengi Algler)'ya aittir. Chlorophyta'dan yaygın olarak *Trentepohlia* ve *Trebouxia*, Cyanobacteria'dan *Nostoc*, *Gloeocapsa*, yaygın olarak likenlerin yapısına katılırlar. Algler bu yapıya katıldıklarında bir miktar şekil değiştirmektedirler. Bu nedenle tespit edilebilmeleri için özel yöntemlere gerek duyulabilmektedir [16].

Mantar ortakları ise çoğunlukla (% 98) Ascomycotadır [17]. Bu sınıftan da en fazla Discomycetales ve daha az olarak da Pyrenomycetales takımlarının cins ve türleridir. Diğerleri ise Basidiomycota ve anamorfik mantarlara aittir. Basidiomycota'dan Polyporaceae familyasının cins ve türleri katılır [18]. Tüm mantarların yaklaşık % 21'i mikobiyont gibi davranabilir, bu nedenle likenler mantarlar arasındaki en büyük mutualistik grubu oluşturur [17].

Liken simbiyozunda alg, fotosentez reaksiyonlarında kullanacağı su ve mineral maddeleri mantardan sağlarken mantar ise; büyüebilmek, üreyebilmek ve yaşamını sürdürebilmek için karbon kaynağı olarak algi kullanmaktadır. Ayrıca mantar fiziksel olarak da olumsuz koşullara karşı algi korumaktadır [5, 19].

Likenlerin yapısının büyük bir kısmı mantar hifleri tarafından meydana getirilmektedir. Genellikle likenlerin alt ve üst kısmında mantar hiflerinden oluşturulmuş sıkı bir kabuk tabakası, orta kısımda ise daha gevşek örgü şeklinde miseliyum tabakası vardır. Ekseri liken türlerinden üst kabuk tabakasının altında algler yer alır [18].



Şekil 2.1. Liken tallusunun anatomik yapısı

Liken yapısında mantar hifleri ile oluşturulmuş tabakaya “Medulla”, alg hücreleri tarafından oluşturulmuş tabakaya ise “Gonidia” adı verilir [4].

Liken tallusunu oluşturan alg ve mantarın birbiri ile karışımına göre likenler iki gruba ayrılırlar:

- Homeomerik Liken: Alg ve mantar tallus yapısında homojen bir dağılım gösterir. Tallus musilajımsı bir yapıdadır. Alg ve mantar ayrı bir tabaka oluşturmadan birbirine karışmıştır [4].
- Heteromerik Liken: Alg ve mantar tallus içinde tabaka oluşturarak farklı dağılım gösterirler. Bu tip talluslu likenlerde algler üst kabuk tabakası ile orta kısım arasında bir tabaka oluşturur. Diğer kısımlar ise gevşek veya sıkı olarak mantar hiflerinden oluşmuş dokular şeklindedir. Çoğu liken heteromerik tiptedir. Alglerin oluşturduğu gonid tabakası kolayca ayırt edilebilmektedir [4]. Bundan başka *Evernia*, *Phycia*, *Ramalina*, *Cladonia* cinsi türleri de aynı tiptendir [18].

Dünya çapında yaklaşık 20.000 ila 25.000 tür liken tanındığı bildirilmiştir [20]. Likenler yüksek sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonları, kuraklık, UV ışınları, nitrifiye ortamlar ve hava kirliliği gibi zorlu stres koşullarına tolerans gösterebildiklerinden, likenler karasal ortamların ilk kolonizatörleri olmuştur [21, 22]. Dünyanın kara yüzeyinin yaklaşık % 8’ini kaplamaktadırlar [23].

Doğada, likenler çok yavaş büyürler. Radyal büyümeleri yılda milimetre cinsinden ölçülmektedir. Likenlerin büyüme oranları hakkında aşağıdaki genelleme yapılmıştır:

çoğu folioz türü 0,5-4 mm / yıl, frutikoz türü 1,5-5 mm / yıl ve krustoz türü 0,5-2 mm / yıl'dır [24].

2.2. Likenlerin Sınıflandırılması

1810 yılında likenler Acharicus tarafından ilk kez gerçek anlamda sınıflandırılmıştır [25]. Likenler, şekilleri, tercih ettikleri substrat tipi, apotesyum şekli ve yapısına katılan alg ve mantarın türleri gibi çeşitli özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır [4].

2.2.1. Yapıya Katılan Mantarların Cinsine Göre Likenler:

- a. Askolikenler (Aksuslu likenler): Askuslu mantarlarla alglerin birlikte oluşturdukları bir simbiyotik birlikteliktir. Likenlerin çoğu bu grupta bulunmaktadır.
- b. Bazidiyolikenler (Bazidiyumlu likenler): Çoğunlukla tropikal bölgelerde rastlanır [26].

2.2.2. Morfolojik Şekilleri ve Üzerinde Yaşadıkları Ortama Göre Likenler

- a. Kabuksu (Crustose) Likenler: Kabuk şeklinde tallusları vardır. Sert, yassı lobsuzdur. Alt yüzeyleri ile ortama sıkı sıkıya bağlanmış hatta kaynaşmış durumdadır. Kayaların üzerinde gelişirler. Bazı durumlarda hifleri ile birlikte kabuk ya da kayaların yüzeyini eritip içlerine girerler. Bu likenleri bağlı bulundukları kaya, taş ve topraktan ayırmak güçtür (Örnek; *Lecidea*, *Rhizocarpon*, *Lecanora* ve *Graphis*).
- b. Yapraksı (Foliose) Likenler: Tallusları ortama yatay olarak uzanır ve irili ufaklı loblara ayrılmış, parçalanmış yaprak şeklindedir. Alt yüzeylerindeki rizoid şeklindeki hifleriyle birlikte ortamala kaynaşmış şekildedir. Çıplak kayalar üzerinde görülmez, toprağa bağlı likenlerdir (Örnek: *Cetraria*, *Peltigera*, *Dermatocarpon*, *Parmelia* ve *Xanthoria*).
- c. Dalsı (Fruticose) Likenler: Tallusları ipliksi ya da şeritsi şeklindedir. Bir kısmı bulunduğu ortamla temas halinde olabilir. Tek noktadan yaşadıkları yüzeye tutunurlar. Tallus ya diktir ya da substrat olarak kullandıkları ağaçlardan sarkık şekildedir.

Çoğunlukla çok sık dallanmış tallusları çatalı ve düzensizdir bir yapı gösterir. Oldukça büyük likenlerdir (Örnek *Cladonia*, *Ervenia* ve *Usnea*) [4, 26-28].

2.3. Likenlerde Üreme

Üreme organları liken sistematğinde önemli bir ayırt edici özelliktir. Likenlerde üreme eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki çeşittir:

Eşeysiz üreme, eşey organı oluşturmamayan likenlerde görülen üreme şeklidir. Bu üreme şeklinde liken tallusunda isid ve sored denilen yapılar meydana gelir. İsid; tallus üzerinde bulunan siğil veya parmak şeklinde yapılardır. Bu yapılar bir veya daha fazla alg hücresinin ve mantar hiflerinin bir aya gelip üstünün korteks ile kaplanması sonucu oluşur. İsidler, fotosentez yapılan yüzeyin artmasını sağlarlar. Talden ayrılıp elverişli çevre şartlarında çimlenip yeni tal oluştururlar. Sored; İsidlerin üzerinin korteks tabakası ile kaplanmamış şeklidir. Bunlar talin soral denilen bölgelerinden oluşmaktadır. Soredler toz partikülleri şeklindedir. Rüzgârlarla etrafa yayılır ve uygun şartlarda çimlenerek yeni bireyleri oluştururlar. Eşeysiz üreme kopan tal parçaları ile de olabilmektedir. Yağmurlu ve nemli mevsim ile kuru sıcak mevsim periyotları arasında tal yapısı çabuk kuruyup kırılmaktadır. Kopan parçalar da rüzgârlarla taşınıp uygun ortam bulduğunda çimlenmektedir [4].

Eşeyli üreme yalnız mantarlarda görülmektedir. Alg liken yapısında vejetatif olarak çoğalmaktadır. Askuslu mantarlar apotesyum ve peritesyum denilen üreme organları oluştururlar. Apotesyum; tallus üzerinde küçük bir çanağa benzeyen ya da tallusa gömülü çeşitli renklerde olabilen (turuncu, sarı, kahverengi, siyah) nokta ya da çizgi şeklindeki üreme birimleridir. Peritesyum ise tallusa gömülü nokta şeklinde ostiol denen açıklıklı üreme organlarıdır. Bu iki üreme birimi de ilkbahar ve sonbahar olarak yılda iki kez üreme hücresi olan spor üretirler. Genel olarak likenlerde apotesyum şeklindeki üreme birimlerine daha fazla rastlanmaktadır [4].

2.4. Liken Metabolitleri

Genel olarak likenlerin metabolizma ürünleri birincil (primer veya hücre içi) ve ikincil (sekonder veya hücre dışı) metabolitler olarak iki çeşittir [17]. Bu metabolitler “liken asitleri” olarak da ifade edilmektedir [4].

Amino asitler, proteinler, vitaminler, polisakkaritler ve karotenoidler birincil metabolitlerin örnekleridir. Genellikle suda çözünürler ve likenlerden kolayca izole edilebilirler. Birincil metabolitlerin bir kısmı mantarlar, bir kısmı ise algler tarafından üretilmektedir. Bu metabolitlerin çoğu likenlere özgü değildir, aynı zamanda likenize edilmemiş mantarlarda, alglerde ve daha yüksek yapıları bitkilerde de meydana gelebilmektedir [29]. Primer metabolitlerden başta glikoz ve mannitol ve sorbitol gibi bitkilerin su kıtlığı sırasında biriktirdiği polihidrik alkoller olan polioller olmak üzere, likenin ve izolikenin gibi likenlere özgü olan polioller alg simbiyozu tarafından fotosentezle üretilmektedir [5]. İkincil metabolitlerin tümü, fotobiyonttan kazandığı karbonhidratları kullanan mantar tarafından üretilir. İkincil metabolitler başlangıçta mantar hifaları içinde üretilirken, daha sonra kristaller veya amorf tortular olarak hifal yüzeyler üzerinde birikirler. İkincil metabolitler suda zayıf olarak çözünür ve genellikle organik çözücülerle ekstre edilmektedir. Likenlerde bugüne kadar yaklaşık 1050 ikincil metabolit olduğu belirtilmiştir [30]. Likenler, tallus kuru ağırlığının % 0,1 ila 10'u arasında değişen ve bazen % 30'a kadar ulaşan önemli miktarlarda ikincil metabolit içermektedirler [14].

Likenlerin spesifik, habitat aralıkları, yavaş büyümeleri ve uzun ömürleri, farklı fiziksel ve biyolojik etkilere karşı çok sayıda koruyucu sekonder metabolit üretebilmelerine sebep olmaktadır [31].

Liken metabolitleri üzerine yapılmış geçmiş ve günümüzdeki çalışmalar bu sekonder metabolitlerin antibiyotik, antimikobakteriyel, antiviral, antienflamatuar, analjezik, antipiretik, bitki büyüme inhibitörü, enzim inhibitörü, antiproliferatif ve sitotoksik etkileri içeren çok çeşitli biyolojik aktiviteler sergilediğini göstermektedir [8-11, 13, 14, 17, 19, 32-58].

Liken metabolitleri biyosentez yollarına göre dört grupta incelenebilmektedir:

- a. Polimalonat yolu (Poliketit yol ya da Asetil)
- b. Mevalonik Asit yolu
- c. Şikimik Asit yolu
- d. Fotobiyontların fotosentetik ürünleridir [59].

2.5. Likenlerin Kullanım Alanları

Likenler metabolik faaliyetleri sonucu oluşturdıkları liken asitleri besin, tıp ve endüstri alanlarında önemli bir materyal olarak değerlendirildiği gibi doğaya da katkıları olmaktadır [4].

2.5.1. Besin Olarak Kullanımı

Likenler böceklerin, hayvanların ve insanların besin zincirinde yer almaktadır. Birçok salyangoz, böcek larvaları ve güveler besin olarak tercih ederler. *Cladonia rangiferina* (Ren Likeni) kuzey ülkelerinde yayılış göstermektedir ve ren geyiklerinin besin maddesini oluşturmaktadır. Arktik ve subarktik kuzey bölgelerinde yayılış gösteren *Cetraria islandica* (İslanda likeni) ise yabani domuz ve mandaların önemli besin maddesidir. Bu liken aynı zamanda Norveç ve Fransa'da ekmeklik un, pastacılık ve çikolata yapımında kullanılmaktadır. Manna likeni olarak adlandırılan *Lecanora esculenta* insan ve koyunlar tarafından besin maddesi olarak tüketilmektedir [4, 60].

2.5.2. Tıp Alanında Kullanımı

Likenler çok eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Liken şeklinin benzetildiği organa göre tedavide kullanılmıştır. Örneğin, akciğere likeni olarak bilinen *Lobaria pulmonaria* alveollü tallus yapısı sebebiyle akciğere benzetilmiş ve akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Sakal likeni olarak bilinen *Usnea* saçları uzatmak için kullanılırken *Xanthoria parietina* sarı renkli olması nedeniyle sarılık hastalığının tedavisinde kullanılmıştır. Öksürüğe, kanamalara ve yaralara, bağırsak solucanlarına ve kuduz hastalığına karşı etkili olduğuna inanılan likenler de olmuştur. Yapılan araştırmalar sonucu likenlerin antimikrobiyal etkisi olduğu saptanmış ve özellikle Gr (+) bakterilere karşı etkili olduğu belirtilmiştir. *Cladonia*, *Usnea*, *Ramalina*, *Evernia* ve *Cetraria* gibi türlerinin içerdiği usnik asit, vulpinik asit, evernin asit önemli antibiyotik asitleri olmuştur. Günümüzde *Cetraria islandica* eczacılıkta, göğüs yumuşatıcı pastillerin yapımında kullanılmaktadır. *Lasallia* ve *Umbilicaria* türlerinden ekstre edilen polisakkaritlerin sıçanlarda bazı tümör gelişimini engellediği bildirilmiştir. Bazı likenler toksik maddeler içermektedir. *Letharia vulpina* ve *Cetraria pinastri* türleri çok zehirlidir. Toksik maddeler

hayvanların solunum sistemini etkiler, insanlarda da deri alerjilerine ve tahrişlerine neden olmaktadır [4, 34].

2.5.3. Endüstri Alanında Kullanımı

Endüstride kullanılan likenler en çok boya maddesi olarak tekstilde kullanılmaktadır. *Orsey*, *Pertusaria*, *Umbilicaria*, *Permelia*, *Ochrolechia* ve *Rocella*'dan değişik yöntemlerle fes rengi, mavi, sarı ve kahverengi gibi değişik renkler elde edilebilmektedir. Likenlerle boyanan kumaşlar aynı zamanda güve oluşumuna karşı da korunmuş olmaktadır. *Ochrolechia tartarae* talluslarının fermentasyonu ile turnusol elde edilmektedir. Likenlerde bulunan likenin adlı karbonhidrattan ise glikoz ve alkol elde edilmektedir. Bazı kozmetikler, sabun ve şampuanların içeriğinde de likenler bulunmaktadır. Likenlerden dekorasyon alanında da yararlanılmaktadır [4, 34].

2.5.4. Doğaya Katkıları ve Ekolojik Roller

Kayaların üzerinde yaşayan likenler salgıladıkları liken asitleri ile kayaların parçalanıp toprak oluşumuna katkı sağlarlar. Ayrıca birçok liken hayvanların barınması için uygun bir yaşam alanı oluşturmaktadır. Birçok kuş türü likenleri yuva ve kamuflaj malzemesi olarak kullanmaktadır. Omurgasız hayvanlar için ise yumurtlama alanı olarak kullanılmaktadır. Likenler uzun yıllardır hava kirliliğine karşı çok hassas olarak kabul edilmektedir [61, 62]. Likenler beslenmeleri için gerekli maddeleri havadan yüzeyleri ile doğrudan aldıkları için atmosferdeki ağır metallere, kükürt, florlu ve azotlu kirleticilerden ve fazla radyasyondan etkilenirler ve bu durum gelişimlerini olumsuz etkilemektedir [4, 34]. Her liken türü hava kirleticilerine karşı farklı hassasiyet gösterdiğinden likenler çevresel kalitenin izlenmesi için biyolojik göstergeler (biyomonitör) olarak çok uygundur [63]. Simbiyotik fotobiyontta klorofilin bozulması, hassas likenlerde meydana gelen hasarın en belirgin belirtilerinden biridir. Ağır metaller enzimatik reaksiyonları inhibe ederek klorofil sentezini etkiler ve tallusta metal birikimine neden olmaktadır [64]. Özellikle sülfürdioksit (SO₂)'in neden olduğu hava kirliliği olan bölgelerde likenlerin tamamen yok olması onların biyolojik indikatör olduğunu göstermekte ve o bölgeler için önlem alınması gerektiğini hatırlatmaktadır [4].

2.6. Likenlere Uygulanan Aktivite Testlerine Ait Genel Bilgiler

2.6.1. Antioksidanlar ve Genel Özellikleri

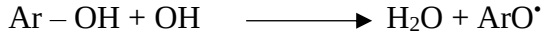
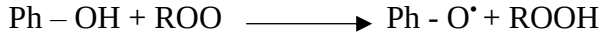
Bazı anaerobik ve aerotolerant türler haricinde, tüm organizmalar, ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde ve birçok bakterinin hücre zarlarında olduğu gibi oksijene elektron veren elektron taşıma zincirlerinin kullanılmasıyla enerjinin verimli üretimi için oksijene ihtiyaç duyar. Oksijen aerob canlılar için bir ihtiyaç olsa da oksijen türevleri oldukça yüksek toksisiteye sahiptir. Aerob canlılar antioksidan savunmaları geliştirdikleri için bu etkilere karşı hayatta kalırlar [65].

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek, katalitik metalleri şelatlayarak ve biyolojik sistemlerde oksijeni temizleyerek oksidasyon sürecini engelleyebilen bileşiklerdir [66]. Vücudu oksidatif stresin neden olduğu hasarlardan koruma yeteneğine sahiptirler [33].

Likenler iyi bir doğal antioksidan kaynağıdır. Depsidler, depsidonlar, dibenzofuranlar ve pulvinik asit türevleri dâhil olmak üzere birçok fenolik bileşik üretmektedirler [34].

Fenolikler, likenlerin stresli ve elverişsiz iklim koşullarında liken büyümesi ve gelişmesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan başlıca liken metabolitleridir [61]. Fenolik bileşikler liken metabolizmasının yaygın ürünleridir ve antioksidan aktivite en sık bunların varlığı ile ilişkilidir. Liken fenolleri genellikle mantar partneri tarafından salgılanır ve mantar hifasının hücre duvarının yüzeyi üzerinde kristaller halinde biriktirilir [67].

Fenolik bileşiklerin yapısında bir ya da daha fazla hidroksil grubu ile birlikte aromatik bir halka bulunmaktadır. Fenolün antioksidan aktivitesinin öncelikle hidrojen atomlarının donörü olma yeteneklerinin ve daha az reaktif fenoksil radikalleri oluşturmak için serbest radikalleri ortadan kaldırma yeteneklerinin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır. Çok sayıda potansiyel reaktif merkez nedeniyle, fenol molekülü aynı zamanda üretilen radikaller ile reaksiyona girme yeteneğine sahiptir [68].



2.6.1.1 Serbest radikaller

Serbest radikal, bir ya da daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren bağımsız varlığa sahip herhangi bir türdür. Eşleştirilmemiş elektronlar, kendi başına bir atomik veya moleküler orbital kaplayan elektronlardır [65].

Genellikle kararsız ve çok reaktiflerdir. Serbest radikaller oksijen ve azot kaynaklı olabilirler. Bunlar reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak ifade edilmektedir [69].

Serbest radikaller (hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri ve peroksinitrit ve nitrik oksit gibi reaktif azot türleri) hücrelerdeki birçok kimyasal reaksiyonda önemli bir rol oynar. Orta veya düşük konsantrasyonlarda, hücresel yapılar olgunlaşma süreci için reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türlerine (RNS) gereksinim duyar ve hatta konak savunma sistemi için silah görevi görebilirler [36, 70-74].

Serbest radikaller organizmada normal metabolik olaylar sonucu oluşabildiği gibi organizmanın çeşitli dış etkenlerle karşı karşıya gelmesi sonucunda da oluşmaktadır. Bu yüzden serbest radikalleri oluşturan nedenler endojen ve eksojen olmak üzere iki grupta toplanmaktadır.

Endojen nedenler; solunumsal patlama enzim reaksiyonları, mitokondrial sızıntı ve otooksidasyon reaksiyonları;

Eksojen nedenler; hava kirliliği, sigara dumanı, stres, ilaçlar, alkol, UV ışınları, iyonize radyasyon, ksenobiyotikler ve diet faktörleridir [75].

Serbest radikaller sahip oldukları eşleşmemiş elektronların belirtilmesi için üst kısımlarına bir ($X^\bullet$) nokta yazılarak gösterilmektedirler [76].

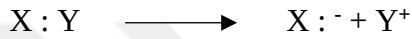
Bir serbest radikal üç temel mekanizma ile ortaya çıkabilir [65]:

Kovalent bağ taşıyan normal iki molekülün homolitik yıkımı sonucunda oluşurlar (Sonuçta her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar.

(Heterolitik bölünme sonucu kovalent bağ oluşturan her iki elektron da atomlardan birinde kalır.)



Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi veya molekülün bir elektron kaybetmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller biyolojik sistemlerde en çok elektron transferi sonucu oluşmaktadır [77].

Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve diğer reaktifler olmak üzere serbest radikaller üç gruba ayrılırlar [78].

Tablo 2.1. Reaktif oksijen (ROS) ve azot türleri (RNS)

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipokloroz asit, $HOCl$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Ozon, O_3
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Singlet oksijen, $^1\Delta_g$
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	
Reaktif Azot Türleri (RNT)	
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Nitrik oksit, $NO^{\cdot}$	Nitroz asit, HNO_2
Nitrijen dioksit, $NO_2^{\cdot}$	Dinitrojen tetraoksit, N_2O_4
	Dinitrojen trioksit, N_2O_3
	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
	Peroksinitroz asit, $ONOOH$
	Nitronyum katyonu, NO_2^+
	Alkil peroksinitritler, $ROONO$
	Nitroz asit, HNO_2

Kaynak: (Halliwell B., 1996) [70]

a) Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri, oksijenden türetilen ve oksijenin kendisinden daha reaktif olan türler için kolektif bir terimdir. Bu terim sadece süperoksit ve diğer bazı oksijen radikalleri için değil, hidrojen peroksit ve hipokloröz asit gibi radikal olmayan oksijen türleri içinde kullanılmaktadır. Dolayısıyla tüm oksijen radikalleri ROS'dur, ancak tüm ROS'lar oksijen radikalleri değildir [65].

Oksijen türevi serbest radikaller, canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, radyasyon, pestisitler, çevre kirleticileri, çeşitli tıbbi tedaviler ve kirliliği sular gibi birçok farklı etken sonucu oluşabilmektedir [79].

Reaktif oksijen türleri, tek elektronunu başka bir moleküle verebilenler yani radikal olanlar

- Süperoksit Radikali $O_2^{\cdot-}$
- Hidroksil Radikali $OH^{\cdot}$
- Peroksil Radikali $RO_2^{\cdot}$

- Alkoksil Radikali **RO•**
- Hidroperoksil Radikali **HO₂•**

ve elektron eksikliği olmamasına rağmen başka bir molekül ile radikallere göre daha zayıf bir şekilde birleşebilenler yani **radikal olmayanlar**

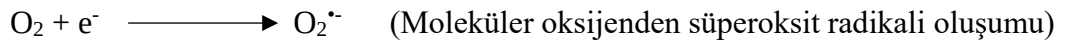
- Ozon **O₃**
- Singlet oksijen **¹Δg**
- Hidrojen Peroksit **H₂O₂**
- Hipokloroz asit **HOCl**

olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar.

Radikal olan reaktif oksijen türevleri:

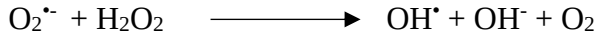
Süperoksit radikali: Süperoksit anyonu en yaygın reaktif oksijen türevidir. Mitokondride, kardiyovasküler sistemde ve vücudun diğer kısımlarında üretilir [80, 81]. Aerobik organizmalarda, oksijenin çoğu mitokondriyal solunum zincir reaksiyonlarında suya indirgenir. Bununla birlikte, oksijen molekülünün % 1 ile 2'lik bir kısmı süperoksit anyon radikaline dönüştürülür. Bu reaksiyonlar solunum zincirinde NADH: ubikinon oksidoredüktaz ve ubikuinol: sitokrom oksidoredüktaz tarafından meydana gelir [82].

Süperoksit oluşturmak için bir başka önemli yol, hem oksidasyonu ile olmaktadır. Hem grubunun demiri, deoksihemoglobin içinde demir Fe²⁺ ya indirgenir ve oksijene bağlandığında bir ara yapı oluşur [83].

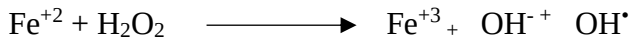


Hidroksil radikali: Biyolojik sistemlerde hidroksil radikali kısa yarılanma ömrü olan oldukça güçlü bir oksidandır [84]. Hidroksil radikali; DNA, proteinler, amino asitler, lipitler, şekerler ve metaller dahil olmak üzere hücre içindeki hemen hemen çoğu organik ve inorganik molekül ile yüksek hızda tepkimeye girebilen, güçlü bir oksitleyicidir [77]. Buna karşılık, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit biyolojik moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmezler [85].

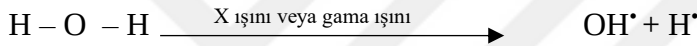
Hidroksil radikali; hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu (Haber-Weiss Reaksiyonu), suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu ve hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton Reaksiyonu) hidroksil radikali meydana gelmektedir [77, 78, 86].



(Haber- Weiss reaksiyonu; $\text{O}_2^{\bullet-}$; Süperoksit anyonu, H_2O_2 : Hidrojen peroksit, $\text{OH}^{\bullet}$: Hidroksil)



(Fenton reaksiyonu; Fe^{+2} ; Demir iyonu, H_2O_2 : Hidrojen peroksit, Fe^{+3} ; Demir iyonu, $\text{OH}^{\bullet}$: Hidroksil)



(Su molekülünden hidrojen radikali ve hidroksil oluşumu)

Radikal olmayan reaktif oksijen türevleri:

Singlet oksijen: Oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik moleküldür. Singlet oksijen molekülünün yapısında çiftlenmemiş iki tane elektron bulunmaktadır. Hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açmaktadır [87].

Singlet oksijen, deride UV radyasyonu sonucu oluşmaktadır. Hiperoksidasyon ve oksijen sitotoksitesini uyarır ve antioksidan aktiviteyi azaltmaktadır [88].

Singlet oksijen doku hasarlarına sebep olabilir. Oluşturduğu zararların ortadan kaldırılması A vitamini ve diğer retinoitler/ β -karoten ve diğer karotenoitler gibi antioksidanlar ile organizmaya zarar vermeden moleküler oksijene dönüştürülmesi ile mümkün olmaktadır [89].

Hidrojen peroksit: Serbest radikal olmayan H_2O_2 , yapısında su bulundurduğu ve biyolojik membranlardan geçebildiği için çok önemli bir moleküldür. Başta hidroksil ve hipokloröz asit olmak üzere birçok oksidanın oluşmasına yol açmaktadır [90].

Hidrojen peroksit ayrıca süperoksit anyonundan süperoksit dismutaz ile bir dismutasyon reaksiyonu yoluyla da üretilebilir. Aynı zamanda amino asit oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler süperoksit anyonundan hidrojen peroksit üretir. Hidrojen peroksit yayılabilir ve plazma zarını kolayca geçer. Hidrojen peroksit, reaktif oksijen türleri arasında en az reaktif olan moleküldür ve metal iyonlarının yokluğunda fizyolojik pH ve sıcaklık altında stabildir. Hidrojen peroksit, zayıf bir oksitleyici ve indirgeyici ajandır ve bu nedenle zayıf reaktif olarak kabul edilir. Hidrojen peroksit, metal iyonları ve süperoksit anyonu varlığında hidroksil radikalini üretebilir [91].

Hidrojen peroksitin oksitleyici özelliği nedeniyle organizmadan uzaklaştırılması gerekmektedir. Hücrelerdeki önemli antioksidan enzimlerinden olan peroksidaz katalaz bu görevi yerine getirmektedir [92].

b) Reaktif azot türleri (RNS)

Radikal Türler

- Nitrik oksit, $\text{NO}^\bullet$
- Nitrijen dioksit, $\text{NO}_2^\bullet$

Radikal Olmayan Türler

- Nitroz asit, HNO_2
- Dinitrojen tetraoksit, N_2O_4
- Dinitrojen trioksit, N_2O_3
- Peroksinitrit, ONOO^-
- Peroksinitroz asit, ONOOH
- Nitronyum katyonu, NO_2^+
- Alkil peroksinitritler, ROONO

Nitrik oksit, düşük seviyelerde homeostazın korunmasında önemlidir ancak daha yüksek konsantrasyonlara ulaştığında toksik hale gelir ve çeşitli organik moleküllere zarar vererek patolojik durumlara veya mutasyonlara yol açmaktadır [93].

Reaktif azot türleri ve septik şoklar, astım ve ateroskleroz arasında bir bağlantı çizilmiştir. Bunlardan nitrik oksit ve nitrojen dioksit reaktif azot türleri birincil örnekleridir., nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından nitrik oksit oluşturulur. Nitrik oksit karbonhidratları, yağları, proteinleri ve hücre çekirdeğini değiştirebilen çok reaktif bir serbest radikal türüdür. Hasar, vücudun doku hasarına yol açabilir ve enflamatuvar bir reaksiyon başlatacak seviyede olabilmektedir. Nitrik oksit, trombosit agregasyonunu baskılamak ve arteriyel ve venöz kasları gevşetmek gibi başka etkilere de sahiptir [94].

2.6.1.2 Oksidatif stres

Serbest radikaller ve oksidanlar aşırı miktarlarda üretildiğinde, hücre zarlarını, proteinleri, lipitleri, lipoproteinleri ve deoksiribo nükleik asit (DNA) gibi diğer molekülleri önemli ölçüde değiştirebilen zararlı bir süreç olan oksidatif stres adı verilen bir fenomen üretir [95].

Normal şartlar altında, ROS'un üretimi ve azalması arasındaki denge antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilir. Bununla birlikte, metal toksisitesi ve UV-B radyasyonunun yanı sıra belirli patolojik koşullar altında ROS, antioksidan savunma sistemi tarafından etkili bir şekilde ortadan kaldırılmadığında, ROS üretimi ve azalması arasındaki dinamik denge bozulur [96]. Eğer düzgün düzenlenmezse, ortaya çıkan oksidatif stres, Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, amfizem, hemokromatoz, birçok kanser türü gibi çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkları ve yaşlanma sürecini indükleyebilir [36, 97].

Oksidatif stres, endojen veya ekzojen kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklar enzimatik reaksiyonlar ve radikal oksijen üreten hücresel ve metabolik süreçleri içerir. Havadaki kirleticiler, radyasyon ve bazı gıdaların tüketimi, ekzojen oksidatif stresin birincil kaynakları arasındadır. Oksidatif stres, metabolizmanın antioksidan savunmasını aşan bir eşiğe ulaştığında, hücresel yapılardaki lipitler ve proteinler oksitlenir, bu da işlevselliklerini ve reaksiyonlarını değiştirir ve sıklıkla hücresel ve doku hasarına yol açar. Oksidatif hasar, hücrenin nükleik asitlerine de zarar verebilir [93]. Enfeksiyonlar, travma, bazı toksinler ve aşırı çalışma, kısa süreli oksidatif strese yol açabilir, bunların hepsi çeşitli dokularda küçük yaralanmalara neden olabilir. Hasarlı dokular radikal

üretme katkıda bulunan ksantin oksidaz, lipogenaz, siklooksijenaz gibi bazı enzimler üretir. Ayrıca fagositleri aktive eder, daha fazla demir ve bakır iyonunun dolaşıma girmesine neden olur ve elektron taşıma zincirlerini bozar. Bu etkiler uzun sürdüğünde, Reaktif oksijen türleri ve antioksidan arasındaki denge kaybolabilir, bu da çeşitli kanser türlerinin gelişmesine yol açabilir veya var olan bir kanserin kolayca yayılmasına neden olabilir. Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin diabetes mellitus ile Parkinson hastalığı gibi yaşa bağlı çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [98].

2.6.1.3 Antioksidanlar ve savunma mekanizmaları

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir [99]. Mekanizmalarına göre antioksidanlar, birincil ve ikincil olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; var olan radikallerle reaksiyona girerek bu radikallerin daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşturmalarını önleyen bileşiklerdir. İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran E vitamini, C vitamini, bilirubin, ürik asit ve polifenoller gibi bileşiklerdir [100].

Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi birincil antioksidan olan enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin proteinler, lipitler ve DNA gibi hücrel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırarak bir hücrel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler [101].

Antioksidanların fonksiyonları farklı durumlarla açıklanabilir:

1. Zincir reaksiyonlarında yer alan serbest radikalleri atarak; (lipit reaksiyonlarında etkili olan tokoferol.)
2. Diğer antioksidanların rejenerasyonu aracılığı ile; (askorbatın tokoferiloksi radikale hidrojen atomu vererek tokoferole indirgenmesi)

3. Radikal veya oksidanlarla reaksiyona girerek (katalazın H_2O_2 ile reaksiyona girmesi)
4. Pro-oksidan olarak rol alan metal katalizörleri şelatlayarak; (albumin veya polifenollerin bakır iyonlarını tutması)
5. Bir enzimi aktive veya inhibe ederek; (askorbatın nitrik oksit sentazı aktive etmesi, tokoferol ve polifenollerin tirozin kinaz enzimini inhibe etmesi) etkili olmaktadır [102].

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir;

1)Yapılarına göre;

- a) Enzimler
- b) Enzim olmayanlar (proteinler, küçük moleküller)

2) Kaynaklarına göre;

- a) Endojen antioksidanlar
- b) Ekzojen antioksidanlar

3) Yerleşimlerine göre;

- a) Hücre içinde bulunanlar
- b) Hücre dışı sıvılarda bulunanlar

4) Çözünürlüklerine göre;

- a) Suda çözünenler
- b) Yağda çözünenler [103].

Tablo 2.2. Antioksidan Sistemin Başlıca Elemanları

Enzimler	Suda Çözünen Radikal Tutucuları	Yağda Çözünen Radikal Tutucuları	Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Vitamin E	Ferritin
Katalaz	Vitamin C	β -Karoten	Transferrin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Ürik asit	Bilirubin	Haptoglobin
Glutasyon redüktaz (GSH-R)	Glukoz	Ubikinol	Hemopeksin
Glutasyon transferaz (GST)	Sistein	Flavonoidler	Seruloplazmin
			Albumin

Kaynak: Yalçın; 1998 [103]

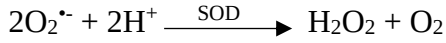
Enzimatik savunma sisteminin en önemli öğeleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) yer almaktadır [104].

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz enzimi; süperoksit radikalının moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler. Böylece hücredeki süperoksit radikali düzeyini azaltır. Süperoksit dismutaz hücreleri fizyolojik olarak süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktadır. Fazla miktarda oksijen kullanan dokularda Süperoksit dismutaz aktivesi de fazla olmaktadır. Ancak ekstraselüler sıvılarda SOD aktivitesi oldukça düşük olmaktadır [103].

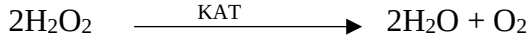
Tüm memelilerde Süperoksit dismutaz'ın

- ✓ Cu/ZnSOD (SOD1),
- ✓ MnSOD (SOD2) ve
- ✓ Ekstraselüler SOD (ecSOD veya SOD3)

olarak üç farklı formu bulunabilmektedir. Genellikle de Cu/ZnSOD sitozolde, MnSOD mitokondride, ekstraselüler SOD ise hücrelerarası boşlukta yer almaktadır. SOD aktivitesi en fazla Cu/ZnSOD ve MnSOD'dan kaynaklanmaktadır [105, 106]. ecSOD özellikle damar cidarlarında diğer dokularda olduğundan yaklaşık 10 kat daha aktif olup, kalp rahatsızlıklarında özellikle bu gruptaki SOD'un etkili olduğu belirtilmektedir [105]. Mn-SOD anti-tümör aktivitesi olan en etkili antioksidan enzimdir [107].

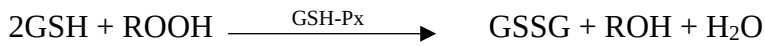


Katalaz (hidrojen-peroksit: hidrojen-peroksit oksidoredüktaz) (CAT): Katalaz enzimi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler.



Enzimin yapısında dört tane hem grubu olmakla birlikte peroksizomlarda yerleşmiştir [103]. Katalaz enzimi ayrıca etanol ve metanol gibi alkoller, hidrojen peroksit varlığında peroksidaz etkisi ile asetaldehit ve formaldehite oksitlerler [108].

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): Glutasyon peroksidaz bir seleno enzim olup, üçte ikisi sitozolde, üçte biri mitokondride bulunmaktadır [109]. Tetramer yapıdadır. Dört selenyum atomu içerir. Hidrojen peroksitin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar. GSH-Px'in iki substratı vardır. Bu substratlardan peroksitler alkole indirgenirken, glutasyon (GSH) yükseltgenir. Oluşan glutasyon da, glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği başka bir reaksiyonla tekrar indirgenmiş glutatyon dönüşür [103].



Glutasyon peroksidazın ana biyolojik rolü peroksidaz aktivite ile organizmayı oksidatif strese karşı korumaktır [109].

Enzimatik olmayan antioksidanlar; glutasyon, α - tokoferol, askorbik asit, β -karoten, selenyum, bilirubin, NADPH, butillenmiş hidroksianisol (BHA), mannitol, benzoat, histidin, dihidrolipoik asit, koenzim Q10, ürik asit, melatonin, ve tiol hücre metabolizmasında oluşan reaktif oksijen çeşitlerine karşı koruyucu rol oynamaktadır. Glutasyonun bunlar arasında direk olarak en etkili olduğu belirtilmektedir [110].

Glutasyon (GSH): Glutasyon bir tripeptittir. Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunur ve glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilmektedir. Önemli bir indirgeyici ajan ve suda çözünebilir antioksidandır. GSH peroksidaz, GSH redüktaz ve GSH transferaz gibi enzimlerin substratı veya ko-substratıdır. Bu nedenle de birçok metabolik görevi vardır. Glutasyon hücreleri, peroksitler ve serbest radikallerle reaksiyona girerek oksidan hasara karşı korur. Aynı zamanda proteinlerin yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Amino asitlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini önler [103].

E vitamini (α - tokoferol): Tokotrienol ve tokoferol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli türleri bulunmaktadır. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan ise alfa-tokoferoldür. Yapısındaki aromatik halka molekülün aktif kısmıdır ve fenolik hidroksil grubuna sahiptir. Bu özellik moleküle antioksidan özelliği sağlamaktadır. Tohumlar ve bitkisel yağlar, E vitamini yönünden zengin gıdalardır. Dokularda, mikrozomlar ve mitokondri gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Güçlü bir antioksidan olarak, zarsal fosfolipitlerin yapısındaki doymamış yağ asitlerini (poliansatüre yağ asitleri, PUFA) serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Bir alfa-tokoferol molekülü 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engeller.

E vitamini ile GSH peroksidaz serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH peroksidaz, oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin yapımını engeller. E vitamini, hem lipitlerin hem de E vitamininin emilimi için gerekli Selenyumun kaybını engeller. Zincir kırıcı antioksidan olarak lipit peroksitlerini etkisizleştirip peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırması başlıca fonksiyonudur [103].

C vitamini (Askorbik asit): Çok güçlü bir indirgeyicidir. Hidroksil ve süperoksit radikalleri ile oldukça kolay reaksiyona girer ve bu radikallerin temizlenmesinde görev alır [111]. Askorbik asit antioksidan özelliğinin yanında oksidan olarak da görev yapmaktadır. Çünkü askorbik asit ferri demiri ferro demire indirger ve böylece ferro demir oluşur. Ferro demir, fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun moleküldür. Reaksiyon sonucunda ise süperoksit radikalının oluşmasına sebep

olur. Prooksidan olarak değerlendirilmesi bu özelliğinden kaynaklanmaktadır [112, 113].

Ürik Asit: Antioksidan etkisini normal plazma konsantrasyonlarında gösteren bir moleküldür. Bu etkiyi demir ve bakır iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek ve Singlet oksijen, hidroksil, hipoklorit, peroksil ve süperoksit radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini temizleyerek göstermektedir. Lipit radikallerinin üzerine etkisi yoktur. Ayrıca, C vitaminini oksidasyona karşı korumaktadır [103].

Karotenoitler ve retinoitler: Beta-karoten A vitamininin metabolik ön maddesi olup karotenoidlerin başlıcasıdır. Likopen ve beta- karoten gibi retinoitler LDL yapısında yer alıp LDL'yi oksidasyona karşı korurlar. Karotenoitler, oksidatif strese karşı hücreleri üç farklı şekilde korurlar.

- a) Singlet oksijeni baskılama
- b) Flavinler ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama
- c) Peroksil radikallerinin temizlenmesi [103].

Flavonoitler: bitkilerdeki kırmızı, sarı ve mavi gibi bitkilerdeki renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Lipit peroksidasyonuna, peroksidasyonu başlatan radikalleri tutarak, metal iyonlarını bağlayarak ve radikal oluşturucu enzimleri inhibe ederek etki ederler. Bazı flavonoitlerin ise pro-oksidan etkiyi metal iyonlarıyla etkileşerek gösterdiği de saptanmıştır [103].

Tablo 2.3. Enzimatik Antioksidan Savunma Mekanizması

ROS	Antioksidanlar (endojen)		Antioksidanlar (ekzojen)
	Direkt rol	İndirekt rol	
Hidroksil radikali	Glutasyon peroksidaz (kofaktörü Se)	-	C vitamini Lipoik asit
Lipit peroksit	Glutasyon peroksidaz (kofaktörü Se)	-	E vitamini β -karoten
Süperoksit radikali	Süperoksit dismutaz (kofaktörü Cu/Zn/Mn)	Seruloplasmin (Cu) Metallothionin (Cu) Albumin (Cu)	C vitamini
Hidrojen peroksit	Katalaz (kofaktörü Fe)	Transferin (Fe) Ferritin (Fe) Miyoglobin (Fe)	C vitamini β -karoten Lipoik asit
Pro-oksidadant/antioksidan eşitliği		Bilirubin Ürik asit	Flavonoidler

2.6.2. Antimikrobiyaller ve Genel Özellikleri

Klinikte, toplumda, hayvancılıkta ve tarımda antibiyotik ilaçların yaygın ve kötüye kullanımı, dirençli patojenik bakterilerin yeniden ortaya çıkmasına, çeşitlenmesine ve yayılmasına neden olmuştur [114].

İlaça dirençli bakteriyel enfeksiyonlar sebebiyle küresel ölüm oranları artmaya devam ettiği için, yüksek profilli patojenlerin tekrarlaması endişe yaratmaktadır [115]. Mevcut antibiyotiklere karşı gelişen mikrobiyal direnç ve bu direncin yayılması, araştırmacıları diğer kaynaklardan antimikrobiyal maddeleri incelemeye itmiştir. Likenler bazı sekonder metabolitlerinin belirgin antimikrobiyal aktivitesi sebebiyle (algler, makrofungiler ve daha yüksek bitkilerle birlikte) araştırmacılar arasında önemli yeni biyoaktif madde kaynakları olarak çok dikkat çekmektedir [37] .

Antibiyotik direncini etkili bir şekilde ele alma ihtiyacına rağmen, yeni antibakteriyel ilaçların keşfi son yıllarda azalmıştır. Bunun nedeni, birçok ilaç piyasaya çıkmadan önce patojenlerin zaten dirençli hale gelmesidir. Ayrıca, mikrobiyal direnç, bir ilacın uzun vadeli bir kâr getirme potansiyelini ciddi şekilde etkilemiştir [116].

İlaç keşif çabalarına doğal ürünler önemli katkılar yapmaya devam etmektedir [117]. Doğal ürünler, geleneksel antimikrobiyal tedaviye terapötik bir alternatif olarak önerilmektedir. Bunlar arasında tüm likenlerin % 50'sinin antibiyotik aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalarla bildirildiğinden, liken türevi ürünler ve onların antibiyotik özellikleri bilim adamları için özel bir öneme sahiptir. Literatürde likenlerin antimikrobiyal taraması ile ilgili çok sayıda rapor ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da, liken ekstrelerinin antimikrobiyal olarak tarandığı ve mantarlara ve ayrıca Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahip bileşiklerin izole edildiği bildirilmiştir [14].

Likenlerin antibiyotik özellikleri üzerine ilk çalışma 1944'de Burkholder ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Çalışmasında 42 likeni antibiyotik özelliği açısından test etmiş ve 27'sinin bakteri büyümesini engellediğini bildirmiştir. 1950'lerde birçok liken ekstresi antibakteriyel aktivite açısından taranmış ve mikobakteri ve Gram (+) organizmalara karşı aktivitesi olduğu doğrulanmıştır [118].

Günümüze kadar yapılan birçok biyofarmasötik çalışmada da likenlerin sekonder metabolitlerinin anti-viral, anti-fungal, Gr (+) ve Gr (-) bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir [38].

2.6.2.1 Antimikrobiyal etki

Bir antimikrobiyal madde veya bir antibiyotik, bir organizma tarafından üretilen veya bakteri, mantar veya protozoa gibi mikroorganizmaların büyümesini seçici olarak yok eden veya inhibe eden sentetik olarak yapılan herhangi bir terapötik ajan olarak tanımlanır [119].

Antimikrobiyal ajanlar fiziksel, kimyasal ve farmakolojik özellikleri bakımından belirgin farklılık gösterirler [120].

Amoksisilin ve levofloksasin gibi geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar, hastalığa neden olan çok çeşitli bakterilere karşı etkilidir. Aksine, penisilin G ve vankomisin gibi dar spektrumlu antimikrobiyal ajanlar sadece belirli bakteri gruplarına karşı etkilidir. Antimikrobiyal ajanlar viral enfeksiyonlara karşı etkili değildir. 5.000'den fazla antimikrobiyal madde tanımlanmıştır ve bunların yaklaşık 100'ü klinik olarak

enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Mevcut antimikrobiyal ajan sınıfları penisilinleri (örn. Penisilin ve amoksisilin), aminoglikozitleri (örn. Gentamisin ve streptomisin), tetrasilinleri (örn. Tetrasiklin ve doksisisiklin), makrolidleri (örn. eritromisin ve klaritromisin), glikopeptitleri (örn. vankomisin ve teikoplanin), sefalosporinleri (örn. sefalekssin ve sefuroksim) ve florokinolonları (örn. siprofloksasin ve levofloksasin) içermektedir [121].

2.6.2.2 Antibiyotiklerin tarihsel gelişimi

Antibiyotik sözcüğü sözlüklere göre Yunanca anti (karşı) ve bios (yaşam) kelimelerinden türetilmiş olup, sözlüklerdeki tanımlamasıyla “Bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır”. [122].

19. yüzyılın sonlarına doğru antimikrobiyal tedavi düşüncesi başlamıştır. Paul Ehrlich (1854-1915) ilk olarak sifiliz tedavisinde salvarsan’ı kullanarak bazı kimyasal maddelerin enfeksiyon hastalıklarında kullanılabileceğini göstermiştir. 1935 yılında ise sülfonamidlerin kullanıma girmesi ile modern kemoterapi başlamıştır. Fleming’in 1928 yılında penisilini keşfi ile antibiyotik çağı açılmış ve 1941 yılında penisilinin insanlarda kullanımı başlamıştır. Takiben 1940’lı yıllarda streptomisin, tetrasiklin ve kloramfenikol kullanılmaya başlanmış olup bundan sonraki gelişmeler hızla ilerleyerek bugüne gelinmiştir [123].

Penisilin keşfi bulaşıcı hastalıkların tedavisinde büyük değişimler yaratmıştır. Bu tesadüfi keşif, *Staphylococcus aureus*’un kültür kaplarında büyümesinin mavi bir küf (*Penicillium* cinsinden bir mantar) tarafından inhibe edildiğini ve bazı mikroorganizmaların diğer mikrobiyal türlerin büyümesini inhibe edebilen maddeler üretebildiğini gösteren şans eseri bir gözlemden kaynaklanmıştır. Penisilin keşfi, bakteriyel enfeksiyonlar için yeni bir tedavi seçenekleri çağının başlangıcıdır. O zamandan, geçen yüzyılın ikinci kısmına kadar, keşfedilen antibiyotik sayısında üstel bir artış olmuştur. β - laktamlar, aminoglikozitler, tetrasiklinler, makrolidler, florokinolonlar ve sefalosporinler dahil olmak üzere klinik kullanım için penisilin verilmesini takip eden yirmi yıl içinde yeni antibiyotik sınıfları geliştirilmiştir.

Modifiye edilmiş β - laktamlar ve β - laktamaz inhibitörleri, tüm Enterobacteriaceae ailesinin etkili tedavisi ve yönetimini sağlamıştır. 1989'a kadar başka yeni bir antibiyotik sınıf tanımlanmamıştır. Her bir antibiyotik sınıfı benzersiz bir çekirdek yapıya sahiptir. Daha sonra, bu yapıların sentetik olarak uyarlanması yoluyla birçok antibiyotik geliştirilmiştir. 1930'ların ortasından 1960'ların başına kadar olan keşifler, günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğunun kimyasal yapılarını belirlemiştir. Mevcut antibiyotikler daha sonra toksisiteyi azaltmak, aktivite spektrumlarını geliştirmek veya diğer antibiyotiklerle artan etkinliği test etmek için çapraz test etmek üzere modifiye edilmiştir. Sefalosporinler, penisilinler, kinolonlar ve makrolidlerin yapıları, 1981 ve 2005 yılları arasında keşfedilen yeni antibiyotiklerin neredeyse dörtte üçünü oluşturmaktadır. Antibiyotik keşfinin en etkin dönemi 1960'ların başında sona ermiş ve bakteri direncinin evrimi o zamandan beri ilaç keşfinin yerini almıştır. Antibiyotik uygulamasının zaman çizelgesi ve ilaç direncinin yükselmesi Tablo 2.4'te gösterilmiştir. Antibiyotiklerin uygunsuz ve yanlış kullanımı, birçok bakteri türü tarafından yaygın bir direnç gelişimi ile sonuçlanmıştır. Neticede, iki ana olay meydana gelmiştir. Son on yılda antimikrobiyal ajanların keşfi, birkaç antibiyotiğe kadar sürekli olarak düşmüştür. Eşzamanlı olarak da antibiyotik direnci hızla artmış ve mevcut antibiyotik tedavi rejimleri göz önüne alındığında yönetilmesi zorlaşan çok dirençli organizmalar yaratmıştır. Bu nedenle tıp biliminin de karşılaştığı bu büyük zorluk açısından alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi çok önemlidir [124].

Tablo 2.4. Antibiyotik gelişimi ve direncin evrimi zaman çizelgesi [124]

1942	1957	1986	2000
Penisilin seri olarak üretildi. Klinik olarak kullanılabilir hale geldi.	Rifamisin antibiyotik ailesi keşfedildi.	Norfloksasin ilk florokinolon olarak geliştirilmiştir.	Linezolid, yeni oksazolidinon sınıfında bir ilaç olarak insan kullanımı için onaylanmıştır.
1944	1961	1987	2003
Streptomisin, tüberkülozun tedavisinde "altın standart" olarak kabul edildi.	Gözlemlenen ilk metisiline dirençli S.aureus (MRSA) vakası.	Enterokoklarda vankomisine direnç gözlenmesi.	S. aureus'ta linezolide direnç gözlemlendi.
1945	1962	1989	2003
Tetrasiklinler geliştirildi.	Kinolonların ve streptograminlerin keşfi.	Linezolid yeni bir oksazolidinon olarak gelişmeye başladı.	Yeni bir lipopeptid antibiyotik olan Daptomisin, insan kullanımı için onaylanmıştır.
1947	1967	1990	2007
S. aureus'ta penisiline direnç gözlemlendi.	N. gonorrhoeae ve S. pneumoniae'de penisiline direnç gözlemlendi.	Dünya genelinde hastane enfeksiyonlarında görülen MDR P. aeruginosa ve M.tuberculosis; MRSA suşlarının % 50'si Florokinolonlara dirençli.	N.gonorrhoeae artık penisilinler, sülfonamidler, tetrasiklinler ve florokinolonlara karşı dirençli.
1949	1970	1992	2009
Aminoglikozitler, neomisin ve gentamisin insanlarda kullanımı için onaylanmıştır.	Sefalekssin, birinci kuşak sefalosporin olarak geliştirilmiştir.	Dünya çapındaki tüm MRSA suşlarının % 95'inden fazlası penisiline ,ampisiline dirençlidir.	ABD'de ilk kez kolistin dirençli K. pneumoniae bildirildi.
1952	1977	1993	2013
Eritromisin gibi makrolidler farmasötik kullanıma girdi.	Penisilin, S. pneumoniae enfeksiyonlarının tedavisinde global olarak etkisiz kabul edilmiştir.	K. pneumoniae'de karbapenemlere gözlenen direnç.	CDC, karbapenem dirençli enterobacteriaceae ailesini bir "Öncelik 1" sağlık tehdidi olarak listeledi.
1955	1982	1997	2014
Eritromisine dirençli stafilokoklar gözlemlendi.	MRSA'nın sefalosporinlere karşı direnci gözlemlenmiştir.	S. aureus'ta gözlenen vankomisine direnç.	Zebraxa, gram negatif bakterilere karşı yeni bir β -laktamaz inhibitörü olarak hastalar için onaylanmıştır.
1956	1983	1999	2017
İlk glikopeptid olan vankomisin, insanda kullanımı için onaylanmıştır.	Enterococcus faecium'da görülen penisiline direnç.	<i>In vivo</i> Enterokoklarda gözlenen linezolid antibiyotik sınıfına direnç.	Hastalar, ABD'deki mevcut her antibiyotiğe dirençli bir Klebsiella pneumoniae enterobacteriaceae suşundan ölmektedir.

Kaynak: Chessman et al. 2017 [124]

2.6.2.3 Antimikrobik maddelerin etki mekanizmaları

Antibiyotikler, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Micromonospora* ve *Cephalosporium* gibi farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen maddelerdir. Etkilerini diğer mikroorganizmaların üremesini önleyerek ya da onları öldürenrek göstermektedirler. Mikroorganizma karşıtı sentez yoluyla elde edilen maddelere kemoterapötik maddeler denir. Günümüzde, farklı antibiyotik etkili maddeler de sentez yoluyla elde edilmekte olup antibiyotikler de kemoterapötikler içinde sayılmaktadır. Genel bir ifadeyle antimikrobik maddeler terimi kullanılmaktadır.

Antimikrobik maddeler antimikrobik etkilerini başlıca beş mekanizma ile göstermektedirler:

1. Hücre duvarının sentezini önleyerek veya litik enzimleri aktive ederek üremeyi durdurarak
2. Hücre zarının işlevini bozarak
3. Mikroorganizmanın nükleik asit sentezini inhibe ederek
4. Mikroorganizmanın protein sentezini bozarak
5. Antimetabolik etki ederek [125].

2.6.2.4 Antimikrobiyal direnç

Antimikrobiyal direnç, önceden oluşan “doğal kökenle” (wild type) enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde etki gösteren bir antimikrobik maddeye karşı enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmaların farklı mekanizmalarla dirençli hale gelmesi olarak tanımlanmaktadır. Bakteriler, mantarlar, virüsler ve parazitlerin “doğal köken”leri, antimikrobik maddelerle karşılaştıktan sonra dirençli hale gelmektedir. İlgili antimikrobik madde ile tedaviye cevap vermemekte ya da profilakside artık etkisiz hale gelmektedir. Sonuç olarak da bu enfeksiyonlar etkili bir şekilde tedavi edilememekte ve bu hastalardan diğer insanlara veya çevreye doğrudan/dolaylı veya taşıyıcılar aracılığıyla mikroorganizmalar bulaşmakta ve enfeksiyonların yayılmasına neden olmaktadır [126].

Antimikrobik bir maddeye karşı direnç geliştiren bir mikroorganizma bu maddeye yapıca veya etki tarzı bakımından yakın diğer antimikrobik maddelere karşı da direnç geliştirebilmektedir. Bu duruma çapraz direnç denir. Mikroorganizmalar ayrıca yapısı ve etkisi farklı olan birden fazla antimikrobik maddeye karşı da dirençli hale gelebilmektedirler. Bu duruma ise çok ilaca dirençlilik denir. Antimikrobiklere karşı mikroorganizmaların göstermiş olduğu direnç doğal ve kazanılmış direnç olarak iki şekilde ifade edilmektedir.

Mikroorganizmalar antimikrobik maddelere karşı kısa ya da uzun zaman içerisinde karşı koyma gücü yani direnç kazanmaktadırlar. Bu nedenle antimikrobiklere karşı gelişen direnç günümüzde artık tüm insanlığı tehdit edecek düzeyde olan ciddi bir sorun haline gelmiştir [125].

2.6.2.5 Antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Enfeksiyonların neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların sayısı ve yapısı sürekli artış göstermektedir. Araştırmacılar, geniş mikroorganizma cinsine en küçük dozla etki edebilecek ama aynı zamanda insana da en az zararı verecek yeni maddeler üzerinde çalışmaktadırlar. Bitkilerden elde edilen veya belli bir moleküle bağlı kalarak sentezlenen yeni maddeler üzerine fiziksel, kimyasal, biyolojik, farmakolojik, teknolojik olarak *in vitro* biyolojik aktivite araştırmaları yapılmaktadır. Bu maddelerin antiviral, antifungal, antibakteriyel aktivite araştırmaları yapılarak antimikrobiyal etkinlikleri belirlenmektedir. Çalışmalarda maddenin antimikrobiyal aktivitesinin olup olmadığı, aktivitesi varsa Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrumunun belirlenmesi için çeşitli *in vitro* yöntemler kullanılmaktadır. Maddelerin çözünürlüğü, miktarı, sayısı aynı zamanda kullanılacak mikroorganizma cinsinin özelliği ve yoğunluğu yöntem seçiminde önem kazanmaktadır. Çalışma sonucu elde edilen veriler güvenilir ve tekrarlanabilir olmalıdır. En az emekle en kısa sürede, en ekonomik olan yöntem tercih edilmiş olunmasına dikkat edilerek seçim yapılmalıdır [127].

Direncin ve direnç genlerinin belirlenmesi amacıyla laboratuvarlarda, dilüsyon testleri (agar dilüsyon veya buyyonda makro/ mikro dilüsyon), disk difüzyon testleri, E-testi, otomasyon sistemler (Sensititre, ATB, Vitek, WalkAway gibi), genetik metotlar (DNA

probları, DNA dizi analizi DNA sequencing, PCR, SSCP single stranded conformational polymorphism) gibi çeşitli metodlar kullanılmaktadır [125].

Dilüsyon testleri: Bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan antimikrobiyal bir ajanın minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanmaktadır. Tüp dilüsyon ve agar dilüsyon olmak üzere dilüsyon testleri iki çeşittir [128].

Tüp dilüsyon: Tüpte sulandırma yöntemidir. Daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Genellikle antibiyotiklerin MIC ve/veya MLK değerlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. MIC değeri ise; deneyde kullanılan test mikroorganizma süspansiyonunda (belli sayıda canlı organizma içeren kültür sıvısı) test koşullarında üremeyi, önleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır [128]. Besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton buyyon kullanılmaktadır. Test edilecek olan antibiyotikler özel çözücülerinde içinde hazırlanıp bu sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırılmalar yapılır. Mikroorganizmadan standart bir inokulum (1×10^6 CFU / mL) hazırlanıp, antimikrobiyal maddenin farklı dilüsyonlarını içeren tüplere eşit miktarlarda eklenir. Ayrıca kontrol tüpü olan antibiyotik içermeyen, üremenin göstergesi olan tüpe de eklenir. Bakteri inoküle edilmemiş bir besiyeri de kontrol olarak hazırlanır. Hazırlanan besiyerleri 35°C’de bir gece inkübasyon için bekletilip bakteri üremesinin olup olmadığı bulanıklık yönünden incelenir. Bakterinin üremesinin engellendiği, gözle görünür bir bulanıklığın bulunmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirilir. Tüp dilüsyon yöntemi “makro” ve “mikro” olarak iki şekilde uygulanabilmektedir. Makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise “U” ya da “V” tabanlı “mikroplate”ler kullanılmaktadır. Prensip her iki yöntemde de aynıdır.

Agar dilüsyon: Tüp dilüsyon yöntemi ile prensipleri aynıdır. Farkı ise antibiyotik sulandırılmalarının agar içine konup petri plaklarına dökülmesidir. Böylelikle her plakta farklı konsantrasyonlarda antibiyotik olmaktadır. Uygun besiyeri Mueller-Hinton agardır. Test edilecek bakterinin yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanır ve 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 CFU / mL elde edilir. Oluşturulan bakteri süspansiyonundan özel inokülatörlerle veya manuel olarak 1-2 mL inoküle edildiğinde

agar yüzeyindeki bakteri sayısı ortalama 10^4 CFU / mL olmaktadır. Plaklar 35°C’de 18-24 saat süreyle inkübe edilip üremenin engellendiği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeridir [129].

Disk difüzyon testi: Antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en çok kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. 2 çeşittir:

Kâğıt Disk Agar Difüzyon Testi: Ucuz ve uygulaması basit bir yöntemdir. KirbyBauer tarafından geliştirildiğinden bu isimlerle de anılmaktadır. Bu yöntemde belirli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kâğıt diskler, duyarlılığı test edilecek olan mikroorganizmanın inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Bir süre sonra diskler çözünüp agara doğru difüze olur ve inoküle edilen mikroorganizma da üremeye başlar. Belirli bir inkübasyondan sonra antibiyotiğin inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin etrafında üreme görülmez. Mikroorganizmanın ilaca olan duyarlılığı arttıkça diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu da genişleyecektir. Oluşan inhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülür ve standart zon tablolarına bakılarak uygun değerlendirmeler yapılır ve kullanılan antimikrobik ajanlara karşı mikroorganizmanın duyarlılık durumu belirlenir. Bu yöntemde, mikroorganizmalar trypticase soy buyyonda 2 saat boyunca 37°C’de inkübe edilip bulanıklık oluştuktan sonra McFarland 0.5 (10^8 mikroorganizma / mL)’e göre ayarlanır standart bir bulanıklık elde edilir. Bu süspansiyondan alınan örnek Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edilir ve farklı antibiyotikleri içeren diskler pens ile agar yüzeyine yerleştirilir. Zonların karışmaması için disklerin arasında 22 mm, petri kabının kenarından ise 14 mm uzaklık bırakılmış olmasına dikkat edilmelidir. Sonrasında besiyerleri 35°C’de 18-24 saat boyunca inkübe edilip oluşan inhibisyon zonları ölçülür.

Delik Agar Difüzyon Yöntemi: Bu yöntemde bakteri yayılmadan önce agarda steril olacak şekilde 3-5 mm’lik çukurlar açılır. Erimiş steril agarla dip kısımları kapatılır. Bakteri yayılıp belli mcg ölçülerde olacak şekilde sulandırılmış antibiyotik her bir çukura konulur ve en az 24 saat etüvde inkübe edilir. Antibiyotik difüze olan agarda bakterinin üreyebilmesi test edilir [128, 129].

E-Test: Son yıllarda geliştirilmiş bir yöntemdir. Disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin bir arada uygulanması esasına dayanan E-test, pratik ve kolay uygulanabilmektedir. En büyük dezavantajı ise pahalı olmasıdır. Kantitatif ölçüm yapmaktadır. Antibiyotiğin artan konsantrasyonlarını içeren inert plastik stripler (şeritler) kullanılır. Şeritlerin bir yüzünde rakamlar diğer yüzeyinde antibiyotik içeriği bulunur. Besiyerine bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra şeritler radyal olacak şekilde besiyerine yerleştirilir ve 35°C'de 18-20 (37°C'de 48 saat) saat anaerob ortamda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda şeritin etrafında inhibisyon zonu oluşur. Elips şeklindeki zon ile şeritin kesiştiği nokta MİK değerini verir [128].

Otomatik ve Hızlı Direnç Saptama Yöntemleriyle Antibiyotik Duyarlılık Testi:

Ticarette bakteri ve mantarların hızlı identifikasyonlarının yanında, onlarla birlikte ya da ayrı olarak bu mikroorganizmaların antimikrobiklere olan dirençlerini ölçen otomatik mikro yöntemler ve bunları uygulayan cihazlar geliştirilmiştir.

Otomatik identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık ölçme amacıyla otomatize sistemlerinin yaygın olarak kullanılanları; vitek 1, vitek 2, microscan, phoenix gibi cihazlardır. Bu cihazlar; hızlı sonuç verir, iş yükünü azaltır, tekrarlanabilirliği yüksek, fakat pahalıdır. Bu cihazların içinde en yaygın olarak kullanılan vitek sisteminde; amaca göre uygun vitek inokülasyon kartları yani, gram negatifler, gram pozitifler, bakteri sayımı ve anaeroblar için ya da antibiyogram için özel kartlar seçilir. Kartlardaki çukurlarda liyofilize ayıraçlı besiyerleri veya antibiyotikli besiyerleri vardır. Cihaz tarafından, standart bulanıklıkla bakteri süspansiyonlarından kartlara ekim yapılır; üretilir, sonuçlar okunur, değerlendirilir ve kaydedilir [128].

2.6.3. DNA Cleavage (DNA Koruyucu Etki)

İnsan genomik DNA'sının moleküler bütünlüğü ekzojen veya endojen faktörlerin sürekli olarak tehdidi altındadır. Bu faktörlerin etkisiyle genetik materyalde değişiklikler meydana gelir. Bu durum DNA hasarı olarak ifade edilmektedir [130]. DNA'daki hasarlar basit baz değişikliklerine veya delesyon, füzyon, translokasyon veya anöploid gibi daha karmaşık değişikliklere neden olabilir. Bu tür değişiklikler

tek hücreli organizmaların hücresel ölümüne veya dejeneratif değişikliklere ve çok hücreli organizmaların da yaşlanmasına yol açabilir [131].

Stratosfer tabakasının tahrip olması sonucu UV (ultraviyole) ışınları dünyaya ulaşabilmektedir. Bu ışınlar özellikle de cilt tahribatlarına ve yaşlanmasına neden olmaktadır [132]. Normal koşullarda insan derisi görünür ışınların ve UV ışınların zararlı etkisini azaltacak bir mekanizmalara sahiptir. Ancak UV ışınlarına yüksek seviyede maruz kalmak hücresel antioksidanların miktarında azalmaya ve sonuç olarak da reaktif oksijen türlerinin neden olduğu UV-kaynaklı oksidatif DNA hasarına yol açabilmektedir [133]. UV'ye maruz kaldıktan çok kısa bir süre sonra ışınlanmış dokuda süperoksit anyonu ve hidroksil radikallerinin üretildiği birkaç araştırmacı tarafından belgelenmiştir. Aşırı kimyasal reaktiviteleri nedeniyle, bu oksijen radikalleri hücresel süreçleri, lipid peroksidasyonu, DNA'nın bölünmesi, değiştirilmiş enzim aktivitesi, polisakkaritlerin polimerizasyonu ve hücre ölümü gibi bir dizi mekanizma ile bozabilmektedirler [134].

UV ışınların yanı sıra serbest radikaller de DNA hasarına yol açabilmektedir. Bir serbest radikal türü olan hidrojen peroksit (H_2O_2), guanini, 8 hidroksi guanine dönüştürerek (8OhdG) DNA hasarına neden olmaktadır [133].

Son zamanlarda likenlerden ekstre edilen maddeler, ultraviyole (UV) emiliminden dolayı potansiyel güneş kremleri ve antioksidan güçlerine göre Şili likenlerinden ekstre edilen bazı bileşiklerin ultraviyole radyasyona (UV-R) karşı koruma gösterebildikleri gösterilmiştir [135].

2.6.4. Sitotoksisite Tayini

Kanser, yakın dokuları istila eden ve bu dokuların tahrip olmasına neden olan hücrelerin anormal çoğalması ile karakterize olan hayatı tehdit eden bir hastalıktır [136]. Kanser kan dolaşımı ve lenfatik damarlar yoluyla uzak organlara yayılır. İki tip gende rahatsızlık meydana geldiğinde, yani kanser hücrelerinin büyümesinden sorumlu onkogenler ve kanserin gelişmesini engelleyen tümör baskılayıcı genler ortaya çıktığında meydana gelir [137]. Kanser belirlenir bir nedenini söyleyebilmek çoğu zaman imkânsızdır. Bununla birlikte, tütün kullanımı, alkol, çevre kirleticileri,

bulaşıcı ajanlar, özel alışkanlıklar ve yaşam tarzları gibi faktörler kanser riskini arttırmaktadır [138]. Kanser yaklaşık olarak % 10 ile % 15'i kalıtsaldır [139]. Kemoterapi ve kanserin tedavisi için geleneksel tedavi, olumsuz ve toksik yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle kanser hastalığını kontrol edememektedir. Daha etkili ve bununla beraber daha az yan etkisi olan alternatif kanser tedavileri için yeni kemoterapötiklere duyulan ihtiyaç araştırmaları da teşvik etmektedir. Bitkilerden, mikroorganizmalardan, mantarlardan ve denizden elde edilen doğal ürünlerin umut verici antikanser ilaç kaynakları olduğu kanıtlanmıştır [140]. Mevcut antikanser ilaçların % 60'ından fazlası doğal kaynaklardan geliştirilmiştir [141].

Kemopreventizasyon, karsinogenez sürecini önlemek veya tersine çevirmek için kullanılan farmakolojik bir yaklaşımdır. Doğal ürünler kemoprevensiyonda kullanılan ajanlar arasındadır, çünkü bu birincil ve ikincil metabolit fitokimyasallarının çoğu normal dokulara toksisite göstermemektedir ve antikanser etkilere sahip oldukları bilinmektedir [39].

Likenlerin antitümör aktiviteleri, ölümcül hastalıklar için potansiyel ilaçların kaynağı olarak büyük önem taşımaktadır [31]. 1844'te ilk izolasyonundan bu yana en çok çalışılan liken metaboliti olan usnik asit, insan lösemi hücreleri (K562) ve endometrial karsinom (HEC-50) hücreleri üzerinde antiproliferatif bir etki sergilemiştir [40, 41, 142]. Bir başka liken bileşiği depsidon pannarin ise hücre büyümesini inhibe etmektedir. Ayrıca insan prostat karsinomu DU-145 ve insan melanomu M14 hücrelerinde apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indüklemektedir [42, 43].

MTT (tetrazolium tuzu 3-(4,5dimetiltiyazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromit) daha çok çeşitli maddelerin sitotoksisitelerinin değerlendirilmesinde enzimatik bir test olarak kullanılmaktadır. MTT ile hücre topluluklarında canlı hücrelerin oranı kantitatif olarak kolorimetrik yöntemle saptanabilmektedir. Sağlam hücrelerdeki mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon da mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenazın aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkanın parçalanmasıyla soluk sarı renkli MTT boyası, sağlam hücrelerde mor renge boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulan hücrelerde ise boyanmamaktadır. Bu yöntemin basamakları sırasıyla; hücrelerin MTT boyasıyla inkübe edilmesi, reaksiyon sonucu oluşan ürünün çözünür hale getirilip

bu ürününün kolorimetrik olarak ölçülmesi şeklindedir. Optik yoğunluğun ölçülmesi ile formazan oluşumu saptanabilmektedir [143, 144].

2.7. *Ramalina* Cinsi ve Çalışılan Türleri Hakkında Bilgiler

Ramalina cinsinin bilimsel sınıflandırılması;

ALEM: Fungi

ŞUBE: Ascomycota

SINIF: Lecanoromycetes

TAKIM: Lecanorales

FAMİLYA: Ramalinaceae

CİNS: *Ramalina* Ach.

Bazı liken cins (genus) isimlerinin etimolojisi ile ilgili yapılan bir çalışmada *Ramalina* isminin *Ramalina*, ince dallar, sürgünler, çalı çırpı, sık çalılık; Ramus, dal, dalda gelişen ya da dala ait; Ramale, ölü dal anlamlarına gelen Latince isimlerden türetilmiş olduğu ve bu likenin hem morfolojisini hem de yaşadığı habitatı işaret ettiği bundan dolayı da bu cinsin pek çok türünün dallar üzerinde geliştiği belirtilmiştir [145].

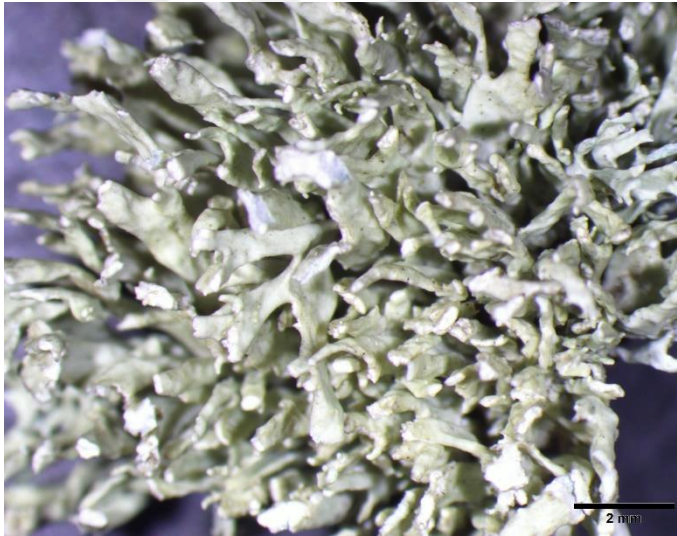
Ramalina Ach. önemli, kozmopolit ve yaygın olarak incelenen liken cinslerinden biridir [44]. Cins ilk olarak Acharius tarafından tanımlanmıştır. *Ramalina* türleri, substrata bir kancayla tutturulmuş bir frutikoz tallus ile karakterizedir. Tallus, sarkık veya dik, püsküllü, seyrek, dikotom veya düzensiz dallıdır. Dallar dairesel, geniş loblu veya dar kayış şeklinde olabilir. *Ramalina* türleri ovalar, yaylalar, yağmur ormanları ve alpler gibi çeşitli habitatlara dağılmıştır. Türler kayalar, turba toprağı, odun ve ağaç kabuğı gibi çeşitli yüzeylerde yaşarlar. Temiz hava koşullarında, tallus yeşilimsi gri ile sarımsı gri renktedir. Kurutma sırasında renk sarımsı kahverengiden koyu kahverengiye döner. *Ramalina* türleri psödosefal içerir. Usnik asit, *Ramalina* üyelerinde bulunan başlıca metabolitlerden biridir. Çeşitli *Ramalina* türleri geleneksel olarak ilaç, yiyecek ve baharat olarak kullanılır. *Ramalina* türleri tarafından

antimikrobiyal, antioksidan, enzim inhibitörü, böcek öldürücü, sitotoksik, anthelmintik ve immünostimülatör aktivite gibi çeşitli biyoaktiviteler göstermektedir. *Ramalina* anti-diyabetik aktivitesi ile bilinmektedir [45].

Ramalina türleri usnik asit, lekanorik asit, evernik asit ve atranorin gibi sitotoksik, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerden sorumlu olan ikicil metabolitleri içermektedir [46].

2.7.1. *Ramalina digitellata* (Nyl.) Nimis:

Tallus çalimsı formda, sert ve dik yapılı. Tallus yüzeyinde boşluklar ve oyuklar mevcut. Dalların uzunluğu 1-3 cm, uç kısımları belirgin olarak parmak şeklini almış, pseudosifeller mevcut. Apotesyum çapı 0.8—1.2 cm. Ekolojik olarak kıyısız alanlarda silisli kayaların güneş alan eğimli yüzeylerinde yayılış gösterdiği belirtilmiştir [146]. Ülkemizde kıyı bölgesinden toplanmıştır. Kimyasal test: Medulla ve tallus: C— / K— / Pd—.



Şekil 2.2. *Ramalina digitellata*

2.7.2. *Ramalina fastigiata* (Pers.) Ach.:

Tallus genellikle dik, yoğun kümeler halinde, çok dallı, yastık şeklinde, renk soluk yeşilden griye değişir. Dallar 2-5 cm, yuvarlak, köşeli, genişlemiş, yüzeyinde boşluklar ve oyuklar mevcut. Apotesyum çok sayıda, 12-18 x 5-7 µm. Ekolojik olarak çalılıklarda, park alanlarında, besin içeriği zengin ağaç kabuklarında, ağaç

gövdelerinde ve dallarında, nadiren kayalar üzerinde gelişim gösterir [147]. Ülkemizde İç Anadolu'da Çamlık Milli Parkı'ndan toplanmıştır. Kimyasal test: Medulla Pd—, C— / K— /KC —.



Şekil 2.3. *Ramalina fastigiata*

2.7.3. *Ramalina fraxinea* (L.) Ach.

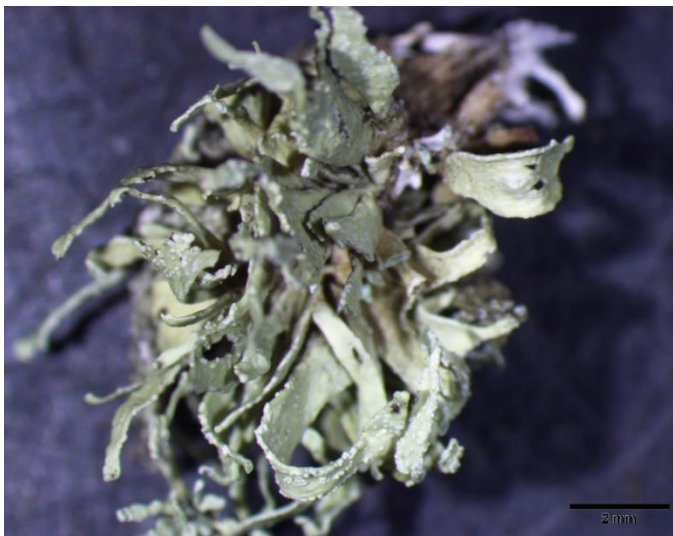
Tallus sarkık, demet şeklinde, renk gri-yeşil veya zeytin yeşilinden siyaha değişir. Dallar 20-30 cm. belirgin olarak yassılaştırmış ve yaprak şeklinde, basit veya dağınık dallanma gösterir, genellikle tabana doğru dönüktür. Yüzey mat, düz veya kanallı veya ağsı, pseudosifel yaygın. Apotesyum sık ve çanak şeklinde, askosporlar 10-17 x 4-7 µm. Ekolojik olarak besince zengin ağaç kabuklarında yaygındır [147]. Ülkemizde Orta Karadeniz bölgesinden toplanmıştır. Kimyasal test: Medulla Pd—, C— / K— /KC —.



Şekil 2.4. *Ramalina fraxinea*

2.7.4. *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach.

Tallus dik ya da yatık, dağınık tutamlar şeklinde, renk koyu yeşil. Dallar 3-6 cm., şerit şeklinde ya da uzunlamasına parçalara ayrılmış, uç kısımlara doğru incelmış, genellikle parçalı. Yüzeyi pürüzlü ya da çizgili, pseudosifel mevcut. Apotesyum nadir ve çanak şeklinde, 12-16x4-6 µm. Ekolojik olarak besince zengin kayalarda, özellikle kuş yuvalarına yakın çevrelerdeki habitatlarda yaygındır [147]. Ülkemizde İç Anadolu'da Çamlık Milli Parkı'ndan toplanmıştır. Kimyasal test: Medulla Pd—. C— / K— / KC —.



Şekil 2.5. *Ramalina polymorpha*

2.7.5. *Ramalina* Cinsi Türleri İle İlgili Yapılan Aktivite Çalışmaları

Ramalina cinsi, dünya çapında yaklaşık 246 türe sahiptir ve bunların sadece 118 türü kimyasal ve biyolojik çalışmaları için araştırılmıştır. Çalışmalarda usnik asit, depsitler, depsidonlar, yağ asitleri, steroller ve monosiklik aromatik bileşikler gibi dibenzofuran türevleri çeşitli ikincil metabolitler izole edilmiştir. Ayrıca, bu cinsin biyolojik aktivite araştırmalarında, antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser, antimikrobiyal etkilerinin olduğu görülmüştür [8, 44-58].

Güllüce ve ark (2006); *R. polymorpha*'nın da içinde olduğu beş farklı tür likenin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin taranması üzerine çalışma yapmış *R. polymorpha*'nın metanol ekstresinde antioksidan etki gözlenememiş ancak tüm türlerde bazı mantar ve bazı bakteri türlerine karşı antimikrobiyal ve antifungal etki saptamışlardır [47].

Cansaran ve ark.(2007); Orta Anadolu'dan toplanan *R. fastigiata* (Pers.) Ach., *R. polymorpha* (Lilj.) Ach..ve *R. fraxinea* (L.) Ach.'ı içeren 5 tür liken türlerinin usnik asit miktarlarını ve likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmışlardır. Türlerin aseton ekstrelerini *Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı test etmişlerdir. Liken ekstrelerinin bakterilere karşı farklı seviyelerde etki ettiklerini gözlemlemişlerdir. *R. capitata* ve *R. fastigiata*'nın bakterilerin çoğu üzerinde etkili olduğunu belirlenmiştir. *R. fastigiata*, *B. subtilis* ve *B. megaterium* üzerinde en yüksek antibakteriyel etkiyi göstermiştir göstermiş olup aynı zamanda Gram (-) olan *E. coli* ve *P. mirabilis*'in de büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. HPLC yöntemiyle tespit ettikleri usnik asit miktarlarının ise en yüksek *R. fastigiata*'nın sahip olduğunu bulmuşlardır. Usnik asit miktarının arttıkça, antimikrobiyal etkinin arttığını belirtmişlerdir [48].

Çobanoğlu ve ark. (2010); *R. farinacea*'yı da içeren beş liken türünün aseton ve kloroform ekstrelerinin *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini üç gram negatif bakteriye karşı kâğıt disk metoduyla (*Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* ATCC 11666 ve *Acinetobacter*) çalışmış ve tüm ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır [49].

Oran ve ark. (2012); *R. fastigiata* (Pers.) Ach.'nın da bulunduğu altı tür likenin metanol ve aseton ekstralarının toplam fenol miktarları ve antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Ölçümler sonucunda en yüksek antioksidan aktivite değerin *R. fastigiata* (Pers.) Ach.'nın metanol ekstresinde olduğunu bildirmişlerdir [50].

Şahin ve ark. (2015)'nın *R. fastigiata*, *R. farinacea* ve *R. fraxinea*'nın ve metabolitlerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkileri üzerine çalışma yapmış ve aseton, metanol ve etanol gibi farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstralarda evernik, fumarprotosetrarik, lekanorik, stiktik ve usnik asit miktarları tespit edilmiştir. Yaptıkları çalışmaya göre tüm *Ramalina* türleri'nin metanol ekstraları *E. coli* (245 ve O157H7)'ye karşı güçlü anti mikrobiyal etki göstermiş olup, *R. fastigiata* 'nın metanol ekstresi en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir [44].

Sesal ve ark. (2016); *R. canariensis* (J. Steiner), *R. chondrina* (J. Steiner), *R. fastigiata* (Pers.) Ach. ve *R. fraxinea* (L.) Ach. türlerinin kloroform ve metanol ekstralarının Gram (-) bakteriler (*P. aeruginosa* ve *E. coli*), Gram (+) bakteriler (*E. faecalis* ve *S. aureus*) ve bir maya türüne (*C. albicans*) karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. İncelenen türlerin kloroform ve metanol ekstralarının, test edilen mikroorganizmaların farklı seviyelerde büyümesine karşı engelleyici aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Gram (-) bakteri türlerine karşı sadece *R. canariensis* (J. Steiner) ve *R. chondrina* (J. Steiner) türlerinin kloroform ekstraları etkinlik göstermiştir [51].

Güneş Yücel ve Özyiğitoğlu (2018)'nın *R. calicaris* (L.) Fr. liken türünün antibakteriyel ve antioksidan aktivitesini değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada *R. calicaris* (L.) Röhl. örneklerinin aseton ekstralarının uygulanan dozundaki artışa paralel olarak Gram (+) *E. faecalis* ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyel aktivitede artış gösterdiğini tespit etmiştir [52].

Stanly ve ark. (2011); *R. peruviana*'yı da içeren Malezya'dan topladıkları dört tür üzerinde antioksidan aktivite çalışmışlardır. *R. peruviana* 'nın aseton ekstresinde doza bağlı olarak artan antioksidan aktivite gözlemlemişlerdir [53].

Sundararaj ve ark. (2015); *R. nervulosa* (Müll. Arg.) Abbayes likeninin çeşitli çözücülerdeki (su, etanol, petrol eteri) elde edilmiş ekstralarının antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Antioksidan özelliklerin tespiti için FRAP, CUPRAC ve DPPH tayin yöntemlerini kullanmışlardır. En yüksek aktiviteyi etanol ekstresinde elde etmişlerdir. Aynı zamanda ekstrenin konsantrasyonu arttıkça indirgeme gücünün de arttığını bu çalışma da belirlemişlerdir [54].

Ganesan ve ark. (2016); *R. inflata*'nın antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi üzerine araştırma yapmıştır. Ekstreler, hem bakteriyel hem de mantar patojenlerini inhibe eden iyi bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ancak antioksidan aktivite gözlenmemiştir [55].

Zrnzević ve ark. (2017); *R. capitata* (Ach.) Nyl.'nın aseton ekstresinin antibakteriyel aktivitesini Gram (+) ve Gram (-) bakteriye karşı disk difüzyon yöntemini kullanarak test etmişlerdir. Test edilen Gram (+) bakteriler; *Bacillus spizizenii* ve *S. aureus*, Gram (-) bakteriler ise; *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Salmonella abony*'dir. Analizler sonucu liken türünün aseton ekstresinin Gram (+) bakterilere karşı yüksek antibakteriyel etkinliği olduğu, Gram (-) bakterilere karşı ise etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir [56].

Soundararajan ve ark. (2019); *R. fastigiata*'nın *in vitro* antimikrobiyal ve antioksidan potansiyelinin izlenmesi üzerine yaptığı çalışmada *R. fastigiata*'nın yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini tespit etmiştir [46].

Aoussar ve ark. (2020); Fas'tan topladıkları türler içerisinde *R. farinacea*'nında bulunduğu iki tür üzerine mevsimsel değişimin antioksidan aktivite ve fenolik içeriğe etkisini incelemişlerdir. Likenlerin toplanma zamanlarının fenolik içerik ve antioksidan kapasite üzerinde önemli bir etkisi olduğunu tespit etmişlerdir [57].

2.8. Çalışmada Test Edilen Mikroorganizmalar Hakkında Bilgiler

2.8.1. Çalışmada Test Edilen Gr (-) Bakteriler

2.8.1.1 *Escherichia coli*

İlk defa Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarında keşfedilmiştir. Basil şeklindedir. 2-6 µm boy ve 1-1,5 µm eninde düz bakteridir. 1-2 mm çapında S tipi

koloniler yapmaktadır. Bazen hareketli, fakültatif anaerob bakterilerdir. Özellikle 44 °C’de üremesi ile diğer bakterilerden ayırtedilebilmektedir. Isı ve soğuğa karşı dirençli olup bazı boya maddelerine, dezenfektanlara, % 7 NaCl’ye, safra ve safra tuzlarına karşı duyarlıdır. Koli basili olarak da bilinmektedir. Memeli hayvanların kalın bağırsağında normal bağırsak bakterisi olarak yaşamaktadır. Diğer bağırsak bakterileri ile dengeli olarak bulunmaktadır. Bu nedenle bakteri normalde hastalık yapmamaktadır. Ancak canlının savunma sisteminin azaldığı durumlarda doku ve kana yayılarak enfeksiyon etkeni haline gelebilmektedir. Safra ve safra yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit, otit, sinüzit, peritonit, hemolitik üremik sendrom bu enfeksiyonlardan bazılarıdır. Endospor oluşumu görülmez, kaynatma ya da pastörizasyon ile ölmektedir. En iyi vücut sıcaklığında üremektedir [148].

2.8.1.2 *Proteus mirabilis*

Proteus insan dışkısının normal olarak bir flora elemanıdır. Bu sebeple lağım sularında oldukça fazla bulunmaktadır. Uygun koşullar oluştuğunda insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Özellikle de idrar yolları ve yara enfeksiyonlarında sıklıkla rastlanmaktadır. Sepsis, menenjit ve organ apselerinden de izole edilebilmektedir. Besiyerinde *P. mirabilis* yayılma özelliği gösterir. % 6 agarlı jeloz besiyerinde hareket yeteneği azalmaktadır ve S tipinde, 3-4 mm çapında koloniler meydana getirmektedir. Isıya ve dezenfektanlara karşı dirençsizdir. Karanlık ve nemli ortamlarda daha uzun süre canlı kalabilmektedirler [149].

2.8.1.3 *Enterobacter aerogenes*

Enterobacteriaceae familyası üyesidir. Doğada, toprak, su, hayvan ve insan dışkısında bulunmaktadır. İnsanlarda fırsatçı patojen olarak enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu bakteriler hareketlerini peritrik kirpikleri sağlarlar. Sporsuz ve genelde kapsülsüzdürler. Gram (-), fakültatif anaerob olup 0,6 - 1,0 µm en ve 1,2-3,0 µm boyda basil bakterilerdir. Üst solunum yolu, idrar yolu, yara, yanık, menenjit ve sepsis enfeksiyonlarına neden olmaktadır [150].

2.8.2. Çalışmada Test Edilen Gr (+) Bakteriler

2.8.2.1 *Bacillus subtilis*

Kirpikleriyle hareketli bir basildir. Sporları oval ve subterminaldir. Kapsülsüz Gr (+), aerob bakterilerdir. Oda sıcaklığı ve zenginleşmemiş besiyerinde R tipi koloniler yaparak ürerler. Saprofit olup doğada yaygın olarak bulunabilirler. Doku veya göz içine bulaşarak enfeksiyon yaparlar. Besin zehirlenmelerine de neden olabilirler [151].

2.8.2.2 *Micrococcus luteus*

Tetrate şeklinde ya da düzensiz kümeli koklar halinde görülmektedirler. Yeşilimsi, sarı, ya da turuncu renkli koloniler oluşturabilirler. Doğada hemen her yerde bulunabildiğinden fırsatçı patojendir. Mikrokoklar gıdalarda da sıklıkla rastlanıp olması istenmeyen mikroorganizmalardır. Gıdalarda *Staphylococcus* türleriyle beraber aranır veya sayılır [152].

2.8.2.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus, tüm dünyada toplum ya da hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli bakterilerden biridir. 1878 yılında Robert Koch tarafından ilk kez tanımlanmıştır. Ogston tarafından “mikrokoklar, aktiviteleri düşük ve yayılma alanları sınırlı olduğunda yüzeysel süpüratif inflamasyona neden olan, ancak yayılma imkânı bulurlarsa septisemi oluşturabilen mikroorganizmalardır” şeklinde patojen olduğu 1880 yılında belirtilmiştir. Günümüzde halen *S. aureus* önemli bir patojen olma özelliğini sürdürmektedir ve *S. aureus* enfeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artmakta, aynı zamanda çoklu ilaç direnci nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisi giderek zorlaşmaktadır. Bu durum günümüzde stafilokokların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için kullanılabilecek yeni antibiyotiklerin arayışına girilmesine yol açmıştır [153].

2.8.3. Çalışmada Test Edilen Mantar

2.8.3.1 *Candida albicans*

C. albicans, diploit, eşeyli üreyen, maya tipi bir mantar türüdür. İnsanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Candida* cinsinin 200 türü olmasına karşın *Candida* enfeksiyonlarının % 75'inden *C. albicans* sorumlu olmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda (AIDS, kanser kemoterapisi, organ veya kemik iliği transferi durumlarında) sistemik mantarsal (fungal) enfeksiyonlar (fungemi), hastalık ve ölümün başlıca nedenleri arasındadırlar. Böyle bir riski olmayan hastaların hastaneden aldıkları enfeksiyonlar da ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. *C. albicans* insan ağızında ve sindirim sistemi içinde yaşamakta olan pek çok organizmadan biridir. *C. albicans* sindirim sisteminde başka patojen bakterilerin çoğalmasını engellemektedir. Vücudumuzun bağışıklık sistemi ve diğer zararsız bakteriler normal koşullarda *Candida*'yı kontrol altında tutarlar. Fakat antibiyotik kullanımı, bağışıklık sisteminin zayıflaması, yüksek şeker, yüksek pH gibi durumlar sebebiyle diğer bakterilerin sayısında *C. albicans*'a göre azalma olursa *C. albicans* zararsız olan tek hücreli şeklinden, çok hücreli, istilacı, küf gibi iplikli haline dönüşüp vücudu istila etmeye başlamaktadır [154].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Liken Türleri

Yozgat Bozok Üniversitesi herbaryumunda saklanan *Ramalina* örnekleri seçilmiş toplam üç lokaliteden toplanan örnekler çalışılmıştır. Arazi çalışmaları sırasında; örneklerin taşınması amacıyla sırt çantası, örnekler ile ilgili özellikleri not etmek için not defteri, kurşun kalem, kese kâğıtları, örneklerin sarılması için kâğıt ve örneklerin toplanması için çekiç, keski ve bıçak gibi aletler kullanılmıştır. Arazi poşetleri üzerine substrat çeşidi, istasyonun yüksekliği ve lokalitesi (Tablo 3.1), ortamın özelliği not edilmiştir.

Tablo 3.1. Toplanan örneklerin lokalite bilgileri

Liken Örnekleri	Koordinatlar
1. <i>Ramalina digitellata</i> (Nyl.) Nimis	Sinop, İnce Burunun kuzeybatısı, silisli kayalar üzerinde, 42° 01' 57'' K, 35° 11' 34'' D. 130 m., 23.09.2018.
2. <i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach	Yozgat, Çamlık Milli Parkı, 39° 48' 20.9" K, 34° 48' 51.7" D, 1490 m., 26.08.2017.
3. <i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach	Çorum, Laçın, 40° 45' 750'' K, 34° 52' 103'' D, 923 m., 26.08.2017.
4. <i>Ramalina polymorpha</i> (Lilj.) Ach	Yozgat, Çamlık Milli Parkı, 39° 47' 77.9" K, 34° 49' 29.7" D 1650 m., 27.08.2017.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Ramalina liken örneklerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla, Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) ve Gram (+) (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus*

luteus ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 6 bakteri ile 1 fungus (*Candida albicans* ATCC 10231) olmak üzere 7 mikroorganizma türü kullanılmıştır (Tablo 3.2). Antimikrobiyal çalışmamızda kullanılan test mikroorganizmaları Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu’ndan temin edilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma Suşları

	Mikroorganizmalar	Suş Kodları	Gram Boya
1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	ATCC 25922	Gram negatif(-)
2	<i>Proteus mirabilis</i> (<i>P.mirabilis</i>)	ATCC 25933	Gram negatif(-)
3	<i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>E.aerogenes</i>)	ATCC 13048	Gram negatif(-)
4	<i>Micrococcus luteus</i> (<i>M.luteus</i>)	ATCC 10240	Gram pozitif(+)
5	<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S.aureus</i>)	ATCC 25923	Gram pozitif(+)
6	<i>Bacillus subtilis</i> (<i>B.subtilis</i>)	ATCC 6633	Gram pozitif(+)
7	<i>Candida albicans</i> (<i>C.albicans</i>)	ATCC 10231	Fungus

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Örnekleri

Bu çalışmada A549 (İnsan Akciğer Kanseri Hücre Serileri) ve MDA-MB231 (İnsan Meme Kanseri Hücre Serileri) kullanılmıştır. Çalışmalar süresince bu hücreler +37°C’de CO₂ inkübatörde delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutulmuş ve düzenli olarak takip edilip besi yerleri iki gün ara ile değiştirilerek kültür sürdürülmüştür. Çoğalan hücrelerin bir kısmı dondurulup -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Aletler

Rotavapor (Ilmvac vakum pompası, Heidolph Laborat 4000 efficient)

Liyofilizatör (Labconco Freezone 4.5)

Santrifüj cihazı (Thermo scientific SL 16R, Hettich mikro 200R)

Ultrasonik banyo (Elma S 100H Elmasonic)

Su banyosu (Memmert)

Çalkalamalı su banyosu (Nüve ST 402)

Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı HPLC (SHIMADZU LC-20AT)

Dedektör: PDA (SHIMADZU SPD-M20A)

Kolon: ODS-4 (5µm; 4.6x250 mm)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)

Steril kabin (Safe Fast Elite)

Hücre sayım cihazı (Roche Innovatis Cedex Xs)

Gerçek zamanlı hücre analizörü (Roche)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Tayin Yöntemi

Toplanan liken örneklerinin tayininde Flechten flora [155] The Lichen flora of Great Britain and Ireland [156] gibi flora kitapları ve makalelerde verilen tayin anahtarlarından faydalanılmıştır [157]. Tayinde dış morfolojik karakterlerin belirlenmesinde stereomikroskop (Olympus SZX16), anatomik özellikler için ışık mikroskopu (Olympus BX53) kullanılmıştır. Ayrıca Stereomikroskop Olympus

SZX16'ya ve Olympus BX53'e bağı Olympus DP25 dijital kamera kullanılarak makroskopik ve mikroskopik dijital fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 2.2, 2.3, 2.4, 2.5). Tür ve tür altı kategorileri belirlemede oldukça önemli karakterler olan spor boyutları, askus boyutları, himenyum yükseklikleri, parafizlerin genişlikleri oküler mikrometre ile ölçülmüştür. Bunun yanında kimyasal reaktifler de kullanılmıştır. Örnekler herbaryum materyali haline getirilen zarflar içerisinde, Yozgat Bozok Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Liken Herbaryumu'na kayıtlanarak saklanmıştır. Morfolojik ve anatomik özelliklerine göre teşhiş edilen örnekler moleküler analizler ile ağaç oluşturularak desteklenmiştir.

3.2.2. Moleküler Analiz Yöntemleri

Örneklere DNeasy Plant Mini Kit kullanım talimatına uygun olarak DNA izolasyonu yapılmıştır [158].

İzole edilen DNA' da rDNA ITS, bölgelerinin çoğaltılması, uygun PCR şartlarında ilgili bölgeyi içine alan primer ITS1–F (CTTGGTCATTTAGAGAAGTAA [159]) ve ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC [160]) ile gerçekleştirilmiştir. Döngü şartları daha önce yapılmış olan çalışmadaki verilere göre belirlenmiştir [161].

Amplifikasyon ürünlerinin elektroforetik ayrımı % 1.2'lik agaroz jelinde yapılmış, jel red ile boyanmıştır. 100 bç DNA ladder moleküler ağırlık belirteci (Fermentas) ile beraber 50X TAE tamponu kullanılarak 100 voltta 1 saat elektroforez gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Ekstrelerin Hazırlanışı

Türlere ait örnekler *R. digitellata* 4,90 g, *R. fastigiata* 1,70 g, *R. fraxinea* 4,11 g, *R. polymorpha* 5,46 g olarak hassas terazide ölçülüp % 80'lik metanol ile çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 8'er saat süreyle üç kez ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstreler birleştirilip vakum altında rotavaporda (37-38°C) yoğunlaştırılmıştır. Tüm ekstreler liyofilize edilip kurutulmuştur ve analiz anına kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Kimyasal Kompozisyon Analizleri

Bitkisel materyallerden elde edilen ekstreler fenolik bileşikler bakımından çeşitli yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.4.1 Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asitte eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır [162]. 6 mL distile su içeren 10mL'lik kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. 1 dakika sonra 1.5 mL % 20'lik sulu Na_2CO_3 ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanılmıştır. 25°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbansı ölçülüp ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir.

3.2.4.2 Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin içeriğindeki toplam flavonoit analizi Zhishen ve ark. (1999)'nın çalışmalarında kullandıkları yöntem modifiye edilerek yapılmıştır [163]. Buna göre 1 mL ekstre t=0. dakikada 0,3 mL % 5'lik NaNO_2 çözeltisi ile karıştırılmış, t=5. dakika'da 0,3 mL % 10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ilavesinden sonra, t=6. dakika'da 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklenmiş ve 2,4 mL su ilave edilerek karıştırılmıştır. 510 nm'de köre karşı absorbans ölçülmüştür. Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları kateşine eşdeğer olarak $\text{mg}_{\text{CE}} / \text{g}_{\text{ekstre}}$ olarak hesaplanmıştır. Kateşinin kalibrasyon eğrisi aynı şekilde etanol kullanılarak hazırlanmıştır. Bütün ölçümler 3 paralel olacak şekilde yapılmış ve ortalama değerler alınmıştır.

3.2.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK - HPLC) ile Usnik Asit Miktar Tayini

Liken ekstrelerine ait örnekler % 70 metanolde çözülmüştür. Analizler için Shimadzu LC-20AT HPLC sistemi kullanılmıştır. Dedektör olarak PDA spektrofotometrik

dedektör, solvent olarak ise metanol-su-fosforik asit (75:25:0.9, v/v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dak olarak uygulanmış ve usnik asit standardı DMSO da çözölmüştür.

Tablo 3.3. YBSK gradient akış tablosu

Zaman (dk.)	Hareketli faz A (%)	Hareketli faz B (%)
0.01	60	40
5.00	50	50
10.00	40	60
15.00	30	70
20.00	20	80
30.00	10	90
40.00	-	100
55.00	-	

3.2.6. Antioksidan Aktivite Tayini

3.2.6.1 Radikal Süpürücü Etki Tayini

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini: Liken ekstrelerinin ve standart maddelerin serbest radikali süpürücü aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir [164].

Tris-HCl tamponu (50 nM, pH 7,4) ve 1 mL 0,1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırılmıştır. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol olarak butil hidroksi tolüen (BHT) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm’de okunmuştur. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyasyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplanmıştır. Analizler 4 paralel olarak tekrarlanmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100$$

2,2’-azino-bis (3- etilbenzathiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS⁺•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini: Ekstrelerin ABTS⁺• radikali süpürücü etkilerine bakılmıştır [165]. ABTS⁺• radikali (7 mM) ABTS’in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2,45 mM, son konsantrasyon)’ un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirilmiş ve

absorbansı oda sıcaklığında 734 nm’de 0,700 ($\pm$ 0,030) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 μ L) ile ekstre çözeltileri (10 μ L) karıştırılmış ve 734 nm’de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks’a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplanmıştır. Deneyler üç paralel olarak tekrarlanıp ve ortalama değerleri hesaplanmıştır.

3.2.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için agar disk difüzyon testi uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan liken ekstreleri 30 μ L’lik miktarları 6 mm çaplı (Oxoid, blank disc) boş steril disklerle emdirilmiştir. *Ramalina* liken ekstreleri su ve DMSO ile 20 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir liken ekstresi 0.45 μ m çapındaki steril filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Bakteriler için Mueller-Hinton Broth (MHB) besiyeri, Fungus için ise Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyeri kullanılarak üretici firmanın prosedürlerine uygun şartlarda mikroorganizmalar çoğaltılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gece kültüründen UV-VIS Spektrofotometre kullanılarak bakteri ve fungus konsantrasyonları 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde 0.5 McFarland’a göre ayarlanmıştır. Bakteri ve fungus kültürlerinden 100’er μ L sırasıyla Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyeri üzerine yayma ekim yapılmıştır. Liken ekstrelerini içeren diskler ve kontrol grupları, bakteri içeren besiyeri üzerine ilave edilmiş 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Fungus için ise 30°C’de 24 - 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol amacıyla Ampisilin (amp) ve Nystatin (nys) (Thermo Scientific™, Oxoid™, Amerika) standart antibiyotik diskleri (10 μ g/disk), negatif kontrol amacıyla ise steril fizyolojik su ve DMSO emdirilmiş diskler kullanılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları milimetrik cetvelle ölçülmüştür. Çalışmamız 2 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüş ve sonuçların değerlendirilmesinde aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.8. DNA Koruyucu Aktivitenin Belirlenmesi

Liken ekstrelerinin, DNA’yı UV ve oksidatif kaynaklı hasarlardan koruma etkinliklerinin tespiti için pBR322 plazmid DNA’sı (Thermo Fisher Scientific)

kullanılmıştır. Plazmid DNA'sı, liken ekstrelerinin varlığında H₂O₂ ve UV uygulanarak hasara uğratılmıştır. Liken ekstreleri 20 mg/mL % 5 seyreltilerek 5 µL, plazmid 3 µL, dH₂O 6 µL, H₂O₂ 1 µL, olmak üzere numuneleri sırasıyla;

1. tüpte: pBR322

2. tüpte: pBR322 + UV

3. tüpte: pBR322 + H₂O₂

4. tüpte: pBR322 + UV + H₂O₂

5. tüpte: pBR322 + *R.digitellata* ekstresi + UV + H₂O₂

6. tüpte: pBR322 + *R.fastigiata* ekstresi + UV + H₂O₂

7. tüpte: pBR322 + *R.polymorpha* ekstresi + UV + H₂O₂

8. tüpte: pBR322 + *R.fraxinea* ekstresi + UV + H₂O₂ eklenmiştir. Liken ekstrelerinin olduğu tüplere 5 dk. süreyle UV ışık uygulandıktan sonra 3 saat inkübasyona tabi tutulmuş ve 3 µL loading dye boyası eklendikten sonra % 1'lik agaroz jelde 80 V 3 saat koşturularak, jel görüntüleme sisteminde (Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+) fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.9. Sitotoksisite Tayini

Bu çalışmada A549 (İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı) ve MDA-MB231 (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı) kullanılmıştır. Çalışmalar süresince bu hücreler +37°C'de CO₂ inkübatörde delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutulmuş ve düzenli olarak takip edilip besi yerleri iki gün ara ile değiştirilerek kültür sürdürülmüştür. Çoğalan hücrelerin bir kısmı dondurulup -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Hücrelerin kültüre edilmesi aşamasında; ticari olarak satın alınan hücreler, +37°C'de çözülüp, hücrenin üzerine 5 mL PBS ekleyerek 1600 rpm'de 5 dakika 20°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 5 mL kadar taze besiyeri ekleyip yavaşça pipetleyerek homojenize edilmiş ve delikli hücre kültür kabına aktararak CO₂'li inkübatöre kaldırılmıştır.

Hücrelerin pasajlanması; flask içerisinde kültüre edilen hücreler iki günlük inkübasyon süresi sonunda, 15 mL'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. 800g'de +20°C'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelet, penisilin içeren yaklaşık 5 mL PBS (pH: 7,3) tamponu içinde hücrelere zarar vermeyecek şekilde çözülüp aynı koşullarda tekrar santrifüje edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pellet önceden hazırlanmış besiyeri içinde çözülerek kültür kabına aktarılmıştır. Pasajlama işleminin iki gün arayla yapılma nedeni olası kontaminasyonlardan ve ölü hücre kalıntılarının zararlı etkilerinden canlı hücrelerin etkilenmesini önlemektir.

Hücrelerin dondurulması ve saklanması aşamasında ise; hücreler besiyeri değiştirirken olduğu gibi santrifüj ve yıkama işlemlerine tabi tutulmuştur. Hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Hücreler 1 mL PBS ile süspand edilerek, steril tüpe aktarılmış ve üzerine 1mL krio çözeltisi karışımından eklenmiştir. (% 10 DMSO) ve hazırlanan krioların kademeli olarak donmalarını sağlamak için ilk olarak +4°C'de yarım saat, -20°C'de 3 saat bekletildikten sonra -80°C'ye kaldırılıp dondurulmuştur.

3.2.9.1 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi

Sitotoksitesite tayini için insan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB231) ve İnsan Akciğer Kanseri Hücresi Hattı (A549) kullanılmıştır. Sitotoksik etkiler, sitotoksitesitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir.

% 80'lik metanol ekstraktları, A549 ve MDA-MB231 hücreleri üzerindeki sitotoksitesitesi MTT kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. Hücreler uygun besi yerinde çoğaltılmıştır. Çalışmadan 24 saat önce flastaki hücreler sayılarak 96 kuyucuklu mikroploğa kuyucuk başına 100 µL'de 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat

sonunda plağa yapışmış olan hücrelerin üstündeki besi yerleri atılmış ve besiyerinde seyreltilerek hazırlanan ekstreler 3,906-1000 µg/mL aralığında düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru 100 µL alınarak plağa eklenmiş ve 37°C’de karbondioksitli etüvde 48 saat bekletilmiştir. Steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plaklara ilave edilmiştir. İnkübatörde 3 saat bekletildikten sonra plaktaki besiyeri boşaltılarak 100 µL DMSO eklenmiştir. 5 dk. çalkalandıktan sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında (Bio-Rad, ABD) 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Kontrol kuyucukları okutularak elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınıp bu değer % 100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Çözücü ve ekstre uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlanıp ve yüzde canlılık olarak kabul edilmiştir.

% Hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) *100 olarak hesaplanmıştır.

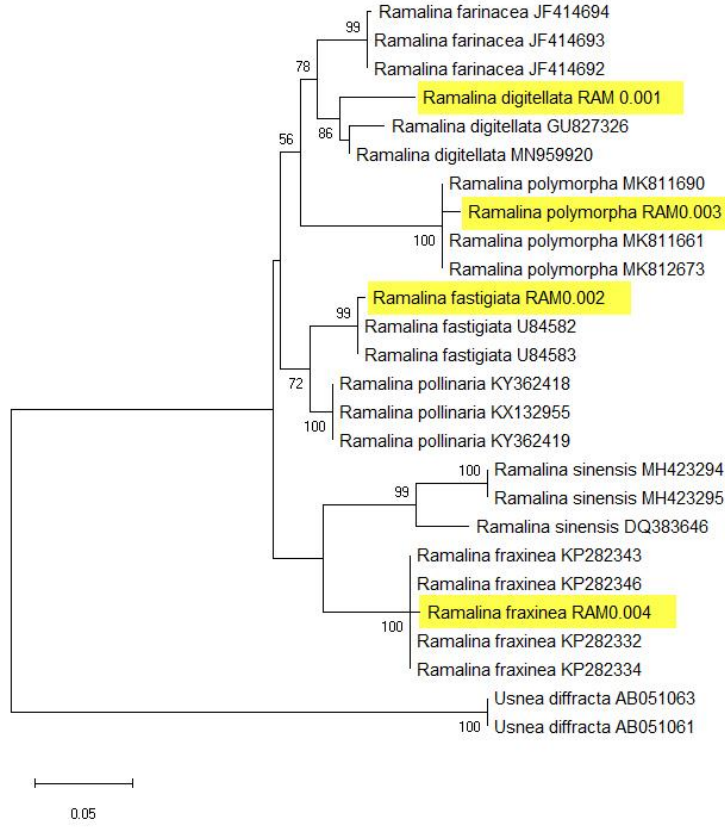
4. BULGULAR

4.1. Likenlerin Teşhisi ve Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Firmadan gelen sekans sonuçları NCBI “National Center for Biotechnology Information”, (www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankasındaki verilerle BLAST programı üzerinden karşılaştırılarak filogenetik benzerlikleri incelenmiştir. Her bir veri Bioedit programı kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan örnekler ve NCBI gen bankasındaki en yakın karşılıklarına ait veriler MEGA 7 Construct/Test Maximum Likelihood (ML) Tree yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Tablo 4.1). Dış grup seçiminde daha önce yapılmış olan çalışmada kullanılan dış gruplar tercih edilmiştir [148].

Tablo 4.1. Gen Bankasından indirilen ve yeni elde ettiğimiz sekanslar

Takson	Numara	Lokale / Kaynak	ITS
<i>Ramalina digitellata</i>		Genbank	GU827326
<i>Ramalina digitellata</i>		Genbank	MN959920
<i>Ramalina digitellata</i>	RAM 0.001	Turkey	*
<i>Ramalina farinacea</i>		Genbank	JF414692
<i>Ramalina farinacea</i>		Genbank	JF414693
<i>Ramalina farinacea</i>		Genbank	JF414694
<i>Ramalina fastigiata</i>	RAM 0.002	Turkey,	*
<i>Ramalina fastigiata</i>		Genbank	U84582
<i>Ramalina fastigiata</i>		Genbank	U84583
<i>Ramalina fraxinea</i>	RAM 0.004	Turkey,	*
<i>Ramalina fraxinea</i>		Genbank	KP282332
<i>Ramalina fraxinea</i>		Genbank	KP282334
<i>Ramalina fraxinea</i>		Genbank	KP282343
<i>Ramalina fraxinea</i>		Genbank	KP282346
<i>Ramalina pollinaria</i>		Genbank	KX132955
<i>Ramalina pollinaria</i>		Genbank	KY362418
<i>Ramalina pollinaria</i>		Genbank	KY362419
<i>Ramalina polymorpha</i>	RAM 0.003	Turkey,	*
<i>Ramalina polymorpha</i>		Genbank	MK811661
<i>Ramalina polymorpha</i>		Genbank	MK811690
<i>Ramalina polymorpha</i>		Genbank	MK812673
<i>Ramalina sinensis</i>		Genbank	DQ383646
<i>Ramalina sinensis</i>		Genbank	MH423294
<i>Ramalina sinensis</i>		Genbank	MH423295
<i>Usnea diffracta</i>		Genbank	AB051061
<i>Usnea diffracta</i>		Genbank	AB051063



Şekil 4.1. *Ramalina* cinsine ait ITS bölgesi filogenetik analizi

4.2. Liken Ekstrelerinin Kimyasal Kompozisyon Analizleri

4.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenol miktarları yöntemler kısmında verilen deneysel yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam fenol miktarları gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir. Tüm ekstreler arasında en yüksek fenol içeriği *R. digitellata* $144,69 \pm 1,62 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ ’da saptanmıştır. Sırasıyla *R. fastigiata*; $139,92 \pm 23,04 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$, *R. polymorpha*; $76,66 \pm 3,22 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ ve *R. fraxinea*; $76,51 \pm 0,71 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ ile olarak saptanmıştır.

4.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları yöntemler kısmında verilen deneysel yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam flavonoit miktarı kateşine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Tüm ekstreler arasında *R. fastigiata*’nın $20,40$

$\pm 0,59 \text{ mg}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ ile en yüksek flavonoit içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Likenlerin metanol ekstrelerindeki toplam fenol ve flavonoit içerikleri

Ekstre	Toplam Fenol	Toplam Flavonoit
	[$\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$]	[$\text{mg}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$]
<i>R. digitellata</i>	$144,69 \pm 1,62^*$	$14,82 \pm 0,19^*$
<i>R. fastigiata</i>	$139,92 \pm 23,04^*$	$20,40 \pm 0,59^*$
<i>R. fraxinea</i>	$76,51 \pm 0,71^*$	$17,14 \pm 0,27^*$
<i>R. polymorpha</i>	$76,66 \pm 3,22^*$	$13,23 \pm 0,58^*$

*Ortalama $\pm$ SD; n=3

4.2.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK-HPLC) ile Usnik Asit Miktar Tayini

Ramalina türleri için Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK-HPLC) ile usnik asit miktar tayini yapılmıştır. Kalibrasyon için standartlar 10-50-100-250-750-1000 mg/L konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Ekstreler ise 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Akış hızı 0.5 mL/dk, enjeksiyon miktarı 10 μL , dalga boyu 280-320 nm olup mobil faz A) % 0,1’lik H_3PO_4 B) Metanol ‘dür. Sonuçlar Tablo 4.3 ve 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Usnik asit standardına ait kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısı

Madde	Kalibrasyon Denklemi [$y=ax+b$]	Korelasyon Katsayısı [r^2]
Usnik asit	$y = 28861 x - 198579$	0,9986

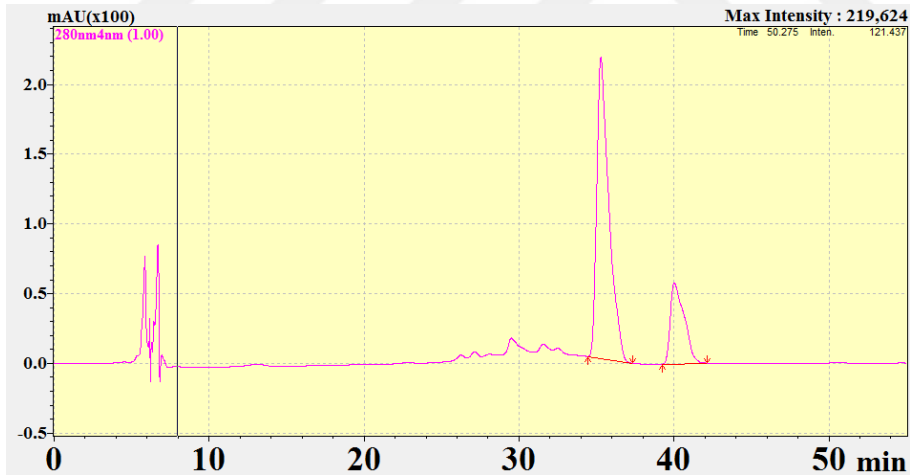
Tablo 4.4. Ekstrelerin içerdiği usnik asit miktarı

Ekstre	Usnik asit ($\text{mg}/\text{g}_{\text{ekstre}}$)
<i>R. digitellata</i>	$1574,53 \pm 0,81$
<i>R. fastigiata</i>	$1315,42 \pm 3,21$
<i>R. fraxinea</i>	$114,16 \pm 14,74$
<i>R. polymorpha</i>	$885,63 \pm 25,99$

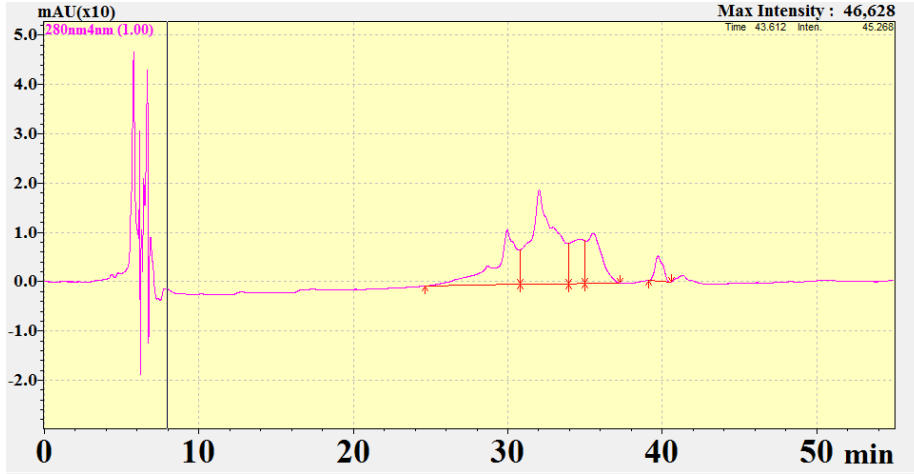
Usnik asit miktarı çalışılan *Ramalina* türleri arasında *R. digitellata*'da en yüksek (1574,53 mg/g_{ekstre}), *R. fraxinea*'da ise en düşük (114,16 mg/g_{ekstre}) olarak belirlenmiştir. Türlerin ekstrelerine ait kromatogramlar Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.



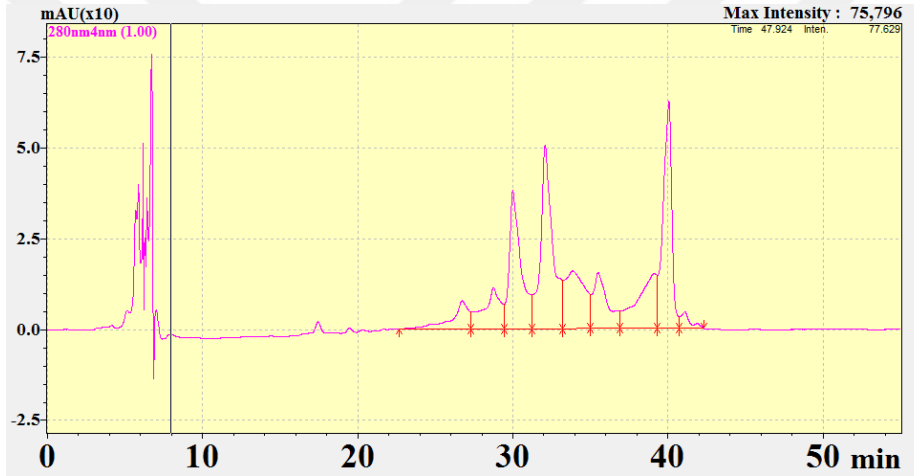
Şekil 4.2. *R. digitellata* ekstresine ait kromatogram



Şekil 4.3. *R. fastigiata* ekstresine ait kromatogram



Şekil 4.4. *R. fraxinea* ekstresine ait kromatogram



Şekil 4.5. *R. polymorpha* ekstresine ait kromatogram

4.3. Liken Ekstrelerinin Biyolojik Aktiviteleri

4.3.1. Antioksidan Aktivite Tayini

4.3.1.1 Radikal Etki Süpürücü Tayini

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Vücuttan zararlı ve hastalık yapıcı radikallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla örneklerin antiradikal etkilerinin ölçülmesinde azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH• radikali kullanılmıştır. Ekstreler DPPH• radikali fizyolojik pH'da konsantrasyona bağlı olarak süpürmüşlerdir. Ekstrelerin 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, /1 mg/mL, 2 mg/mL ve 4 mg/mL konsantrasyonlarda DPPH radikali

süpürücü etkisi ve standart olarak kullanılan BHT'nin yüzde inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.5'de verilmiştir. DPPH• radikali süpürücü aktivite deneyinde 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda *R. fraxinea* sırasıyla % 18,01±6,34, % 31,74±5,31 ve % 47,77±6,89 inhibisyon değeri göstererek en aktif tür olarak belirlenmiştir. 2 mg/mL'lik konsantrasyonda *R. digitellata* % 66,53±2,51, 4 mg/mL konsantrasyonda *R. polymorpha* % 67,93±4,31 ve *R. fraxinea* % 67,06±3,03 inhibisyon göstermişlerdir. Elde edilen verilere göre ekstrelerin pozitif kontrol olan BHT kadar etkili olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.5. *Ramalina* türlerinin DPPH• Radikalini Süpürücü Etki Tayini % inhibisyon değerleri

% İnhibisyon						
	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0,125 mg/mL
<i>R. digitellata</i>	63,30±4,52	66,53±2,51	41,70±2,58	28,47±0,48	19,42±2,56	15,38±0,49
<i>R. fastigiata</i>	50,66±5,17	62,82±2,00	52,18±4,77	35,32±4,72	21,97±5,84	13,77±5,71
<i>R. fraxinea</i>	67,06±3,03	64,84±2,65	54,46±4,02	47,77±6,89	31,74±5,31	18,01±6,34
<i>R. polymorpha</i>	67,93±4,31	64,45±2,94	40,27±6,92	32,89±5,68	27,90±7,02	17,81±6,89
BHT	85,4±3,02	82,3±3,01	78,8±3,8	66,0±4,5	55,08±3,2	39,4±5,38

2,2'-azino-bis (3-etilbenzatiyazolin-6-sulfonik asit) (ABTS⁺•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Bu yöntem mavi/yeşil renkli bir bileşik olan ABTS⁺• radikali katyonu tarafından antioksidatif maddelerin miktarının spektroskopik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile flavonoidler, hidroksisinnamik asitler, karotenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar ölçülebilmektedir. Ekstreler 2 mg/mL, 1mg/mL ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda çalışılmıştır. ABTS⁺• radikali süpürücü aktivite deneyinde tüm konsantrasyonlar incelendiğinde *R. fraxinea* en aktif tür olarak belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin 2 mg/mL' de *R. digitellata* hariç olmak üzere BHT' ye yakın etki gösterdiği gözlenmiştir.

Tablo 4.6. *Ramalina* türlerinin ABTS⁺ radikali süpürücü aktiviteleri

TEAC (mmol/L/Trolox)			
Örnekler	0,5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
<i>R. digitellata</i>	1,04±0,29	1,36±0,42	1,71±0,42
<i>R. fastigiata</i>	1,24±0,36	1,74±0,41	2,29±0,40
<i>R. fraxinea</i>	1,30±0,17	2,24±0,25	2,45±0,03
<i>R. polymorpha</i>	0,86±0,14	1,55±0,24	2,14±0,28
BHT	2,50±0,1	2,55±0,8	2,5±0,9

4.3.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

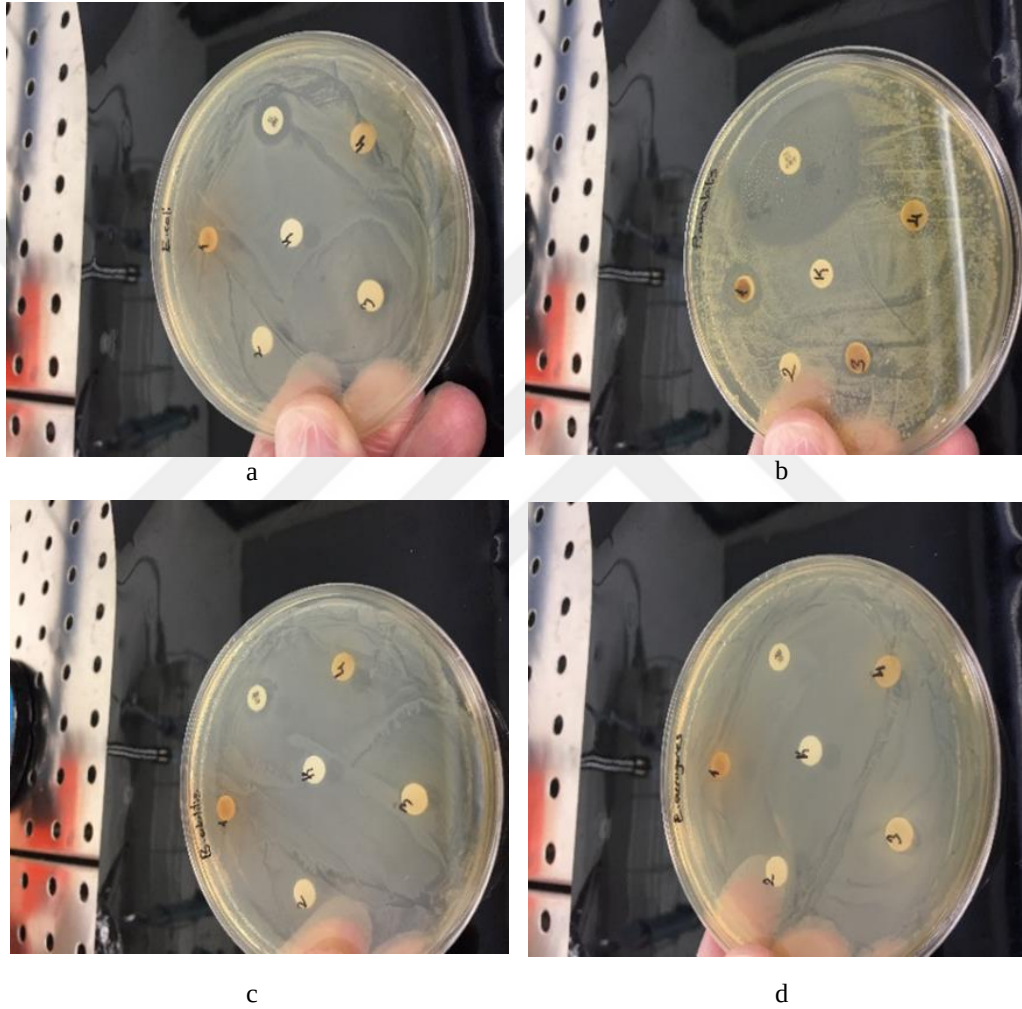
Ramalina likenleri ekstralarının 6 bakteri suşu ile 1 fungus türüne karşı antimikrobiyal etkileri test edilmiş meydana gelen inhibisyon zonları Tablo 4.7’ de gösterilmiştir. *R. digitellata*, *R. fastigiata*, *R. fraxinea*, *R. polymorpha* ekstralarının mikroorganizmalar üzerine etkisi bulunmuştur. *C. albicans* türüne karşı herhangi bir antifungal aktivite kaydedilmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan ampisilin ve nystatin genel olarak liken ekstrallerinden daha yüksek aktiviteye gösterirken, negatif kontrol olarak kullanılan DMSO ve suda aktivite gözlenmemiştir. *R. polymorpha* ekstresi diğer ekstrallere oranla daha fazla bakteri suşunda aktivite gösterirken, *R. fastigiata* ekstresi bir bakteri suşunda (*S. aureus*) etki göstermiştir.

Tablo 4.7. *Ramalina* ekstralarının çalışılan mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonları (mm)

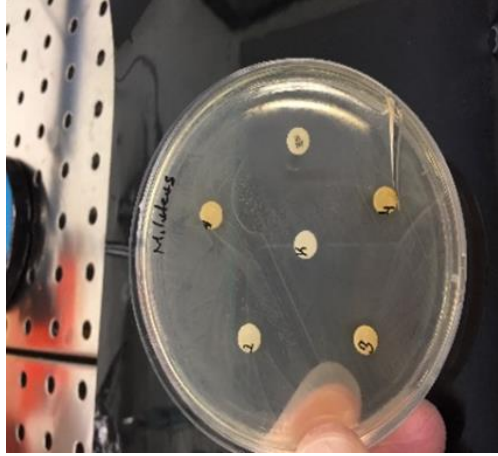
Mikroorganizma	<i>R. digitellata</i> ekstresi	<i>R. fastigiata</i> ekstresi	<i>R. fraxinea</i> ekstresi	<i>R. polymorpha</i> ekstresi	(-) Kontrol Boş disk	(+) Kontrol (ampisilin)
<i>E. coli</i>	-	-	-	10.0 mm	-	14.0 mm
<i>P. mirabilis</i>	12.5 mm	-	-	7.5 mm	-	37.0 mm
<i>M. luteus</i>	-	-	10.0 mm	10.0 mm	-	33.0 mm
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	-	11.0 mm
<i>S. aureus</i>	7.0 mm	7.0 mm	7.0 mm	-	-	19.0 mm
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	12.0 mm
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	15.0 mm (nystatin)

Ramalina ekstralarının oluşturdukları inhibisyon zonlarının fotoğrafları Şekil 4.6’da verilmiştir. *Ramalina* ekstralleri için en yüksek inhibisyon çapı (12.5 mm) *P. mirabilis* bakteri suşu üzerinde gözlemlenmiştir. *Ramalina* ekstralarının antimikrobiyal

aktivitelerinin hiç gözlemlenmediği suşlar ise *E. aerogenes*, *B. subtilis* ve *C. albicans* olarak tespit edilmiştir. *R. polymorpha* en fazla bakteri suşunda (üç suşta) antimikrobiyal aktivite gösterirken, *R. fastigiata* en az bakteri suşunda (sadece bir bakteri) antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan ampisilin, bakteriler için ve nistatin ise fungus için en yüksek aktivite göstermiştir.



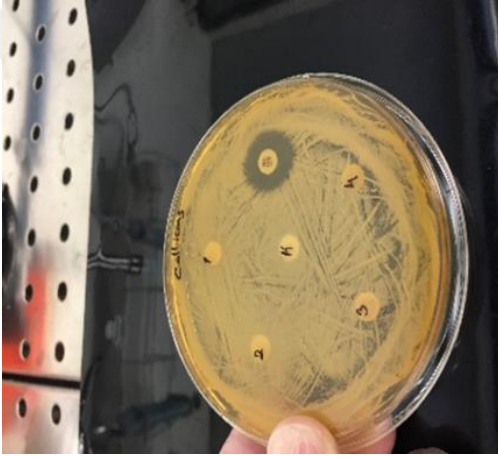
Şekil 4.6. *Ramalina* ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri
(a) *E. coli*, (b) *P. mirabilis*, (c) *B. subtilis*, (d)



e



f

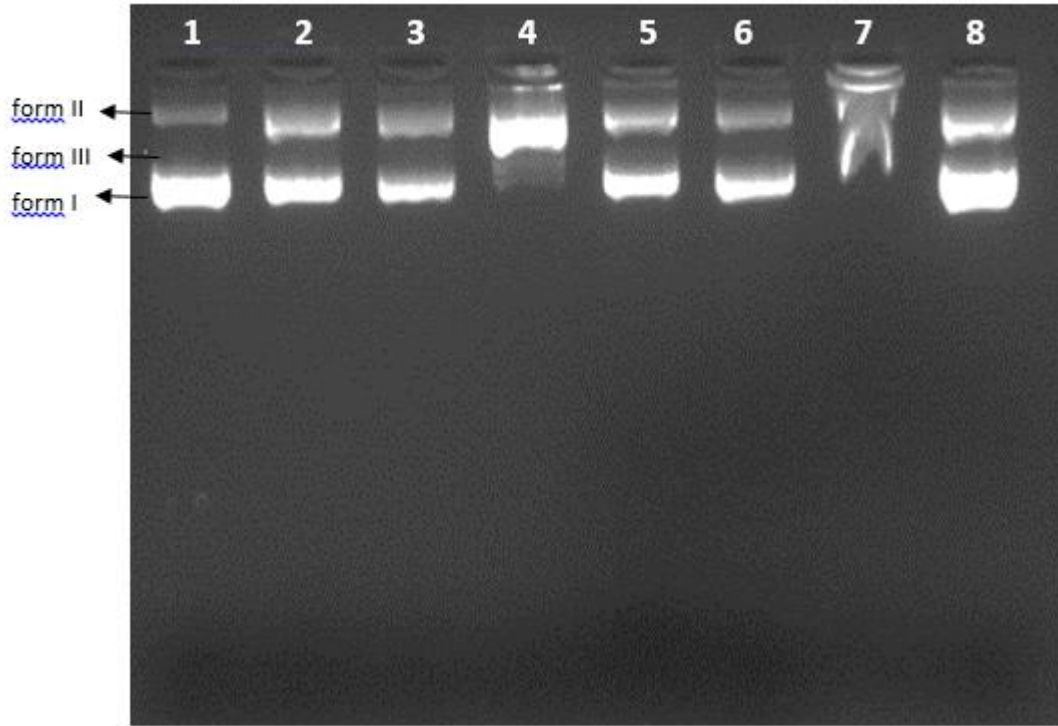


g

Şekil 4.7. *Ramalina* ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri (Devam)
E. aerogenes, (e) *M. luteus*, (f) *S. aureus*, (g) *C. albicans*

4.3.3. DNA Koruyucu Aktivitenin Belirlenmesi

R. digitellata, *R. fastigiata*, *R. polymorpha*, *R. fraxinea* ekstralarının DNA koruyucu aktivitesi, pBR322 plazmid DNA'sı kullanılarak test edilmiştir. Bu yöntemle göre, liken ekstraları UV ve H₂O₂'ye karşı DNA koruyucu aktivite göstermiştir. Bu likenlerin ekstralarıyla gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Plasmid DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

1) pBR322, 2) pBR322 + UV 3) pBR322 + H₂O₂, 4) pBR322 + UV + H₂O₂, 5) *R. digitellata* ekstresi, 6) *R. fastigiata* ekstresi, 7) *R. polymorpha* ekstresi, 8) *R. fraxinea* ekstresi

4.3.4. Sitotoksite Tayini

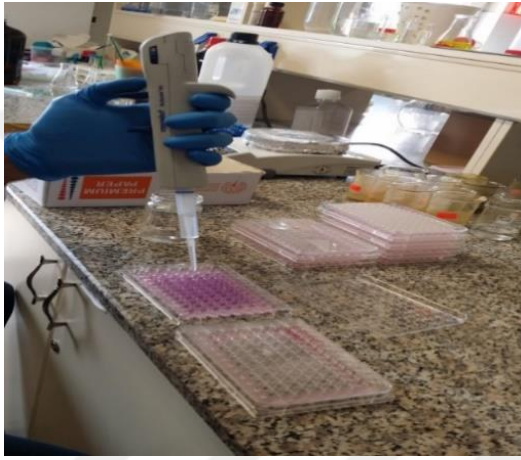
4.3.4.1 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi

A549 ve MDA-MB 231 hücrelerinde sitotoksik etki MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testi *in vitro* sitotoksite taramasında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bir tetrazoltum tuzu olan MTT, sarı renkli olup yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağlı olarak spektrofotometrik yöntemler görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece indirekt olarak hücrelerin

metabolik aktiviteleri ölçülmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir [166-168].

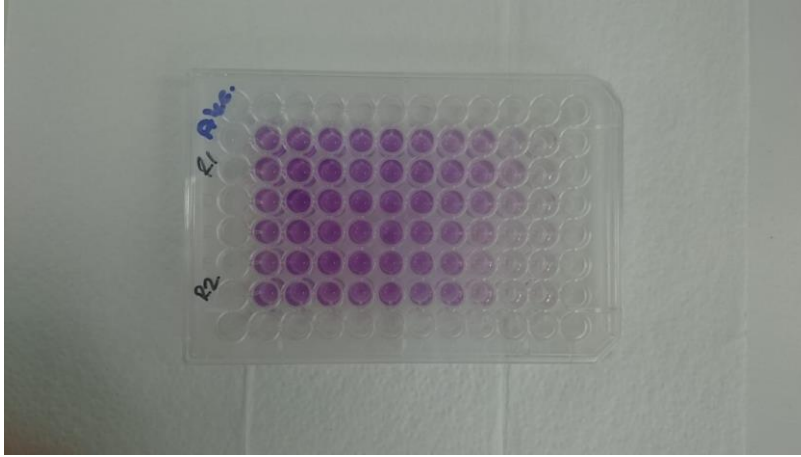
Sonuçlar yüzde (%) olarak verilmiş ve hücre kontrol grubu canlılığı % 100 kabul edilerek diğer gruplar hesaplanmıştır (Tablo 4.8 ve Tablo 4.9).

Ekstreler 3,906 µg/mL, 7,8125 µg/mL, 15,625 µg/mL, 31,25 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 mg/mL konsantrasyonlarda test edilmiştir.

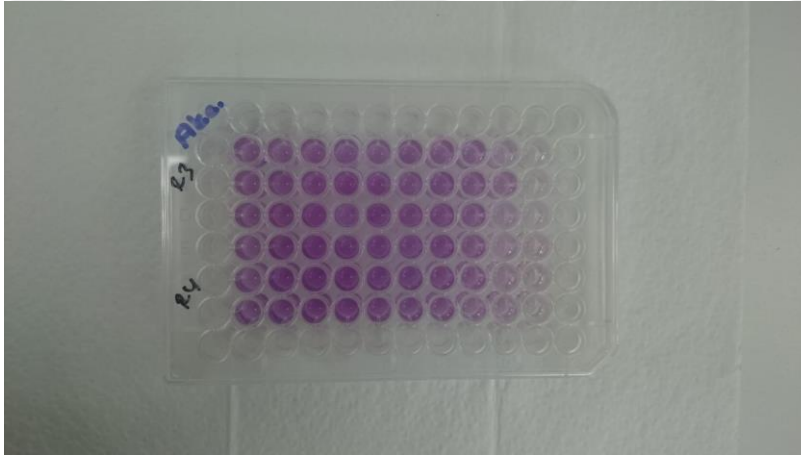


Şekil 4.9. MTT Testi

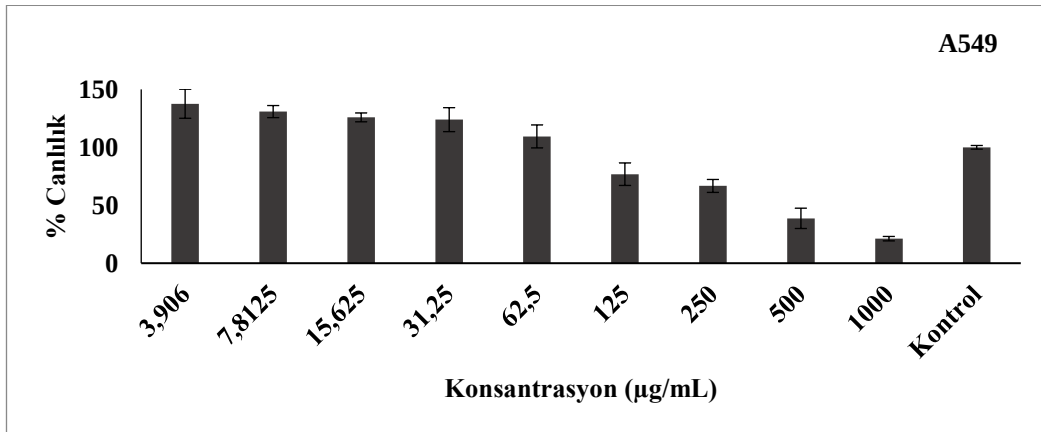
A549 hücre hattı için MTT hücre canlılığı yöntemiyle elde edilen sonuçlar Tablo 4.8’de verilmiştir. Sonuçlar yüzde (%) olarak verilmiş ve hücre kontrol grubu canlılığı % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer gruplar hesaplanmıştır. A549 (akciğer kanseri) hücre hattında *R. fastigiata* ekstresi 250 µg/mL’de % 41,96 canlılık seviyesi ile sitotoksik etki göstermiş olup aynı konsantrasyonda diğer türlerde toksik etki görülmemiştir. 1000 µg/mL’de ise tüm türlerde sitotoksik etki görülmüştür.



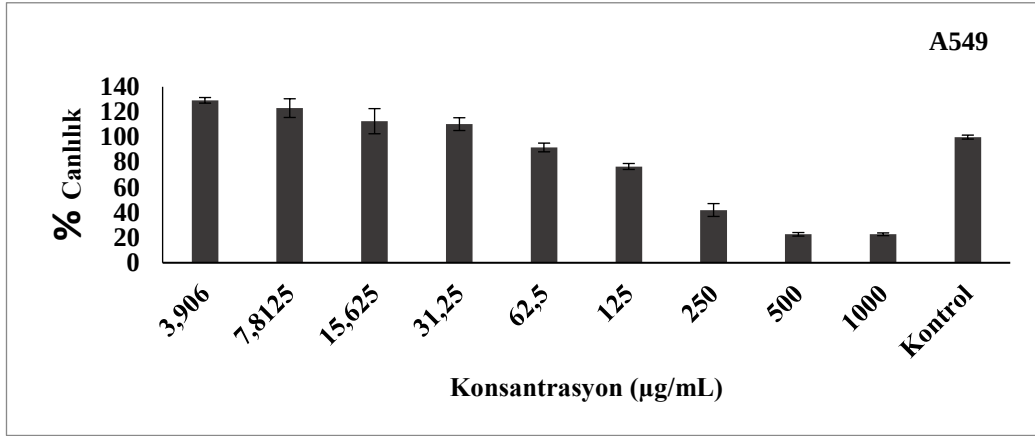
Şekil 4.10. *R. digitellata* ve *R. fastigiata* ekstrelerinin A549 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi



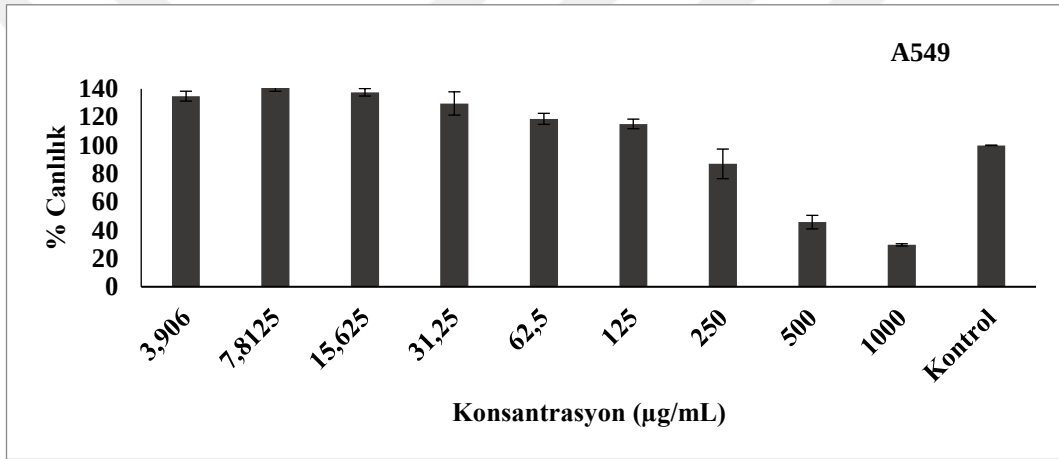
Şekil 4.11. *R. polymorpha* ve *R. fraxinea* ekstrelerinin A549 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi



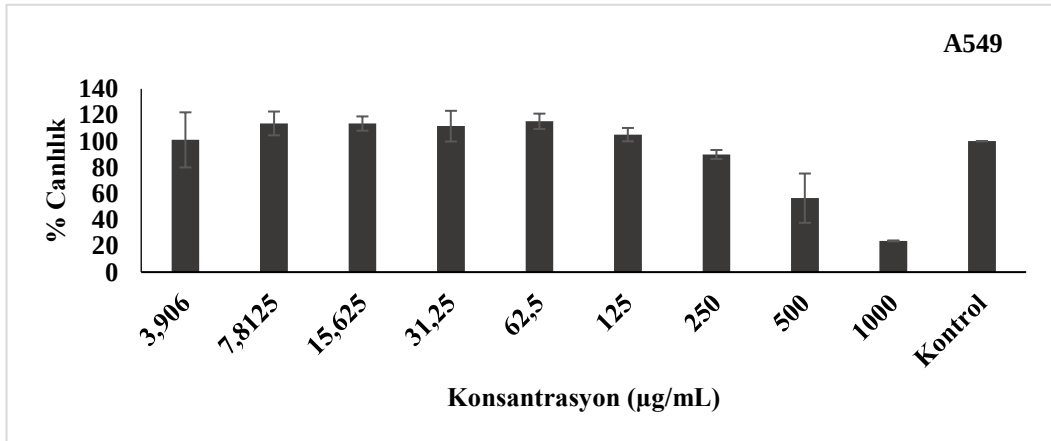
Şekil 4.12. *R. digitellata* ekstrelerinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi



Şekil 4.13. *R. fastigiata* ekstresinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi



Şekil 4.14. *R. fraxinea* ekstresinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi

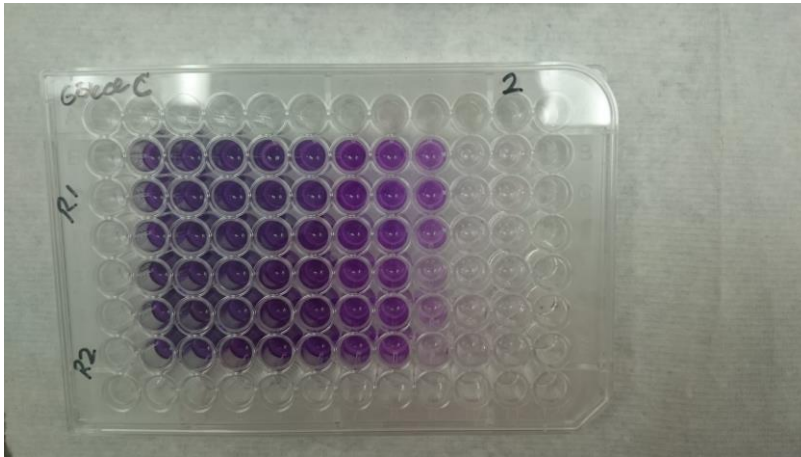


Şekil 4.15. *R. polymorpha* ekstresinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkisi

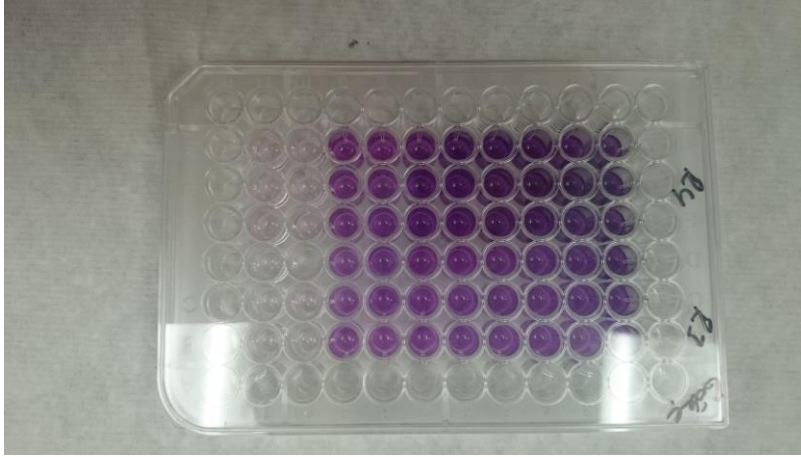
Tablo 4.8. *Ramalina* türlerinin A549 hücre hattında canlılığa olan etkileri

Türler		<i>R. digitellata</i>	<i>R. fastigiata</i>	<i>R. fraxinea</i>	<i>R. polymorpha</i>
Hücre hattı		A549	A549	A549	A549
KONSANTRASYONLAR (µg/mL)	3,906	137,6045±12,534 82	129,2479±2,2284 12	134,8303±3,4701 27	100,998±21,0441 6
	7,8125	130,8264±5,2137 03	123,0269±7,4344 22	145,509±7,26009 3	113,5729±9,0927 97
	15,625	125,8124±3,8023 39	112,6277±10,005 91	137,525±2,61583 7	113,4731±5,4471 27
	31,25	123,8626±10,326 46	110,3064±5,0830 88	129,6407±8,2321 72	111,477±11,7200 7
	62,5	109,3779±9,9085 03	91,7363±3,48282 3	118,7625±3,9075 39	115,1697±5,8695 87
	125	76,78737±9,6907 65	76,60167±2,3799 45	115,1697±3,4049 35	104,99±5,119089
	250	66,66667±5,5803 08	41,96843±5,1084 66	86,92615±10,480 47	89,82036±3,4528 63
	500	38,71866±8,7776 89	22,65552±1,4020 12	45,70858±4,8122 01	56,48703±18,827 39
	1000	21,16992±1,9298 62	22,65552±1,0545 79	29,64072±0,7921 41	23,8523±0,34571 9

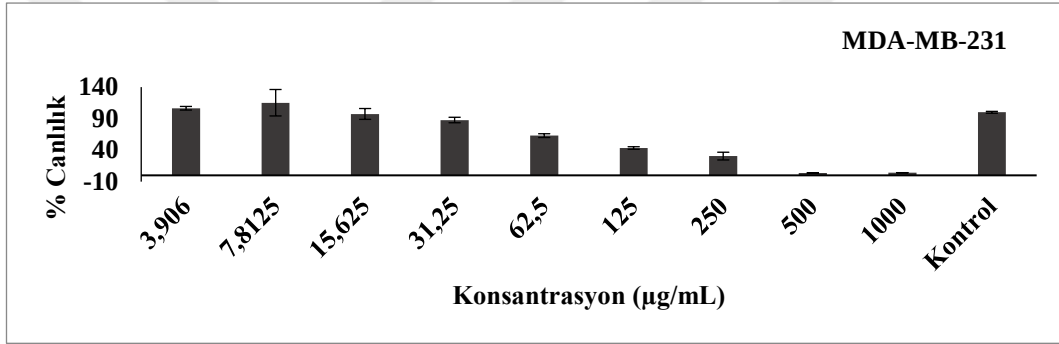
MDA-MB 231 hücre hattı için MTT hücre canlılığı yöntemiyle elde edilen sonuçlar Tablo 4.9’da verilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında *R. fastigiata* ekstresinde 62,5 µg/mL’de canlılık % 47,48 seviyesindedir. Aynı konsantrasyonda diğer türlerde toksik etki görülmemiştir. 250 µg/mL’de ise tüm liken türleri sitotoksik etki göstermiştir.



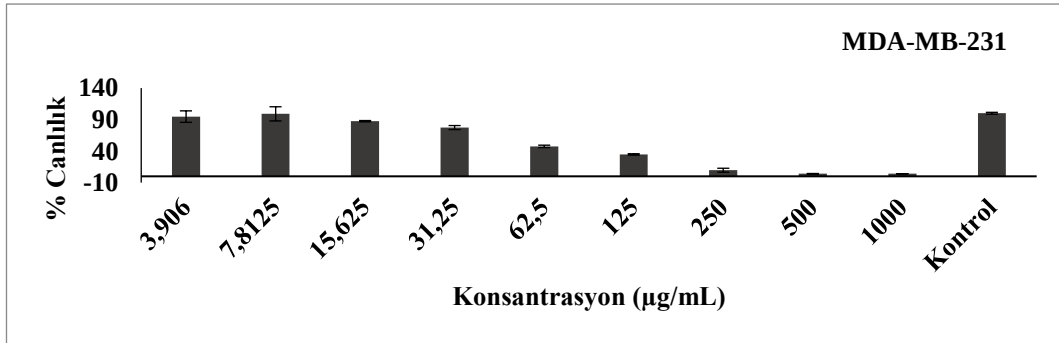
Şekil 4.16. *R. digitellata* ve *R. fastigiata* ekstrelerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi



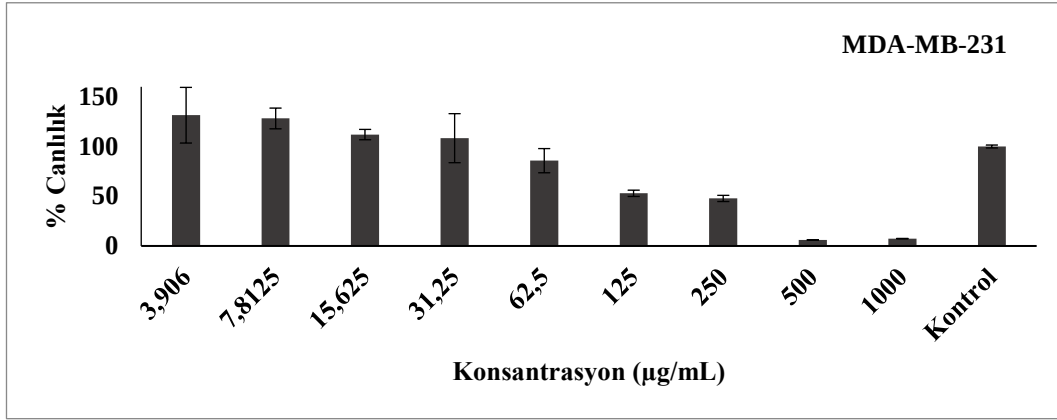
Şekil 4.17. *R. polymorpha* ve *R. fraxinea* ekstrelerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yapılan MTT testi



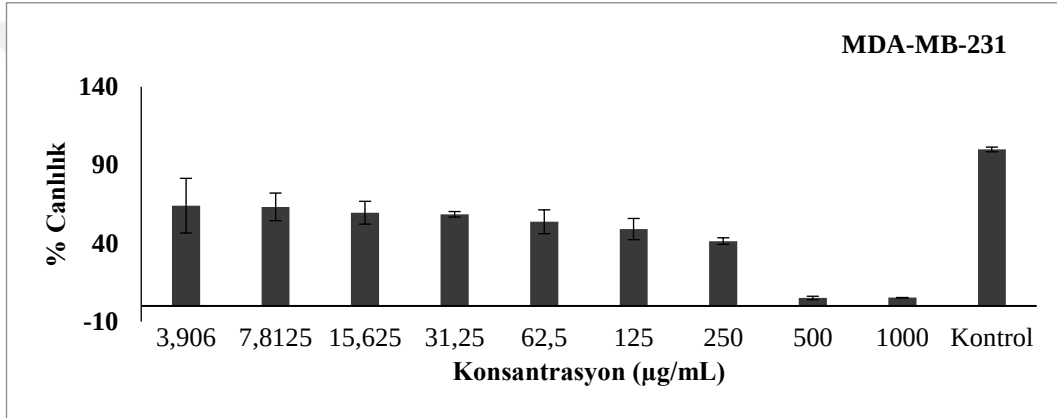
Şekil 4.18. *R. digitellata* ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi



Şekil 4.19. *R. fastigiata* ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi



Şekil 4.20. *R. fraxinea* ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi



Şekil 4.21. *R. polymorpha* ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa etkisi

Tablo 4.9. *Ramalina* türlerinin MDA-MB-231 hücre hattında canlılığa olan etkileri

Türler		<i>R. digitellata</i>	<i>R. fastigiata</i>	<i>R. fraxinea</i>	<i>R. polymorpha</i>
Hücre hattı		MDA-MB-231	MDA-MB-231	MDA-MB-231	MDA-MB-231
KONSANTRASYONLAR (µg/mL)	3,906	106,4661±2,826107	94,71127±9,091466	131,466±27,95536	64,05759±17,46289
	7,8125	115,1747±20,99691	99,0656±11,27324	128,1937±10,4466	63,29843±8,837434
	15,625	97,40235±8,61355	87,4416±1,059798	111,9634±5,206003	59,58115±7,281817
	31,25	87,7593±4,355128	77,33134±3,205649	108,3508±24,64734	58,56021±1,751385
	62,5	62,99757±2,979506	47,48645±1,949393	85,73298±12,15384	53,76963±7,606998
	125	43,33769±2,020649	34,74117±1,065713	52,93194±3,187166	49,10995±6,783692
	250	30,53635±6,169195	9,71781±3,116657	47,77487±3,119031	41,43979±2,09604
	500	3,756307±0,112129	4,055317±0,424512	6,04712±0,283158	5,078534±1,122606
	1000	4,130069±0,141092	4,055317±0,08564	7,356021±0,226708	5,287958±0,119963

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Likenler, bir mantar ve bir fotosentetik partnerden (ökaryotik bir alg ya / ya da siyanobakteri) oluşan simbiyotik birliktelikten oluşan sistemlerdir. Likenler asırlar boyunca halk ilacı olarak birçok kültürde, çeşitli rahatsızlıkları ve hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır [19].

Ramalina'nın biyolojik aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma literatürde mevcuttur [8, 44-58]. Bu tez kapsamında ise dört farklı *Ramalina* türünün *in vitro* antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve bu etkilerden sorumlu olduğu düşünülen aktif bileşiği usnik asitin miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Liken ekstrelerindeki aktif metabolitlerin kararsız bir serbest radikali kararlı bir radikale dönüştürme yeteneği, antioksidan potansiyeli olarak adlandırılır. Özellikle ekstrelerdeki fenolik madde miktarı antioksidan aktivitesini de etkilemektedir. Likenlerin de, yüksek antioksidan göstermesinin sebebi sahip oldukları yüksek fenolik madde içeriği ile genellikle doğru orantılıdır [55].

Ekstrelerin toplam fenol ve toplam flavonoit miktarları spektrofotometrik yöntemlerle ölçülerek belirlenmiştir. Ekstrelerin toplam fenol miktarları $76,51 \pm 0,71 - 144,69 \pm 1,62$ mg_{GAE}/g_{ekstre} arasında, toplam flavonoit miktarları $13,23 \pm 0,58 - 20,40 \pm 0,59$ mg_{CA}/g_{ekstre} arasında bulunmuştur (Tablo 4.2).

Bu çalışmada tüm ekstreler arasında toplam fenol içeriği yüksekten düşüğe *R. digitellata* ($144,69 \pm 1,62$ mg_{GAE}/g_{ekstre}), *R. fastigiata* ($139,92 \pm 23,04$ mg_{GAE}/g_{ekstre}), *R. polymorpha* ($76,66 \pm 3,22$ mg_{GAE}/g_{ekstre}) ve *R. fraxinea* ($76,51 \pm 0,71$ mg_{GAE}/g_{ekstre}) şeklindedir.

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları açısından yüksekten düşüğe sıralaması ise *R. fastigiata* ($20,40 \pm 0,59$ mg_{CA}/g_{ekstre}), *R. fraxinea* ($17,14 \pm 0,27$ mg_{CA}/g_{ekstre}), *R. digitellata* ($14,82 \pm 0,19$ mg_{CA}/g_{ekstre}) ve *R. polymorpha* ($13,23 \pm 0,58$ mg_{CA}/g_{ekstre}) şeklindedir.

Antioksidan ölçüm yöntemlerinden en çok kullanılanlardan biri ABTS⁺• / TEAC yöntemidir [169]. Deney, hem lipofilik hem de hidrofilik bileşenlere uygulanabilir.

Trolox, E vitamininin suda çözünür asitidir ve referans standardı olarak kullanılır. ABTS⁺• deneyinde ekstrelerin ve standartların radikal süpürücü etkisi, 0,5; 1 ve 2 mg / mL'lik üç farklı konsantrasyonda incelenmiştir. ABTS⁺• radikali süpürücü aktivite deneyinde tüm konsantrasyonlar incelendiğinde *R. fraxinea* en aktif tür olarak belirlenmiştir. Deneylerde konsantrasyon miktarına bağlı olarak antioksidan aktivitelerinin de arttığı görülmektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'ye göre ekstreler yüksek antioksidan etki gösterememiştir.

Oran ve ark. (2012)'nın, *R. farinacea* ve *R. fastigiata*'nın da aralarında olduğu altı liken türünün metanol ve aseton ekstreleri ile yaptıkları çalışmada toplam fenol içeriği ve ABTS metodu ile antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre *R. fastigiata*'nın metanol ekstresinin 154,3±0,2 mg troloks/10g değeri ile en yüksek antioksidan aktivite sergilediği bildirilmiştir [50]. Çalışmamızda ise *R. fastigiata*'nın metanol ekstresinin TEAC değeri 1mg/mL konsantrasyonda 1,74±0,41 mmol/L/Trolox olarak bulunmuştur. Sonuçlar karşılaştırıldığında *R. fastigiata*'nın antioksidan etkinliğinin bizim çalışmamızda da yüksek olduğu görülmektedir. Fenol içerikleri bakımından karşılaştırıldıklarında ise Oran ve ark.'nın çalışmasında *R. fastigiata* metanol ekstresinin toplam fenolik içerik değeri 65,9±2,4 mg gallik asit/10 g iken bizim çalışmamızda aynı tür için bu değer 139,92 ± 23,04 mg_{GAE}/g_{ekstre} olarak bulunmuştur.

Aoussar ve ark. (2020)'nın, *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf, *Evernia prunastri* (L.) Ach. and *Ramalina farinacea* (L.) Ach. likenleri üzerinde yaptıkları çalışmaya göre tür çeşitliliğinin yanı sıra çevresel koşullar ve likenlerin toplandığı mevsimlerinde toplam fenol içeriğini ve antioksidan kapasiteyi etkilediği belirtilmiştir [57].

Şahin ve ark. (2015)'nin *R. fastigiata*, *R. farinacea* ve *R. fraxinea*'nın çeşitli çözücüler ile hazırlanan ekstrelerinin toplam fenol içerikleri ile antioksidan aktiviteleri üzerine yaptıkları çalışmaya göre *R. fastigiata*'nın metanol ekstresi en yüksek toplam fenol içeriğine (428,3 ± 13,6 mg GAE 100/g) sahip olduğu ve 439,3 ± 3,3 mg TE 100/g değeri ile en yüksek ABTS radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [44]. Ancak çalışmanın tamamı dikkate alındığında *Ramalina* ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri ile toplam fenol içerikleri arasında korelasyon bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda ise *R. fastigiata* toplam fenol içeriği ve ABTS

radikali süpürücü aktivitesi ile çalışılan türler arasında ikinci sırada bulunmuştur. Aynı çalışmada Şahin ve ark'ları *R. fraxinea*'nın metanol ekstrelerinin toplam fenol içeriği için $130,3 \pm 0,9$ mg GAE 100/g fenol ve ABTS radikali süpürücü aktivite için $212,1 \pm 1,2$ mg TE 100/g değerlerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise aynı türün toplam fenol içeriği $76,51 \pm 0,9$ mg_{GAE}/g_{ekstre} ve TEAC değeri $2,24 \pm 0,25$ mmol/L/Trolox/ 1mg bulunarak en yüksek antioksidan etkiye sahip tür olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde toplam fenol içeriği ve ABTS radikali süpürücü aktivite arasında bir korelasyon görülmemiştir. Şahin ve ark. göre; liken metabolitlerindeki fenolik grupların antioksidan etkilerden sorumlu anahtar bir faktör olarak kabul edilebileceği ancak farklı sekonder metabolitlerin birbirleri ile etkileşimlerinin antagonistik ve sinerjistik etkileri de olabileceği belirtilmiştir [44].

DPPH• radikali süpürme yöntemi, ekstrelerin serbest radikal temizleme etkisinin değerlendirilmesi için hızlı bir yöntemdir. *Ramalina* türlerinin DPPH• radikali süpürücü etkisi incelendiğinde, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL ve 0,5 mg/mL konsantrasyonda *R. fraxinea* için sırasıyla % $18,01 \pm 6,34$, % $31,74 \pm 5,31$ ve % $47,77 \pm 6,89$ inhibisyon değerleri bulunmuş ve en aktif tür olarak tespit edilmiştir. 2 mg/mL konsantrasyonda *R. digitellata* % $66,53 \pm 2,51$, 4 mg/mL de ise *R. polymorpha* % $67,93 \pm 4,31$ ve *R. fraxinea* % $67,06 \pm 3,03$ inhibisyon yeteneği göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'ye göre ekstreler daha düşük aktivite sergilemiştir.

Güllüce ve ark. (2006)'nın, *R. polymorpha*'yı da içeren 5 liken üzerine yaptıkları antimikrobiyal ve antioksidan çalışmada, likenlerin metanol ekstreleri ile çalışılmıştır. Antioksidan aktivite DPPH ve linoleik asit oksidasyon yöntemleri ile çalışılmış ancak her iki yöntemde de *R. polymorpha*'da her hangi bir aktivite bulunmamıştır [47]. Bizim çalışmamızda ise 0,5-4 mg/mL konsantrasyon aralığında *R. polymorpha* konsantrasyona bağlı aktivite sergilemiştir.

Soundararajan ve ark (2019)'nın *R. fastigiata*'nın aseton ekstresi üzerine yaptıkları DPPH deneyi ile antioksidan aktivite çalışmalarına göre, *R. fastigiata*'nın aseton ekstresi, 20-100 µg/mL konsantrasyon aralığında % 41.84 ile % 61.93 arasında % inhibisyon göstermiştir [46]. Bizim çalışmamızda *R. fastigiata*'nın metanol ekstresi % 13,77 ile % 62,82 aralığında inhibisyon göstermiştir. Doza bağlı etki artışı gözlenmiş

ancak ekstrelerin farklı yöntemlerle hazırlanmış olmaları nedeniyle iki çalışma arasında aktivite sonuçlarında farklılık tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde likenler için antibiyotik etkinliğin genellikle usnik asitten kaynaklandığı bildirilmiştir. Antimikrobiyal ajan olan usnik asit, Gram (-) bakterilere ve mikobakterilere karşı aktiviteye sahiptir. İnsan ve bitki patojenlerine karşı antimikrobiyal aktiviteye ek olarak, usnik asitin antiprotozoal, antiproliferatif, anti-enflamatuvar, analjezik ve antiviral aktivite sergilediği belirtilmiştir [40].

Antimikrobiyal çalışmamızda test edilen *Ramalina* türlerinin ekstreleri için en yüksek aktivite *R. digitellata*'nın (12.5 mm) inhibisyon çapı ile Gr (-) bakteri olan *P.mirabilis* bakteri suşu üzerinde gözlemlenmiştir. Gr (+) bakterilerden ise *S. aureus* üzerine 7.0 mm'lik inhibisyon çapı gözlenmiştir. *R. digitellata*'nın antimikrobiyal aktivitesi ilk kez bu çalışma ile aydınlatılmıştır.

Cansaran ve ark.(2007)'nın bazı *Ramalina* türleri üzerinde yaptıkları çalışmada usnik asitin YBSK analizi ile miktar tayini ve antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışılan türlerin içerdiği usnik asit ile antibakteriyal etkilerinin ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışılan *Ramalina* türleri arasında *R. fastigiata*'nın aseton ekstresinin en yüksek usnik asit miktarına sahip olup, en yüksek antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Tüm ekstrelerinin *Bacillus subtilis*'i inhibe ettiğini görmüşlerdir. Ancak hiçbir liken ekstresi *S. aureus*'u inhibe etmemiştir [48].

Bizim çalışmamızda da usnik asit miktarı en yüksek olan *R. digitellata*'da en yüksek antibakteriyal etki gözlenmiştir. Sonuçlarımız literatürle uyumludur.

Soundararajan ve ark. (2019)'nın, *R. fastigiata*'nın *in vitro* antimikrobiyal ve antioksidan potansiyelini değerlendirdiği çalışmada *R. fastigiata*'nın aseton ekstresi 75µl/mL'de *S.aureus*, *E.coli*, *P.vulgaris*, *K.pneumonia* ve *Candida albicans*'a karşı bir inhibisyon göstermemiş ancak *Candida krusei*'ye karşı inhibe edici yetenek sergilemiştir [139]. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da *Candida albicans*'a karşı hiçbir liken ekstresinde inhibisyon gözlenmemiştir. *R. fastigiata*'nın metanol ekstresinde *S. aureus*'a karşı 7.0 mm'lik inhibisyon zonu gözlenmiştir.

R. digitellata, *R. fastigiata*, *R. polymorpha*, *R. fraxinea* örneklerinin DNA koruyucu aktivitelerinin belirlenmesinde plazmit DNA(pBR322) kullanılmıştır. pBR322 form I, form II ve form III olmak üzere üç farklı formda bulunmaktadır. Süpercoil yapıyı form I, açık halkasal yapıyı form II temsil eder. Form III ise sadece plazmit DNA da çift zincirin kırılması sonucunda ortaya çıkan doğrusal yapıdaki plazmit DNA ya verilen isimdir. H₂O₂ varlığında DNA'nın UV ışınlarına maruz kalması süper kıvrımlı halkasal DNA'nın kırılmalar ve doğrusal DNA zincirde bir ya da daha fazla kırık meydana gelmekte yoğunluk ve ilerleyiş değişmektedir [170]. Bizim yapmış olduğumuz DNA koruyucu aktivite belirlenmesinde elde ettiğimiz sonuç (Şekil 4.7) belirtilmiştir. pPBR322 DNA UV ve H₂O₂ ile muamele edilmiş DNA'da Form II ve Form I'in hareketi ve yoğunluğunda değişiklikler olduğu gözlenmiş, form I yapısının konsantrasyonu azalmış form II yapısının yoğunluğunda artış belirlenmiş, kırılmalara bağlı olarak form III yapısı açığa çıkmıştır. Liken ekstreleri ile etkileşim sonucunda ise kontrol grubunda olduğu gibi UV ve H₂O₂'nin neden olmuş olduğu hasar ortadan kalkmıştır. Bu yöntemle göre, *R. polymorpha* örneği hariç diğer liken ekstrelerinin UV ve H₂O₂ ye karşı DNA koruyucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Ramalina* türlerinin içerdikleri sekonder metabolitler ayrı ayrı değerlendirilerek belirlenmesi durumunda bu metabolitler endüstriyel ürün olarak, ilaç ve kozmetik sanayinde değerlendirilebilir.

Çalışılan liken ekstrelerinin sitotoksik aktivitelerinin sonuçları, test edilen hücre hatları ile ilgili değerler Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da özetlenmiştir. A549 hücre hattında *R. fastigiata* ekstresi 250 µg/mL'de % 41,96 canlılık seviyesi ile sitotoksik etki göstermiş olup aynı konsantrasyonda diğer türlerde toksik etki görülmemiştir. 500 µg/mL'de *R. polymorpha* dışında diğer liken türleri canlılığı % 50'nin altına düşürmüştür. 1000 µg/mL'de ise toksisite sıralaması, *R. digitellata* (% 21,16) > *R. fastigiata* (% 22,65) > *R. polymorpha* (% 23,85) > *R. fraxinea* (% 29,64) olarak tespit edilmiştir. *Ramalina* türlerinin 1000 µg/mL'deki A549 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etki sıralaması *R. digitellata*, *R. fastigiata*, *R. polymorpha* ve *R. fraxinea* olarak usnik asit içeriği ile yüksek korelasyonda bulunmuştur ($y = -0,0057x + 29,885$; $r^2 = 0,9693$).

MDA-MB-231 hücre hattına karşı çalışılan liken ekstrelerinin sitotoksik aktivitelerinin sonuçları, test edilen hücre hatları ile ilgili değerler Tablo 4.9'da

özetlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında en yüksek toksisite *R. fastigiata* ekstresinde 62,5 µg/mL’de % 52,52 değeri ile belirlenmiş olup aynı konsantrasyonda diğer türlerde benzer toksik etki görülmemiştir. 125 µg/mL’de *R. fraxinea* dışında diğer liken türleri canlılığı % 50’nin altına düşürmüşlerdir. 250 µg/mL’de ise tüm liken türleri sitotoksik etki göstermiştir. 1000 µg/mL konsantrasyonda toksisite sıralaması *R. fastigiata* (% 4,05), *R. digitellata* (% 4,13), *R. polymorpha* (% 5,28) ve *R. fraxinea* (% 7,35) olarak tespit edilmiştir.

Ramalina türlerinin 1000 µg/mL’deki A549 ve MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında türlerin iki kanser üzerine de etkili olduğu ancak MDA-MB-231 üzerine sitotoksik etkilerinin çok daha fazla olduğu bulunmuştur. *R. fraxinea*’nın iki kanser türü üzerine etkisi de diğer çalışılan *Ramalina* liken türleriyle karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Aynı doğrultuda *R. fraxinea*’nın toplam fenol ve usnik asit miktarları da diğer türlere göre en düşük düzeydedir. Ancak ABTS ve DPPH metotlarının kullanıldığı antioksidan aktivitede ise en güçlü inhibisyon değerlerini göstermiştir. Deney verilerimize göre *R. fraxinea*’nın aktiviteden sorumlu bileşiğinin usnik asit olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tatipamula ve Vedula (2018)’nin *R. leiodea*’nın da olduğu iki tür likenin çeşitli çözücülerde anti-inflamatuar ve sitotoksik aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada düşük hücre toksisitesine rağmen kloroform, etil asetat ve aseton ekstrelerinin MCF-7 (meme kanseri), HeLa (Serviks kanseri), DLD-1 (Kolon kanseri), FADU (Baş ve Boyun kanseri) ve A549 kanser hücre hatlarına karşı aktif oldukları bildirilmiştir. Aseton ekstresinin meme kanseri hücre hattına karşı daha aktifken kloroform ekstresinin kolon kanseri hücre hattına karşı aktif olduğu ayrıca, etil asetat ekstresinin serviks kanseri hücre hattına güçlü inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir [58].

Kanser çağımızın önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. Bu sebeple kanser üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artmakta, etkili tedavi arayışları sürmektedir. Etkili tedavinin yanı sıra temel hedef yan etkiyi azaltma arayışıdır. Kanserinin sebep olduğu tehdidi azaltmaya yönelik çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bunlardan belki de en eskisi bitkisel ilaçlardır. Doğanın sunduğu biyolojik çeşitlilik göz önüne alındığında, içerik analizleri ile belirlenecek çeşitli kimyasalları keşfetmek kanser tedavileri için yeni fırsatlara sebep olabilir. Likenlerin yıllardır halk ilaçlarına katkı olarak kullanıldığı

bilinmektedir. Birçok kültürde de geleneksel tıbbı ilave olarak hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılmıştır [4, 34]. Literatür çalışmalarında genel olarak bitkisel kaynaklı ürünlerin içerik analizleri ve biyolojik aktivitelere yönelik çalışmalar yapılmasına rağmen likenleri konu alan biyolojik aktivite çalışmaları oldukça azdır. Çalışmamızda usnik asit miktarı ile aktivite deneyleri arasında korelasyon olup olmadığı araştırılmış sadece A549 hücre hattında sitotoksik aktivite ile pozitif bir korelasyon bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında sitotoksik etki, antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivite arasında bir doğrusallık saptanmamıştır. Aktiviteden sadece usnik asitin sorumlu olmadığı aynı zamanda *Ramalina* türlerinin içerdiği diğer sekonder metabolitlerin de aktiviteye katkı sağladığı yorumlanmıştır. Çalışmamız kapsamında *Ramalina* türlerinin MDA-MB-231 hücre hattına daha güçlü toksisite gösterdiği tespit edilmiş daha ayrıntılı çalışmalarla bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Ramalina liken türleri üzerine literatürde birçok çalışma olmasına karşın [8, 44-58] *R. digitellata* ‘nın biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan çalışma literatürde mevcut değildir ve bu çalışmada bu türe ait usnik asit ve toplam fenol miktarı aynı zamanda antioksidan, antimikrobiyal ve akciğer ve meme kanser hatları üzerine gösterdiği sitotoksik aktivite tarafımızca ilk defa araştırılmış olup literature katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Bates, S.T., et al., Bacterial Communities Associated With The Lichen Symbiosis, Applied and Environmental Microbiology, 77(4), 1309–1314, 2011.
2. Selbmann, L., et al., Culturable Bacteria Associated With Antarctic Lichens, Affiliation And Psychrotolerance, Polar Biology, 33, 71–83, 2010.
3. Parrot, D., et al., Review Lichen Associated Bacteria As A Hot Spot Of Chemodiversity, Focus On Uncialamycin, A Promising Compound For Future Medicinal Applications, Planta Medica, 82, 1143–1152, 2016.
4. Saygıdeğer, S., Tohumusuz Bitkiler II, Çukurova Üniversitesi Yayınları no:213, Adana, 1999.
5. Nash, TH., Lichen Biology, Cambridge University Press, New York, 2008.
6. Cavalier-Smith, T., A Rrevised Six-Kingdom System of Life, Systema Naturae, 73, 203-266, 1998.
7. Denton, G.H., Karlen, W., Lichenometry: Its Application to Holocene Moraine Studies in Southern Alaska And Swedish Lapland, Artic Alpine Res., 5, 347-372, 1973
8. Moreira A.S.N., et al., Chemistry And Biological Activity of *Ramalina* Lichenized Fungi, Molecules, 20(5), 8952-8987, CrossRef PMid:2599620, 2015
9. Upreti, D.K., Chatterjee, S., Significance of Lichens And Their Secondary Metabolites, A Review, Fungi, 2, 169-188, 2007.
10. Kosanić, M., et al., *Evernia punastri* And *Pseudoevernia furfuraceae* Lichens And Their Major Metabolites as Antioxidant, Antimicrobial And Anticancer Agents, Food and Chemical Toxicology, 53, 112-18, 2013.
11. Shukla, V., Joshi, G.P., Rawat, M.S.M., Lichens As a Potential Natural Source of Bioactive Compounds A Review, Phytochemistry Reviews 9, 303–314, 2010.
12. <https://www.antioksidan.info/serbest-radikaller/serbestradikaller/> serbesradikal (Erişim tarihi: 10.05.2020)
13. Rijhwani, N., Bharty, R., *In vitro* Antioxidant Activity And Total Phenolic Content of Leaf Extracts of *Dalbergia sissoo* (Roxb.), International Research Journal of Pharmacy, 7(8), 16-21, 2016.

14. Kosanić, M., Ranković, B., Lichen Secondary Metabolites as Potential Antibiotic Agents, In, Ranković, B., Editor, Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential, Springer International Publishing, 2015.
15. Taylor, T.N., et al., The Oldest Fossil Lichen, *Nature*, 378-244, 1995.
16. Henderson, D., Prentice, H., Contributions to The Bryophyte Flora of Turkey, VIII. *Edinb Roy Bot Gard Notes*, 1969.
17. Molnar, K., Farkas, E., Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review, *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 65, 157-173, 2010.
18. Karamanoğlu, K., Türkiye'nin önemli liken türleri, *AÜ Ecz. Fak. Mec.*, 1, 53-75, 1971.
19. Dayan, F.E., Romagni, J.G., Lichens As A Potential Source of Pesticides, *Pestic Outlook*, 12, 229-232, 2001.
20. Chapman, A.D., Numbers of living species in Australia and the World 2nd Edition. Australian Biological Resources Study (ABRS). Canberra, 80 p, 2009.
21. Rashmi, S., Rajkumar, H.G., Preliminary Phytochemical Screening of Different Solvent Extracts of Lichens from Kodagu District, Karnataka, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4), 209-212, 2014.
22. Wiedmann, N.D., et al., Physiological Life History Strategies of Photobionts of Lichen Species from Antarctic and Moderate European Habitats in Response to Stressful Conditions, *Polar Biology*, 42, 395–405, 2019.
23. Ahmadjian, V.H., Lichens Are More Important Than You Think, *Bioscience*, 45, 123-124, 1995.
24. Hale, M.E., Growth, In the Lichens, Academic Press, New York and London, 1973.
25. Ahmadjian, V., Hale, M.E., The Lichens, Academic Press, New York, 1973.
26. Altuner, Z., Sistematiik Botanik-2, Aktif Yayınevi, 194 s, Tokat, 2004.
27. Ahmadjian, V., The Lichen Symbiosis, New York, Wiley, 1-264, 1993.
28. Yavuz, M., Özyiğitoğlu, G., Tıp Tarihinde Likenlerle İlgili Terimler, *Avrasya Terim Dergisi*, 3(1), 1-9, 2015.
29. Hale, M.E., The Biology of Lichens, Edward Arnold, London, 1983.

30. Wörgötter, S. E., Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes, *Natural Product Reports*, 25, 188-200, 2008.
31. Mitrović, T., et al., Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species, *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5428-48, 2011.
32. Devaraja, G., Swamy, C.T., Lichens: A Novel and Potential Source as Antimicrobials for Human Use, *Journal of Phytological Research*, 4(1), 38-43, 2012.
33. Souri, E., et al., Screening of Thirteen Medicinal Plant Extracts for Antioxidant Activity, *Iranian Journal Pharmaceutical Research* 7, 149–154, 2008.
34. Paudel, B., et al., Antioxidant Activity of Polar Lichens from King George Island (Antarctica), *Polar Biology*, 31, 605–608, 2008.
35. Kumar, J., et al., Antioxidant Capacities, Phenolic Profile and Cytotoxic Effects of Saxicolous Lichens from Trans-Himalayan Cold Desert of Ladakh. *PLoS One* 9(6), e98696. doi:10.1371/journal.pone.0098696, 2014.
36. Sangameswaran, B., et al., *In vitro* Antioxidant Activity of Roots of *Thespesia lampas* Dalz and Gips, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22, 368–372, 2009.
37. Rankovic, B., Misic, M., Sukdolak, S., Evaluation of Antimicrobial Activity of the Lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa* and *Umbilicaria cylindrica*, *Microbiology*, 76(6), 723-727, 2007.
38. Vasudeo, P., Zambare & Lew P. C., Biopharmaceutical Potential of Lichens, *Pharmaceutical Biology*, 50(6), 778-798, 2012.
39. Singh, N., et al., Usnic Acid Inhibits and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human LungCcarcinoma A549 Cells, *Nutrition Cancer*, 65, 36–43, 2013.
40. Ingondolfsdottir, K., Usnic Acid, *Phytochemistry*, 61, 729-736, 2002.
41. Kristmundsdottir, T., et al., Solubilization of The Lichen Metabolite (+) –Usnic Acid for Testing in Tissue Culture, *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 54, 1447-1452, 2002.
42. Russo, A., et al., Pannarin Inhibits Cell Growth and Induces Cell Death in Human Prostate Carcinoma DU-145 Cells. *Anticancer Drugs*, 17, 1163-1169, 2006.

43. Russo, A., et al., Lichen Metabolites Prevent UV Light and Nitric Oxide-Mediated Plasmid DNA Damage and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cells, *Life Sciences* , 83, 468-474, 2008.
44. Şahin, S., et al., *Ramalina* Lichens and Their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agent, *Journal of Food Biochemistry*, 39(4), 471-477, 2015.
45. Shivanna, R., Parizadeh, H., Garampalli, RH., Screening of Lichen Extracts for *In vitro* Antidiabetic Activity Using Alpha Amylase Inhibitory Assay, *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 6(5), 364-367, 2015.
46. Soundararajan, S., et al., *In vitro* Study on Screening Antimicrobial and Antioxidant Potential of *Ramalina fastigiata* *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(1), 216-219, 2019.
47. Güllüce, M., ve ark., Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of The Lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*, *Phytomedicine*, 13, 515–521, 2006.
48. Cansaran, D., ve ark., HPLC Analysis of Usnic Acid in Some *Ramalina* Species From Anatolia and Investigation of Their Antimicrobial Activities, *Pharmaceutical Biology*, 45(1), 77-81, 2007.
49. Çobanoğlu, G., ve ark., Evaluation of The Antimicrobial Properties of Some Lichens, *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment* 1 (2), 153 – 158, 2010.
50. Oran, S., ve ark., Bazı Dalsı ve Yapraksı Liken Türlerinde Toplam Fenol ve Antioksidan Kapasite Tayini, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 03–07 Eylül 2012.
51. Sesal, C., ve ark., *In Vitro* Antimicrobial Potentials of Four *Ramalina* Lichen Species from Turkey, *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 6(3), 202–209, Doi 10.5943/cream/6/3/8, 2016.
52. Güneş Yücel, D., Özyiğitoğlu, G., *Ramalina calicaris* (L.) Fr. Liken Türünün Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitesi Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 3, 269-275, 2018.

53. Stanly, C., et al., Comparative Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Species from Malaysia. *Journal of Pharmacy Research*, 4, 2824–2827, 2011.
54. Sundararaj, J. P., *In vitro* Assessment of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Different Solvent Extracts from Lichen *Ramalina nervulosa*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(8), 200-204, 2015.
55. Ganesan, A., et al., Metabolite Profiling And *In vitro* Assessment of Antimicrobial And Antioxidant Activities of Lichen *Ramalina inflata*, *International Research Journal of Pharmacy*, 7 (12), 132-138, 2017.
56. Zrnzevic, I., et al., *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. Acetone Extract: HPLC Analysis, Genotoxicity, Cholinesterase, Antioxidant and Antibacterial Activity, *EXCLI Journal*, 16, 679, 2017.
57. Aoussar N., et al., Seasonal Variation of Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Morocco, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19, 1–6, 2020.
58. Tatipamula, V.B., Vedula, G.S., *In vitro* Anti- Inflammatory and Cytotoxicity Studies of Two Mangrove Associated Lichens, *Dirinaria consimilis* and *Ramalina leiodea* Extracts, *Hygeia Journal for Drugs and Medicines*, 10 (1), 16-26, 2018.
59. Nash III TH. *Lichen Biology*, Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
60. Tutel, B., *Liken Biyolojisi ve Faydaları*, Marmara Üniversitesi Eczacılık Dergisi, 2 (2), 185-194, 1986.
61. Hawksworth, D. L., Lichens As A Litmus for Air Pollution: A Historical Review, *International Journal of Environmental Studies*, 1, 281–296, 1971.
62. Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P. A., *Monitoring with Lichens*, *Nato Science Series IV: Earth and Environmental Sciences* 7. Dordrecht, Kluwer Academic, 2002.
63. Garty, J., *Biomonitoring Atmospheric Heavy Metals with Lichens: Theory and Application*, *Critical Reviews in Plant Sciences* 20(4), 309–371, 2001.
64. Loppi, S., et al., Accumulation of Heavy Metals in Epiphytic Lichens Near Municipal Solid Waste Incinerator (Central Italy), *Environmental Monitoring and Assessment* 61 (3), 361–371, 2000.

65. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24, 2001.
66. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Review Article, Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease, The Biochemical Journal, 219, 1–4, 1984.
67. Watson, R.R., Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation, Academic, London, 2014.
68. Sawa, T., et al., Alkylperoxyl Radical-Scavenging Activity of Various Flavonoids and Other Phenolic Compounds: Implications for The Anti-Tumor-Promoter Effect of Vegetables, Journal of Agricultural and Food Chemistry 47(2), 397–402, 1999.
69. Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition, 18(10), 872–879, 2002.
70. Halliwell, B., Antioxidants in Human Health and Disease, Annual Reviews of Nutrition, 16, 33-50, 1996.
71. Squadriato, G.L., Pelor, W.A., Oxidative Chemistry of Nitric Oxide: The Roles of Superoxide, Peroxynitrite, and Carbon Dioxide, Free Radical Biology and Medicine, 25, 392–403, 1998.
72. Young, I. S., and Woodside,, J. V., Antioxidants in Health and Disease, Journal of Clinical Pathology, 54: 176-186, 2001.
73. Droge, W., Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function (Review), Physiol Reviews, 82, 47–95, 2002.
74. Faujan, N.H., et al., Antioxidant Activity of Plants Methanolic Extracts Containing Phenolic Compounds, African Journal of Biotechnology, 8(3), 484–489, 2009.
75. Southorn, P.A., Powis, G., Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease, Mayo Clinic Proceedings, 63, 390-408, 1988.
76. Akkuş, İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
77. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Oxford University Pres. Inc., New York, 936s, 1999.
78. Song, O., Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality?, Comptes Rendus Biologies, 327, 649-662, 2004.

79. Kaur, C., Kapoor, H.C., Antioxidants in Fruits and Vegetables-The Millennium's Health, *International Journal Food Science Technology*, 36(7), 703-725, 2001.
80. Drew, B., Leeuwenburgh, C., Aging and The Role of Reactive Nitrogen Species, *Annals of The New York Academy Science*, 959(1), 66-81, 2002.
81. Salman, K. A., Ashraf, S., Reactive Oxygen Species: A Link Between Chronic Inflammation and Cancer, *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 21(2), 42-49, 2013.
82. Bolisetty, S., Jaimes, E. A., Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology, *International Journal of Molecular Science*, 14(3), 6306-6344, 2013.
83. Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L., Oxygen toxicity: Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4), 186-190, 2010.
84. Fantel, A.G., Reactive Oxygen Species in Developmental Toxicity: Review and Hypothesis, *Teratology*, 53, 96–217, 1996.
85. Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th Edition, Oxford, Oxford University Press, 2007.
86. Cheeseman K.H., Slater, T.F., An introduction to Free Radical Biochemistry, *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493, 1993.
87. Halliwell, B., Drug Antioxidant Effects, *Drugs*, 42(4), 569 – 605, 1991.
88. Hazra B, et al., Comparative Study of The Antioxidant and Reactive Oxygen Species Scavenging Properties in The Extracts of The Fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Embllica officinalis*, *BMC Complementary Altern Med*, 10, 20, 2010.
89. Diplock, A.T., Antioxidant Nutrients and Disease Prevention: An Overview, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53 (1), 1895-1935, 1991.
90. Deaton, C.M., and Marlin, D.J., Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clinical Techniques Equine Practice*, 2(3), 278-291, 2003.
91. Halliwell, B., Antioxidants and Human Disease, A General Introduction, *Nutrition Reviews*, 55(1), 44 -9, 1997.
92. Davis, K.J., Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals, I.General Aspects, *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (20), 9895–9901, 1987.

- 93.** McCord, J.M., The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress, *The American Journal of Medicine*, 108(8), 652-659, 2000.
- 94.** Agrawal, A., Gupta, S., Sharma, R. K., Role of Oxidative Stress in Female Reproduction, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(3), 28-27, 2005.
- 95.** Betteridge, D.J., What is Oxidative Stress?, *Metabolism* 49, 3–8, 2000.
- 96.** Lobo, V., et al., Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health, *Pharmacogn Rev* 4, 118–126, 2010.
- 97.** Sachindra, N.M., et al., Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Extracts from Indian Seaweeds, *Journal of Food Science Technology* 47, 94–99, 2010.
- 98.** Rao, A. L., Bharani, M., Pallavi, V., Role of Antioxidants and Free Radicals in Health and Disease, *Advances in Pharmacology and Toxicology*, 7(16), 29-38, 2006.
- 99.** Elliot, J.G., Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages, *Food Technology*, 53(2), 46-48, 1999.
- 100.** Ou, B., et al., Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122-3128, 2002.
- 101.** Diplock, A., Healty Lifestyles Nutrition and Physical Activity: Antioxidant Nutrients, *ILSI Europe Concise Monograph Series*, 59 p., Belgium, 1998.
- 102.** Vinson, J.A., Oxidative Stress in Cataracts, *Pathophysiology*, 13, 151-162, 2006.
- 103.** Yalçın, A.S., Antioksidanlar, *Klinik Gelişim*, 11, 342-346, 1998.
- 104.** Berger, M. M., Can Oxidative Damage be Treated Nutritionally?, *Clinical Nutrition*, 24(2), 172-183, 2005.
- 105.** Fukai, T., et al., Extracellular Superoxide Dismutase and Cardiovascular Disease, *Cardiovascular Research*, 55(2), 239-249, 2002.
- 106.** Chandel, N.S., Budinger, G.R.S., The Cellular Basis for Diverse Responses to Oxygen. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(2), 165-174, 2007.
- 107.** Valko, M, et al., Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1), 44-84, 2007.

108. Aydın, A., Sayal, A. ve Işimer, A., Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı, No:20, 2001.
109. Seufi, A.M., et al., Preventive Effect of The Flavonoid, Quercetin, on Hepatic Cancer in Rats Via Oxidant/Antioxidant Activity: Molecular and Histological Evidences, Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 28 (1), 80, 2009.
110. Singh, R.P., Sharad, S., Kapur, S., Free Radicals and Oxidative Stress Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants, Journal Indian Academy of Clinical Medicine, 5 (3), 218-225, 2004.
111. Ersöz, B., Menteş, G., Harper'in Biyokimyası, Barış Kitabevi, 1993.
112. Bendich, A., et al., The Antioxidant Role of Vitamin C, Advances in Free Radical Biology and Medicine, 2(2), 419–444, 1986.
113. Lunec, J., Blake, D., Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. In: Cohen R.D., Lewis, B., Albert, K.G.M.M., The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease, Balliere Tindall, London, 189-212, 1990.
114. Andersson, D.I., Hughes D., Evolution of Antibiotic Resistance at Non-Lethal Drug Concentrations, Drug Resistance Updates, 15(3), 162–72, 2012.
115. Boucher, H.W., et al., Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America, Clinical Infectious Diseases 48(1), 1–12, 2009.
116. Leeb, M., Antibiotics, A Shot in the Arm, Nature, 431(7011), 892–3, 2004.
117. Newman, D.J., Cragg, G.M., Natural Products as Sources of New Drugs Over the Last 25 years, Journal of Natural Products, 70(3), 461–77, 2007.
118. Stoll, A., Brack, A., Renz, J., The Effect of Lichenic Substances on the *Tubercle bacillus* and Certain Other Microorganisms, Seventh Article on Antibacterial Substances, Schweiz Z Pathol Bakteriöl, 13,729–751, 1950.
119. Samaranayake, L.P., Johnson, N.W., Guidelines for The Use of Antimicrobial Agents to Minimise Development of Resistance, International Dental Journal, 49(4), 189-95, 1999.
120. Goodman, L.S., Gilman A.G., Gilman, A., Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, New York, Macmillan, 1980.

121. Khardori, N., Antibiotics-Past, Present, and Future, Medical Clinics of North America, 90(6), 1049-76, 2006.
122. Aktuğlu, Y., Giriş ve Genel Bilgiler Pratikte Antibiyotik Kullanımı, Sempozyum Dizisi Yayın No: 1, 11-53, 1997.
123. Tabak, F., Pratikte Antibiyotik Kullanımı Simpozyumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, 81-90, Mayıs 2 – 3, 1997.
124. Cheesman, M.J., et al., Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts / Compounds With Conventional Antibiotics the Solution? Pharmacognosy Reviews, 11, 57-72, 2017.
125. Öztürk, R., Pratikte Antibiyotik Kullanımı Simpozyumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, 27-51, Mayıs, 2 – 3.
126. Öztürk, R., Antibiyotik Direnci: Antibiyotik Çağı'nın Sonu mu? Sağlık Düşüncesi ve Tıp Kültürü Dergisi, Mart-Nisan-Mayıs 38, 70-73, 2016.
127. Abbasoğlu, U., Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri, FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 22, 111-118, 1996.
128. http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Antibiyotik%20Duyarlılık%20Testi.pdf (Erişim tarihi:10.05.2020)
129. <https://www.klimik.org.tr/wpcontent/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf> (Erişim tarihi:10.05.2020).
130. Kulaksız, G., Sancar, A., Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser, Türk Biyokimya Dergisi, 32 (3), 104-111, 2007.
131. Sancar, A., et al., Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and The Damage Checkpoints, Annual Reviews Biochemistry, 73, 39-85, 2004.
132. Tepe, B., ve ark., Determination of Chemical Profile, Antioxidant, DNA Damage Protection and Antiamoebic Activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*, Fitoterapia, 82 (2), 237-246, 2011.
133. Gutteridge, J.M.C., Lipid Peroxidation Initiated by Superoxide Dependent Hydroxyl Radicals Using Complexed Iron and Hydrogen Peroxide, FEBS Letters, 172, 245-9, 1984.
134. Pentland, A.P., Free Radicals in Diagnostic Medicine. Edited by D. Armstrong, Plenum Press, New York, 1994.

135. Rancan, F., et al., Protection Against UVB Irradiation by Natural Filters Extracted From Lichens, *Journal of Photochemistry and Photobiology, B, Biology*, 68 (2–3), 133–139, 2002.
136. Gennari, C., Castoldi, D., Sharon, O., Product With Taxol-Like Tumor Activity: Approaches to Eleutherobin and Dicytostatin, *Pure and Applied Chemistry*, 79, 173–80, 2007.
137. Knudson, A.G., Two Genetic Hits (More or Less) to Cancer, *Nature Reviews Cancer*, 1, 157–162, 2001
138. Irigaray, P., Newby, J.A., Clapp, R., Lifestyle-Related Factors and Environmental Agents Causing Cancer: An Overview, *Biomed Pharmacother*, 61, 640–58, 2007.
139. Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Kunnumakara, A., Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes, *Pharmaceutical Research*, 25, 2097–116, 2008.
140. Mondal, S., et al., Natural Products: Promising Resources for Cancer Drug Discovery, *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12 (1), 49–75, 2012.
141. Cragg, G.M., Newman, D.J., Plant as Source of Anticancer Agents, *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 72–9, 2005.
142. Cardarelli, M.A., et al., Antimitotic Effects of Usnic Acid on Different Biological Systems, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, 667–672, 1997.
143. McGahan, A., et al., The End of The (Cell) Line: Methods for The Study of Apoptosis *in vitro*, *Methods in Cell Biology, Cell Death, Academic Pres*, 4, 150–181, 133, 1995.
144. Roehm, N. W., et al., An improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT, *Journal of Immunological Methods*, 142(2), 257–265, 1991.
145. Yavuz, M., Bazı Liken Cins (Genus) İsimlerinin Etimolojisi Üzerine, *Avrasya Terim Dergisi*, 4(2), 18 – 26, 2016.
146. Rowe, J.G., Egea, J.M., Liqueenes Silicicolas De Sierra Morena, *Acta Botánica Malacitana*, 12, 59–66, 1987.
147. Purvis, O. W., et al., *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland*, London, Natural History Museum Publications, 2002.

148. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFD5EDD58C62859A98>). Erişim tarihi 10.05.2020
149. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFE9C66FF13E126BBA>). Erişim tarihi 10.05.2020
150. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF31A7A9B636A9F752>). Erişim tarihi 10.05.2020
151. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF20FF3F96B01BD67B>). Erişim tarihi 10.05.2020
152. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFC9F96F26F37523FA>). Erişim tarihi 10.05.2020
153. Uludağ Altun, H., Sancak, B., *Staphylococcus aureus*'un Tedavisinde Yeni Antibiyotikler Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 40(2), 63 – 74, 2010.
154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2486/> Erişim tarihi:10.05.2020
155. Biswas, S.K., et al., *Curcumin induces* Glutathione Biosynthesis and Inhibits NF-kappaB Activation and Interleukin-8 Release in Alveolar Epithelial Cells: Mechanism of Free Radical Scavenging Activity, *Antioxid Redox Signal*, 7(1–2), 32–41, 2005.
156. Hamid, A.A., et al., Antioxidants: Its Medicinal and Pharmacological Applications, *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), 142–151, 2010.
157. Sikora, E., Cieslik, E., Topolska, K., The Sources of Natural Antioxidants, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* ,7(1), 5–17, 2008.
158. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=6b9bcd96-d7d4-48a1-9838-58dbfb0e57d0&lang=en> (Erişim tarihi: 10.05.2020)
159. Gardes, M., Bruns, T. D., ITS Primers with Enhanced Specificity For Basidiomycetes - Application to The Identification of Mycorrhizae and Rusts, *Molecular Ecology*, 2, 113–118, 1993.
160. White, T. J., et al., Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, USA, 315–322, 1990.

161. Oh., S., et al., A Note on The Lichen Genus *Ramalina* (Ramalinaceae, Ascomycota) in the Hengduan Mountains in China, *Mycobiology*, 42(3), 229-240, 2014.
162. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventó S, R.M., Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods Enzymol*, 299, 152-178, 1999.
163. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals, *Food Chemistry*, 64, 555–559, 1999.
164. Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y., Free-Radical Scavenging Action of Medicinal Herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on Experimentally-Induced Liver Injuries, *General Pharmacology*, 32, 661-667, 1999.
165. Re, R., et al., Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.
166. Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival, Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63, 1983.
167. Deniot, F., Lang, R., Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival Modification to The Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability, *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-277, 1986.
168. Carmichael, J., et al., Evaluation of A Tetrazolium-Based Semiautomated Colorimetric Assay, Assessment of Chemosensitivity Testing, *Cancer Research*, 47, 936-942, 1987.
169. Okan, O.T., ve ark., Antioxidant Analysis Methods and Some Non Wood Forest Plant Products As Sources of Antioxidants in Eastern Black Sea Region, *Kastamonu University Journal For Faculty*, 13, 48-59, 2013.
170. Korkmaz, İ.,A., Bazı Liken Türlerinin (*Bryoria fuscescens* (Gyeln.) Brodo and *D. Hawksw*, *Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Hale, *Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr.) Mineral Madde İçeriği ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye 23-27 Haziran 2014.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ankara’da doğan Serpil KILIÇ YAYLA, ilk, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Aydınlikevler İlkokulu, Mehmet Akif Ersoy Ortaokulu ve Eryaman Lisesinde tamamlamıştır. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanmış ve 2003 yılında başarıyla tamamlayıp mezun olmuştur.

2010 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesinde Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifika Programını tamamlayıp 2011 yılında Biyoloji Öğretmeni ünvanına hak kazanmıştır.

2018 yılında Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Zekiye KOCAKAYA danışmanlığında başladığı yüksek lisans eğitimini 2020’ de başarıyla tamamlamıştır.

2013 yılından beri Milli Eğitim Bakanlığı’nda Biyoloji Öğretmeni olarak görev yapmakta olup evli ve bir çocuk annesidir.

İletişim Bilgileri

Adres: Öveçler Mah. Kabil Cad. 1335. Sk. No:39 / 17

Çankaya / ANKARA

Telefon: 0531 992 93 99

E-posta: yayla.serpil@hotmail.com