

**İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE AFLATOKSİN B₁'İN
NEDEN OLDUĞU GENOTOKSİK VE BİYOKİMYASAL
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE BAZI LİKEN METANOL
EKSTRAKTLARININ ANTAGONİSTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Elif KOTAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr.Güleray AĞAR
2010
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE AFLATOKSİN B₁'İN
NEDEN OLDUĞU GENOTOKSİK VE BİYOKİMYASAL
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE BAZI LİKEN METANOL
EKSTRAKTLARININ ANTAGONİSTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Elif KOTAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2010
Her Hakkı Saklıdır**

Doç. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Elif KOTAN tarafından hazırlanan bu çalışma 30/ 06/ 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

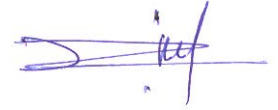
Başkan : Doç. Dr. Güleray AĞAR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Ali ASLAN

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(imza)

Prof.Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE AFLATOKSİN B₁ 'İN NEDEN OLDUĞU GENOTOKSİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE BAZI LİKEN, METANOL EKSTRAKTLARININ ANTAGONİSTİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Elif KOTAN

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Güleray AĞAR

Bu çalışmada, insan lenfosit kültürlerinde aflatoksin B₁'in (AFB₁) kardeş kromatid değişimi(KKD), Mikronükleus(MN) ve biyokimyasal parametrelerdeki meydana getirdiği değişiklikler ve bu değişikliklere karşı 7 liken türü ekstratlarının antagonistik etkisi araştırılmıştır. AFB₁ her iki konsantrasyonunda insan lenfosit kültürlerinde KKD ve MN frekansı önemli derecede artırdığı gözlenmiştir. AFB₁ ile birlikte 7 liken türü metanol ekstratlarının verildiği iki farklı konsantrasyonu verilen gruplar AFB₁ ile karşılaştırıldığında da KKD ve MN frekansında önemli derecede azalma görülmüştür. En etkili *Cetraria islandica*, *Rhizoplaca chrysoleuca*, *Usnea longissima* ve *Umbilicaria vellea* likenlerinin olduğu, KKD frekansının azaltılmasında likenlerin etki sırasının *Cetraria islandica* > *Rhizoplaca chrysoleuca* > *Usnea longissima* > *Umbilicaria vellea* > *Parmelia somloensis* > *Cladonia rangiformis* > *Lecanora muralis* şeklinde olduğu tespit edildi.

Bu çalışmanın biyokimyasal sonuçlarında ise AFB₁'in önemli derecede süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini azaltıp, malondialdehit (MDA) seviyesini artırdığı ortaya konulmuştur. AFB₁ ile birlikte liken ekstratlarının verilmesi ile SOD ve GPx miktarı aktivitesini artırırken, MDA miktarını azaltmıştır. Sonuç olarak liken ekstratlarının reaktif oksijen türlerinin salınımını sağlayan AFB₁'e karşı koruyucu etki yaptığı tespit edilmiştir.

2010, 126 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B₁, Oksidatif stres, Kardeş kromatid değişimi, Mikronükleus ve Liken

ABSTRACT

Master

THE GENOTOXIC AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF AFLATOXIN B₁ ON HUMAN LYMPHOCYTE CULTURES AND THE ANTAGONISTIC EFFECTS OF SOME LICHENS METHANOL EXTRACT

ELİF KOTAN

Ataturk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Güleray AGAR

In this study, we researched the antagonistic effects of some lichens against aflatoxin B₁ (AFB₁) to induce sister-chromatid exchange (SCE), micronucleus (MN) and changes in biochemical parameters on human lymphocyte cultures. The results showed that the frequency of SCEs on human lymphocyte cultures was significantly increased by the mutagen AFB₁ (5 µM, 10 µM). There was a significant decrease in the SCE frequency in AFB₁-treated group compared with the groups receiving AFB₁ and also different two concentration of lichens. The most effective of the lichens were *Cetraria islandica*, *Rhizoplaca chrysoleuca*, *Usnea longissima* ve *Umbilicaria vellea*. The order of the decreasing effect of the SCE frequency of lichens was: *Cetraria islandica* > *Rhizoplaca chrysoleuca* > *Usnea longissima* > *Umbilicaria vellea* > *Parmelia somloensis* > *Cladonia rangiformis* > *Lecanora muralis*

The biochemical results of this experiment reveal that AFB₁ significantly decreased the activities of SOD and GPx, and increased the level of MDA. Simultaneous supplementation with lichens restored these parameters to that of normal ranges.. In conclusion, lichens exhibited protective effects on human lymphocytes exposed to AFB₁ by inhibiting AFB₁-induced ROS generation.

2010, 126 pages

Keywords: Aflatoxin B₁, Oxidative stress, Sister chromatid exchange, Micronucleus, lichens

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde ve Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bu tez konusunu çalışmamı sağlayan, çalışmalarım ve tezin hazırlanışında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Güleray AĞAR'a ve Sayın Doç. Dr. Abdulgani TATAR'a en içten teşekkürlerimi arz ederim.

Tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim ve biyokimyasal analizlerin yapılmasında yardımda bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Lokman ALPSOY'a, liken teminini sağlayan Sayın Doç Dr. Ali ASLAN'a, Moleküler Biyoloji ve Tıbbi Genetik Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamızı destekleyen Atatürk Üniversitesi BAP (2009-85) Saymanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca kendilerinden görmüş olduğum destekten ve güvenden dolayı aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Elif KOTAN

Haziran 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	9
2.1. Aflatoksinler.....	9
2.1.1. Aflatoksinlerin özellikleri, çeşitleri ve ilk bulunması	9
2.1.2. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı.....	10
2.1.3. Aflatoksinlerin konsantrasyonunun azaltılması	15
2.1.4. Aflatoksinlerin canlılar üzerine etkileri	15
2.2. Likenler	23
2.3. Kardeş Kromatid Değişimi	28
2.3.1. KKD Yöntemini Etkileyen Faktörler	29
2.3.2. KKD'nin oluş mekanizmaları	30
2.4. Mikronükleus (MN)	35
2.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	39
2.5.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$).....	42
2.5.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	43
2.5.3. Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)	43
2.5.4. Singlet oksijen (1O_2).....	45
2.5.5. Peroksil ($ROO^{\bullet}$) ve alkoksil ($RO^{\bullet}$) radikalleri	45
2.6. Antioksidanlar	45
2.6.1. Enzimatik antioksidanlar.....	48
2.6.1.a.Süperoksit dismutaz (SOD).....	48
2.6.1.b.Glutatyon peroksidaz (GPx).....	49
2.6.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar	50

2.6.2.a. Glutasyon (GSH)	50
3. MATERYAL ve YÖNTEM	53
3.1. Deney Bitkilerinin Temini ve Teşhisi	53
3.2. Bitki Türlerinin Ekstraksiyonu ve Etken Maddelerin İzolasyonu	53
3.3. KKD Analizi	54
3.3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	54
3.3.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	54
3.3.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	55
3.3.4. Donör seçimi	57
3.3.5. Deney düzeneğinin oluşturulması.....	57
3.3.6. Lenfosit kültürü.....	57
3.3.7. Floresan plus giemsa tekniği ile boyama	58
3.3.8. KKD sayımı	59
3.4. MN Analizi	60
3.4.1. Kullanılan kimyasal maddeler	60
3.4.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	60
3.4.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	61
3.4.4. Donör seçimi	62
3.4.5. Deney düzeneğinin oluşturulması.....	62
3.4.6. Lenfosit kültürü.....	62
3.4.7. Giemsa ile boyama.....	63
3.5. SOD, GPx, MDA Ölçümü	64
3.5.1. Superoksit dismutaz (SOD) ölçümü	64
3.5.2. Glutasyon peroksidaz (GP _x) ölçümü.....	64
3.5.3. Malondialdehit (MDA) ölçümü	65
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	66
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	67
4.1. KKD Bulguları	67
4.2. MN Bulguları	79
4.2. SOD, GPx ve MDA Sonuçları	84
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	101
5.1. Öneriler	110

KAYNAKLAR	111
ÖZGEÇMİŞ	124

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ , B _{2A} , G _{2A} , P ₁ ve Q ₁ 'in yapısı	11
Şekil 2.2. Aflatoksinlerin sentez basamakları	14
Şekil 2.3. AFB ₁ 'in farklı metabolitlere dönüştürülmesi.....	18
Şekil 2.4. AFB ₁ -N7-Guanil kompleksi	19
Şekil 2.5. AFB ₁ 'in biyoaktivasyonu ve DNA ile etkileşimleri	21
Şekil 2.6. Memeli hücrelerinde meydana gelen hasarların onarım mekanizması.....	22
Şekil 2.7. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması.....	32
Şekil 2.8. Oksidatif stres seviyesinin hücrelerde meydana getirdiği etkiler	40
Şekil 2.9. ROT ve antioksidanlar	46
Şekil 3.1. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterleri	59
Şekil 4.1. Donörlara ait elde edilen metafaz alanında 11 adet KKD değişimi	68
Şekil 4.2. Donörlara ait elde edilen metafaz alanında 14 adet KKD değişimi	68
Şekil 4.3. Donörlara ait elde edilen metafaz alanında 9 adet KKD değişimi.....	69
Şekil 4.4. Donörlara ait elde edilen metafaz alanında 14 adet KKD değişimi	69
Şekil 4.5. KDD üzerine AFB ₁ ve <i>Cetraria islandica</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , <i>Lecanora muralis</i> ve <i>Parmelia somloensis</i> türlerinin metanol Ekstraktlarının etkisi	77
Şekil 4.6. KDD üzerine AFB ₁ ve <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> , <i>Umbilicaria vellea</i> ve <i>Usnea longissima</i> türlerinin metanol ekstratlarının etkisi.....	78
Şekil 4.7. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre	79
Şekil 4.8. Sitokinezi bolke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre.....	79
Şekil 4.9. Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre.....	80
Şekil 4.10. MN üzerine AFB ₁ ve <i>Cetraria islandica</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , <i>Lecanora muralis</i> ve <i>Parmelia somloensis</i> türlerinin metanol Ekstraktlarının etkisi	82
Şekil 4.11. MN üzerine AFB ₁ ve <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> , <i>Umbilicaria vellea</i> ve <i>Usnea longissima</i> türlerinin metanol ekstratlarının etkisi	83

Şekil 4.12. AFB ₁ ile <i>Cetraria islandica</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , <i>Lecanora muralis</i> ve <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> türlerinin SOD aktivitesi üzerine etkileri	95
Şekil 4.13. AFB ₁ ile <i>Parmelia somloensis</i> , <i>Umbilicaria vellea</i> ve <i>Usnea</i> <i>Longissima</i> türlerinin SOD aktivitesi üzerine etkileri.....	96
Şekil 4.14. AFB ₁ ile <i>Cetraria islandica</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , <i>Lecanora muralis</i> ve <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> türlerinin MDA aktivitesi üzerine etkileri.....	97
Şekil 4.15. AFB ₁ ile <i>Parmelia somloensis</i> , <i>Umbilicaria vellea</i> ve <i>Usnea</i> <i>Longissima</i> türlerinin MDA aktivitesi üzerie etkileri	98
Şekil 4.16. AFB ₁ ile <i>Cetraria islandica</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , <i>Lecanora muralis</i> ve <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> GP _x aktivitesi üzerine etkileri.....	99
Şekil 4.17. AFB ₁ ile <i>Parmelia somloensis</i> , <i>Umbilicaria vellea</i> ve <i>Usnea</i> <i>Longissima</i> türlerinin GP _x aktivitesi üzerine etkileri.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Aflatoksinlerin formül ve özelliklerini gösteren çizelge	13
Çizelge 2.2. Papas (1999)'a göre ROT nin oluşumu	41
Çizelge 4.1. <i>Cladonia rangiformis</i> metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ve MN Frekansları.....	70
Çizelge 4.2. <i>Cetraria islandica</i> metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ve MN Frekansları.....	71
Çizelge 4.3. <i>Lecanora muralis</i> metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ve MN Frekansları.....	72
Çizelge 4.4. <i>Parmelia somloensis</i> metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ve MN Frekansları.....	73
Çizelge 4.5. <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ve MN Frekansları.....	74
Çizelge 4.6. <i>Umbilicaria vellea</i> metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ve MN Frekansları.....	75
Çizelge 4.7. <i>Usnea longissima</i> metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ve MN Frekansları.....	76
Çizelge 4.8. AFB ₁ ve <i>Cetraria islandica</i> Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri	88
Çizelge 4.9. AFB ₁ ve <i>Cladonia rangiformis</i> Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri	89
Çizelge 4.10. AFB ₁ ve <i>Lecanora muralis</i> Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri	90
Çizelge 4.11. AFB ₁ ve <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri.....	91
Çizelge 4.12. AFB ₁ ve <i>Umbilicaria vellea</i> Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri.....	92
Çizelge 4.13. AFB ₁ ve <i>Usnea longissima</i> Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri.....	93

Çizelge 4.14. AFB ₁ ve <i>Parmelia somloensis</i> Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri.....	94
---	----

1.GİRİŞ

Dünya nüfusunun her geçen gün hızla artması, bilim çevrelerini düşündüren çeşitli sorunları beraberinde getirmektedir. Bunların başında şüphesiz beslenme sorunu gelmektedir. Artan nüfusa karşılık azalan tarım alanları, bilim adamlarını yeni teknikler ve kaynaklar aramaya zorlamaktadır. Dünya da gıda yetersizliği nedeniyle birçok ülkede insanların açlıktan ölmesi yanında gıda zehirlenmeleri nedeniyle de önemli sorunlar ortaya çıkmaktadır. İnsan beslenmesinde kullanılan gıda maddeleri ile yem ve yem maddeleri üretim-tüketim zincirinin herhangi bir aşamasında uygun olmayan koşullarda depolandıklarında mantarlar üreyerek onlarda istenmeyen değişikliklere ve bozulmalara yol açmaktadırlar (Erdem ve Özen 1990).

İnsanlar ilk çağlardan beri bazı küflerden yiyeceklerini olgunlaştırmada yararlanmışlardır. Mantarlar besin olarak tüketildiği gibi, aynı zamanda alkol (mayalardan), antibiyotik (örneğin Penicilin antibiyotiği *Penicillium chrysogenum* türünden), yağ (*Penicillium* türlerinden), vitamin (mayalardan), enzim, ilaç ve peynir üretiminde de çok sık kullanılmaktadırlar (Algur 1992). Mantarların bu faydaları yanında zararları da vardır. Mantarlar, özellikle de küfler, deri, ağaç, kumaşların küflenmesine, tarımda ürün kaybına yol açmaktadırlar. İnsanlar dahil çeşitli canlılar üzerinde yaşadıklarında onların hastalanmalarına, hatta ölümlerine neden olmaktadır.

Tarımsal ürünler ve gıdalarda yaygın olarak zararlara yol açan küf cinslerinin *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Pithomyces*, *Phoma*, *Myrothecium*, *Phomopsis* ve *Diplodia* olduğu bilinmektedir (Sharby 1977).

Mantarların oluşturduğu toksinlere mikotoksin adı verilir. Mikotoksinler oluşturduğu küfe ve ilk kez belirlendiği ürüne göre isimlendirilirler. Günümüze kadar varlığı ortaya konan mantar türlerinden 250 kadarının mikotoksin oluşturduğu ve bunlarda 20 kadarının insan ve hayvanlarda zehirlenmeye neden olduğu bilinmektedir (Erdem ve Özen 1990). 1930–1940’lı yıllarda keşfedilen mikotoksinler, mantarların insan ve

hayvanlarda hastalık oluşturan ve antijenik özellik göstermeyen sekonder metabolitleridir. Mikotoksinler, esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Karotenoidler, alkaloidler, siklopeptitler ve kumarinler olarak sınıflandırılan mikotoksinler, kimyasal yapı bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler. Mikotoksinlerin en toksik olanı aflatoksinlerdir (Wyllie and Morehouse 1977).

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*'un bazı suşları, *Aspergillus parasiticus*'un ise hemen hemen bütün suşları tarafından üretilmektedir (Scott 1978; Bullerman 1979). Ancak 1987 yılında *A. flavus*'a fenotipik olarak benzeyen *Aspergillus nomius* (Betina 1989) ve son olarak *Aspergillus pseudotamarii* olarak isimlendirilen türünde (Ito *et al.* 2001) aflatoksin ürettiği belirlenmiştir.

Aflatoksinler bakterilerde, kültüre edilmiş insan hücreleri ve deney hayvanlarında genetik hasarlara neden olurlar. Gen mutasyonları, Mikronukleus (MN), Kardeş Kromatid Değişimi (KKD = Sister Chromatid Exchange = SCE), Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormallikleri (KA = Chromosomal Aberration) üzerine etkileri vardır (Agar ve Alpsoy 2005; Geyikoğlu ve Türkez 2006; Alpsoy vd 2009). Özellikle insanlarda karaciğer kanserine neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Aflatoksin B₁'in (AFB₁) en büyük hedef organı karaciğerdir. Bununla birlikte akciğerler, böbrekler ve kalınbarsak üzerinde de etkisi vardır (Wang and Groopman 1999).

Aflatoksin B₁ (AFB₁) neden olduğu hücresel hasarın tam olarak mekanizması açık olmamasına rağmen, iki farklı mekanizma ile etkili olduğu düşünülmektedir.

1-DNA'daki Guanin bazının N-7 bölgesine bağlanarak mutajenik etki gösterirler. 2-AFB₁ reaktif oksijen türlerinin (ROT=reaktive oksijen species=ROS) içinde bulunduğu serbest oksijen türlerinin salınımını uyarak hücrelerde hasara neden olurlar. Ayrıca aflatoksinlerin serbest oksijen radikallerinin seviyesinde artmaya neden olduğu için

lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı olarak da lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarını artırdığı da bilinmektedir (Shen *et al.* 1994; Lee *et al.* 2005). Etlik piliçlerde aflatoksin kullanımına bağlı olarak eritrosit süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi azalırken, MDA seviyesinde artma gözlenmiştir (Eraslan vd 2005).

Aflatoksinlerin de salınımına neden oldukları serbest radikallerin en önemli hasarları membran lipidleri, DNA ve proteinlere verdikleri hasarlardır.

Serbest radikallerin nukleusta ve DNA'daki etkileri genotoksik ve mutajeniktir. Serbest radikaller pürin ve pirimidin modifikasyonuna veya DNA iplikleri ve kromozom kırılmalarına, onkojen aktivasyonuna neden oldukları için karsinogenezi önemli rol oynarlar (Seven ve Candan 1995; Barrington *et al.* 1996).

Serbest radikaller nükleik asit ve baz modifikasyonlarına bağlı olarak, nokta mutasyonları ve DNA zincir kırılmalarına neden olabilirler. DNA hasarına yol açan hidroksil radikallerinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksitin geçiş metalleriyle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (Bukan 1999). Geçiş metalleri ve serbest radikallerin etkisiyle DNA'da oluşan majör oksidatif etkiler sarmal açılmaları, depürinasyon, çapraz bağlanma ve baz modifikasyonları olarak bilinmektedirler. Özellikle baz modifikasyonlarından timin bazı, timin glikol ve 5-hidroksimetil urasile, guanin bazı da 8-hidroksiguanine (8-OH-Gua) dönüşür (Kasprzak 2002). *İn vivo* çalışmalarda ROT'nin hasarının hassas birer göstergesi olan 8-OH-d Gua (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) ve 8-OH-Gua mutajenik olmaları nedeniyle potansiyel birer kanserojen olduğu gösterilmiştir (Lunec *et al.* 2002). Aflatoksin tüketimi hücrelerde 8-OH-Gua miktarında artışa neden olduğu için, özellikle p53 geninin 249. kodonunda mutajeniteye neden olarak kansere sebep olurlar (Wang and Groopman 1999).

Gerek aflatoksinlerin gerekse diğer mutajen maddelerin mutajenitelerinin tespit edilmesi için geliştirilen testlerden en yaygın olanları KKD, MN analizleridir.

İç veya dış etkenlerin etkisiyle hücre DNA'sındaki değişikliklere bağlı olarak meydana gelen KKD'lerinin oluş mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Perry and Evans 1975). Ancak kolay ve çok hızlı sonuç verdiği için dolayı mutajenite testlerinden en yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesidir. Aflatoksinlerin KKD'ni artırdığı yapılan birçok çalışmada ortaya konulmuştur. İnsan, rat ve fare lenfositlerinde aflatoksinlerin KKD'ni artırdığı belirtilmiştir (Thomson *et al.* 1979; Deng *et al.* 1988; Andrew *et al.* 1997; Geyikoğlu ve Türkez 2006; Alpsoy vd 2009). Çin hamster V79 hücrelerinde aflatoksinlere bağlı olarak KKD oranları çalışılmış, sonuç olarak en toksik olandan en az toksik olana doğru $AFB_1 > AFG_1 > AFG_2 > AFB_2$ olduğu bildirilmiştir (Batt *et al.* 1980).

Son yıllarda aflatoksinlerin toksik, mutagenik ve kanserogenik etkilerinin giderilmesi konusunda çok sayıda çalışma yapıldığı bilinmektedir (Huang *et al.* 1982 Ahmad *et al.* 2002; Siddique *et al.* 2005, Alpsoy vd 2010). Özellikler bazı iz elementlerin, vitaminlerin, yağ asitlerinin, flavonoidlerin ve fenolik asitlerin aflatoksinin bu etkilerini giderebileceği tespit edilmiştir (Avani and Rao 2007; Ahmad *et al.* 2004; Badr *et al.* 1998; Siddique and Afzal 2005).

AFB_1 'in KKD'ni artırmasına karşılık, AFB_1 ile A vitamininin beraber verilmesi aflatoksinin bu etkisini azalttığı tespit edilmiştir (Huang *et al.* 1982, Alpsoy vd 2009). Ayrıca yapılan benzer çalışmalarda KKD'ni artıran arsenik, hidrokortizon ve gama ışınlarının mutajenik etkisinin A vitamini kullanımı ile azaldığı bildirilmiştir (Avani and Rao 2007; Ahmad *et al.* 2004; Badr *et al.* 1998).

En önemli antioksidan vitaminlerden Vitamin C'nin mutajenik etkiye sahip olan hidrokortizon (Ahmad *et al.* 2004; Ahmad *et al.* 2002), mitomisin C (Krishnaja and Sharma 2003), merkurik klorit (MC; $HgCl_2$) (Rao *et al.* 2001), megestrol acetate (Siddique *et al.* 2005) ve klormadinon asetat'ın (CMA) (Siddique and Afzal 2005) neden olduğu KKD üzerindeki etkisini azalttığı gözlenmiştir.

Ayrıca E vitamininin hidrokortizon (Ahmad *et al.* 2002), karbontetraklorit (Sivikova *et al.* 2001) ve aflatoksininin (Chlopkiewicz *et al.* 1991) neden olduğu KKD üzerine olan mutajenik etkisini azalttığı gösterilmiştir.

Vitaminlerin dışında selenyum ve diğer bazı bitkisel ürünlerin de AFB₁'in mutajenik etkisini azalttığına dair çalışmalar mevcuttur. AFB₁'in 1, 5, 10 µM'lık dozlarına karşı sodium selenitenin (Na₂SeO₃) (5x10⁻⁷ ve 1x10⁻⁶M) antagonistik etkisi çalışılmış, AFB₁'in KKD oranını artırdığı, buna karşın AFB₁ ile birlikte Na₂SeO₃ verildiğinde KKD'nin azaldığı belirlenmiştir (Ahmad *et al.* 2004; Geyikoğlu ve Türkez 2006; Agar ve Alpsoy 2005).

Serbest radikaller DNA hasarlarının yanında aminoasitlerin oksidasyonu, peptid bağlarının parçalanması, disülfid bağlarının oluşumu ve çapraz bağlanmalara neden olarak proteinlere de etki ederek, enzimlerin fonksiyonlarının kaybolmasına neden olabilirler (Seven ve Candan 1995).

Serbest radikallerin etkiledikleri diğer bir hücre yapısı da membran lipidleridir. Membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu olan lipid peroksidasyonunu başlatarak onların akışkanlıklarına ve geçirgenliklerine etki ederler. Bu şekilde lipidlerin yapısını da bozarlar (Ottino and Duncan 1997). Serbest radikaller yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipidlerin peroksidasyonuna neden olurlar. Poliansature yağ asitlerinin (PUFA) diğer bir ifade ile doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasarını başlatarak, kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyona dönüşüp geri dönüşümsüz olarak membran hasarlarına neden olurlar (Akkuş 1996). Bu reaksiyon doymamış yağ asitlerinin birinin yapısından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlar. Böylece bu doymamış yağ asidi zinciri bir serbest radikale dönüşür. Lipid radikali moleküler oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksid radikalini (LOO•) oluşturur. LOO• de oksijen radikalleri gibi hücredeki moleküller üzerinde toksik etkiye neden olur. Lipid peroksidasyonu reaksiyonları sonucunda ortaya çıkan aldehitler en toksik olan ürünlerinden biridir. Toksik etkiye sahip olan aldehitlerin protein sentezini inhibe ettikleri bilinmektedir MDA ve 4-

hidroksinoneal (HNA)'de lipid peroksidasyon seviyesini gösteren parametrelerdir (Hubel *et al.* 1989; Seven ve Candan 1995).

Hücre içi antioksidantların en önemlilerinden biri olan SOD, süperoksiti (O_2^-) oksijene (O_2) ve daha az reaktif olan H_2O_2 katalizler. AFB₁ kullanımının hücre içi antioksidanlarından SOD, aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Eraslan vd 2005; Preetha *et al.* 2006). Ayrıca SOD aktivitesini C vitamini (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007), E vitamini (Verma and Nair 2001; Kashif *et al.* 2004; Banudevi *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007) ve A vitamini (Kashif *et al.* 2004) kullanımı artırmaktadır.

GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanlarından biridir. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur (Armstrong 1998). H_2O_2 'i suya çevirerek, methemoglobin oluşumunu engeller (Kalaycıoğlu vd 1998). Yine AFB₁ kullanımı SOD da olduğu gibi GPx aktivitesini de azalttığı gözlenmiştir (Eraslan vd 2005; Preetha *et al.* 2006). Yapılan diğer çalışmalarda oksidatif strese neden olan AFB₁ gibi maddelerin bu etkisinin C vitamini (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007), E vitamini (Verma and Nair 2001; Banudevi *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007) ve A vitamini kullanımı ile azalttığı gözlenmiştir (Vandana *et al.* 2006, Alpsoy vd 2009).

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

Bununla birlikte antimutajenik ve antikarsinojenik özelliğe sahip kimyasal bileşikleri araştırmak ve keşfetmek insanlarda artan kanser riski ve mutasyon oranlarındaki artışın beraberinde getirdiği istenmeyen sonuçlar nedeniyle günümüzde zorunlu hale gelmiştir (Hartman and Shankel 1990).

Likenlerin antimutagenik ve antioksidant özellikleri bilinmektedir (Valentão *et al.* 2001). Ayrıca likenler çeşitli amaçlar için 16. yy'dan itibaren çeşitli hastalıkların tedavisinde infüzyon ve detoksasyon şeklinde kullanılmıştır. Örneğin, halk arasında ciğer likeni olarak bilinen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. Likenin orta çağda Avrupalılar tarafından akciğer hastalıklarının tedavisinde ve yine Kolombiya' da yaşayan Hesquiat halkı tarafından verem hastalığının tedavisinde kullanıldığına dair kayıtlar vardır. Likenlerin bu tedavi edici etkisi, onların stistik asit, giroforik asit ve norstistik asit gibi sekonder metabolitlerine atfedilmekte (Asahina 1967.) ve günümüzde de bu metabolitlerin kullanılması ile artrit, egzema, solunum ve dolaşım yolu hastalıkları tedavi edilebilmektedir (Biswas 1956, Huneck and Yoshimura 1996) Ülkemizde ise yaraların tedavi edilmesinde, kan kesici olarak ve parfümeri sanayiinde fiksator olarak (*Evernia prunastri* (L.) Asch) kullanılmaktadır.

Avrupa ülkelerinde liken metabolitlerinin değişik mikroorganizmalar, mayalar ve algler üzerine antibiyotik etki gösterdiği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Denenen liken örneklerinin %50'sinden fazlasının antibiyotik etki gösterdiği, en etkili maddelerin ise usnik asitler, pulvunik asit türevleri (örneğin vulpinik asit) ve alifatik asitler olduğu ve bu maddelerin de özellikle Gram-pozitif bakterilere ve bazı funguslara antibiyotik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Lauterwein *et al.* 1995). Bunlara ilaveten likenlerin antiherbivorve antitümör aktivite göstermeleri de diğer önemli özelliklerdendir (Huneck 1999).

Çeşitli organizmalarda, oksidanların vücut sistemlerindeki hasarı, yaşla birlikte artmakta ancak antioksidanlar tarafından bu hasar önlenmektedir (Cook and Saman 1996). Likenlerin antioksidan aktiviteye sahip olmaları (Pietta *et al.* 1998) onların besin şeklinde alınmaları halinde ömür uzunluğunu ve antimutagenik aktiviteyi artırabileceğini düşündürmüştür. Bu noktadan hareketle antioksidan aktiviteye sahip olan *L. pulmonaria* likeninin metanol (Lpem), kloroform (Lpek) ve su ekstraktlarının *Drosophila melanogaster*'in ergin bireylerinde ömür uzunluğu üzerine etkileri olduğu belirlenmiştir (Altun vd 2009).

Aflatoksinlerin meydana getirdiği mutagenik, biyokimyasal etkileri ve likenlerin antioksidan ve antimikrobial, antimutagenik etkileri bilinmesine rağmen liken ekstraktları ile aflatoksinler arasındaki antagonistik etki çalışılmamıştır.

Çalışmamızda tüketici dernekleri ve yapılan bilimsel çalışmalarla piyasadaki birçok üründe bulunduğu belirlenen; hepatotoksik, hepatokanserojen, mutagenik ve teratojenik olan AFB₁'in insan lenfosit kültüründe;

1-Mutagenik etkisini mutajenite testlerinden olan genotoksik ve sitotoksik etkinin bir göstergesi olan KKD, Mikronukleus testi ve biyokimyasal parametrelerle (SOD, GPx, GSH ve MDA) belirlemek,

2-AFB₁'in KKD, mikronukleus ve biyokimyasal parametreler üzerine olan bu etkisine karşı farklı dozlarda likenlerin metanol ekstratlarının antagonistik etkiye sahip olup olmadıklarını tespit etmek ve etki derecelerini belirlemek amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Aflatoksinler

2.1.1. Aflatoksinlerin özellikleri, çeşitleri ve ilk bulunması

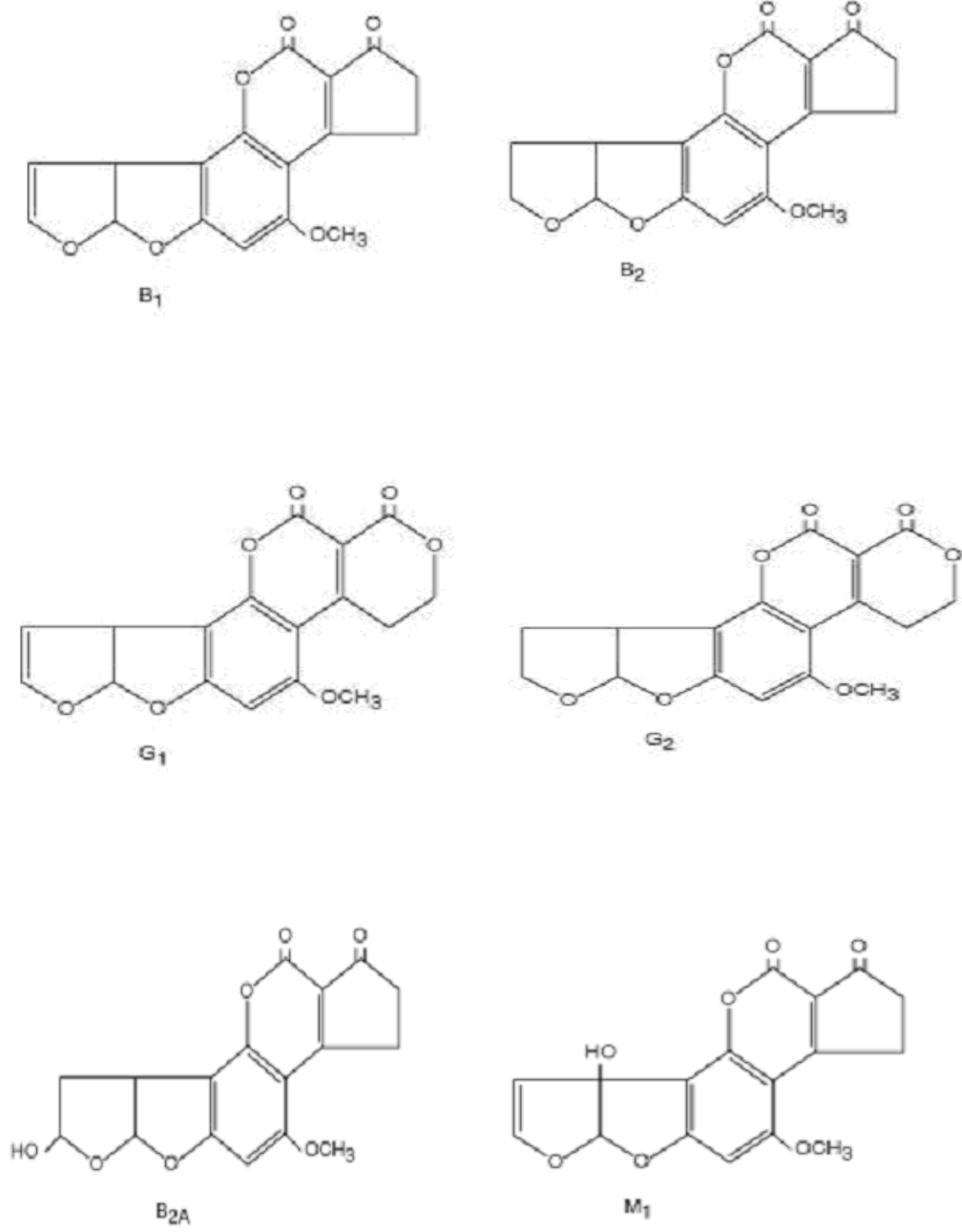
Aflatoksinler yapısal olarak difurokumarinlere benzeyen, başta *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* olmak üzere çeşitli *Aspergillus* türleri ile *Penicillium* (*P. puberulum* gibi) ve *Rhizopus* türü mantarlar tarafından sentez edilen toksinlerdir. Bunlardan *A. flavus* AFB₁ ve AFB₂, *A. parasiticus*'da AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ toksinlerini üretirler. Aflatoksinlere bu isim *Aspergillus* cinsinin “A”sı *flavus*'un “fla”sı alınarak sonuna “toksin” eklenmesiyle oluşturulmuştur. Aflatoksinler ciddi problemlere yol açan kimyasal kanserojenlerdir. Özellikle bu son iki tür dünyanın her yerinde, toprak ve havada yaygın şekilde bulunurlar. Aflatoksin oluşturan mantarlar 12–40°C arasında ve %15'in üzerinde rutubet içeren başta mısır, pamuk tohumu ve yer fıstığı olmak üzere, hemen her çeşit tahıllar, yem ve yem hammaddeleri ile besinlerde kolayca ürerler ve mikotoksin sentezleyebilirler. *A. flavus*, %86–90 nisbi nemde 48 saat içinde önemli ölçüde mikotoksin oluşturur (Nixon *et al.* 1981). Yem ve besinlerle alınan aflatoksinler sindirim kanalından sınırlı ölçüde emilirler. Dolaşıma geçen aflatoksinler başlıca karaciğer ve kaslarda dağılım gösterirler. Vücuda giren aflatoksinin %75'lik kısmı ilk 24 saat içinde dışkı ile %15-20'lik kısmı idrarla ve geri kalanı da değişmemiş ya da metabolitleri halinde sütle atılırken (Kaya vd 1998) %5-6'lık kısmı karaciğerde tutulur. Süt ineklerine 10 gün boyunca %15 oranında aflatoksin içeren yemle uygulanan beslemede, 9. günde yapılan ölçümlerde AFB₁'in %23-67'lik kısmının idrar ve gaita ile %1.35'lik kısmının da sütle atıldığı saptanmıştır (Hoogenboom *et al.* 2001). Aflatoksinli yemlerle beslenen ineklerin süt ve etlerinde, tavukların da yumurtalarında aflatoksine rastlanmıştır. Sütle çıkarılması, et ve süt mamüllerinde bulunması insanlar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Arda 1980). Mikotoksinler, akut toksikozisten uzun süreli kronik sağlık sorunlarına kadar varabilen geniş bir etki spektrumuna sahiptirler. Bazı mikotoksinler insan toksikozlarının esas kaynağını oluşturabilir ki; en basit olarak AFB₁ insan karaciğer karsinojeni olarak bilinir (Coulombe 1993).

Evcil ve deney hayvanlarında aflatoksinlerin zehirliliği hayvanın cinsi, cinsiyeti, ırkı, yaşı, alınan toksinin çeşidi ve miktarı, maruz kalma süresi gibi birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca zehirlilikleri riboflavin ve ışığa maruz kalmakla, vitamin B₁₂, karoten ve protein noksanlıklarında artar. Evcil hayvanlar içerisinde erkekler dişilerden daha duyarlıdır. Kanatlılar içerisinde de aflatoksine en duyarlı olanları ördek ve hindi palazlarıdır (Kaya vd 1998; Arda 1980).

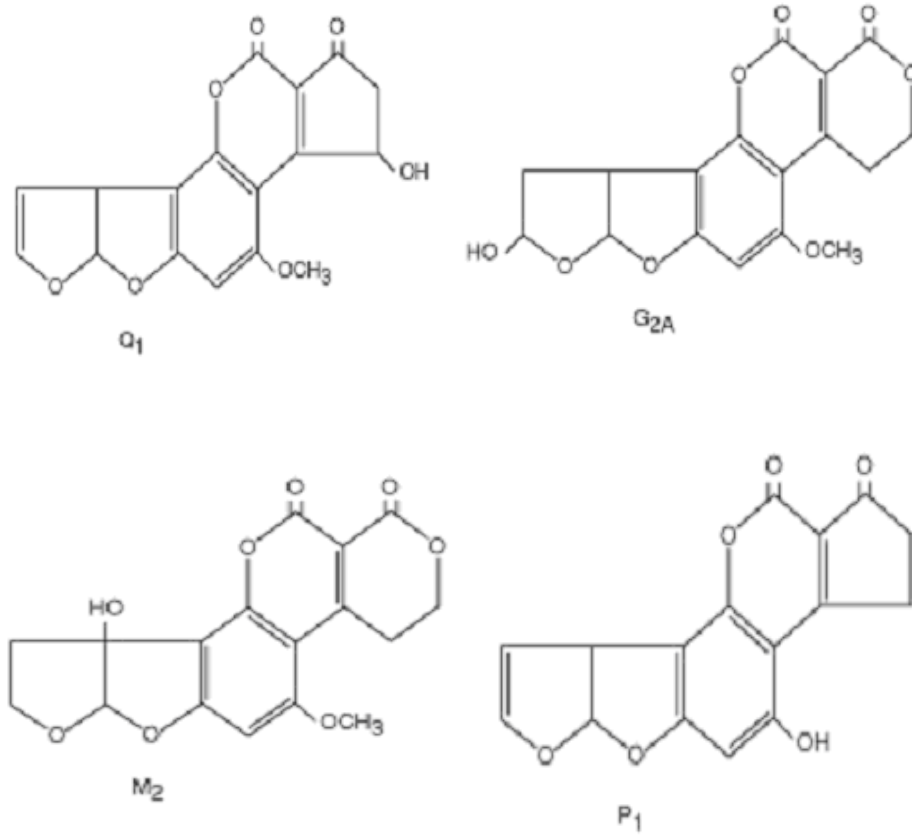
Aflatoksinler içerisinde zehirliliği en güçlü olanı AFB₁'dir. Bunu azalan sırayla AFG₁, AFB₂ ve AFG₂ izler. Hayvanların çoğunda AFB₁'in LD₅₀ değeri 0,5–10 mg/kg arasında değişir (LD₅₀: Aflatoksinin hayvanlara verildiğinde %50 oranında ölüme neden olan dozdur). Ördek, alabalık, kedi, köpek ve hindi gibi hayvanlar en duyarlı; at, sığır, koyun, keçi, rat, kobay ve bıldırcın gibi hayvanlar orta derecede duyarlı; fare ve maymun ise en az derecede duyarlı hayvanlar olarak bilinir (Kaya vd 1998). Üzerinde en çok çalışılmış mikotoksin grubu olan aflatoksinler 1960 yılında keşfedilmiş ve 1962 yılında da güçlü bir “hepatotoksik” ve “hepatokarsinojen” etkisi olduğu anlaşılmıştır (Pohland 1993; Bullerman 1979).

2.1.2. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı

Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmıştır (Betina 1989). Aflatoksinlerin aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B₁ ve B₂ 'nin mavi, aflatoksin G₁ ve G₂ 'nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir (Bullerman 1979; Groopman and Kensler 1988; Özkaya ve Temiz 2003). B toksinleri kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedir (Özkaya ve Temiz 2003) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve B_{2A}, G_{2A} yapısı (Wyllie and Morehouse 1977)



Şekil 2.1. Aflatoksin M₂, G_{2A}, P₁ ve Q₁'in yapısı (Wyllie and Morehouse 1977) (devamı)

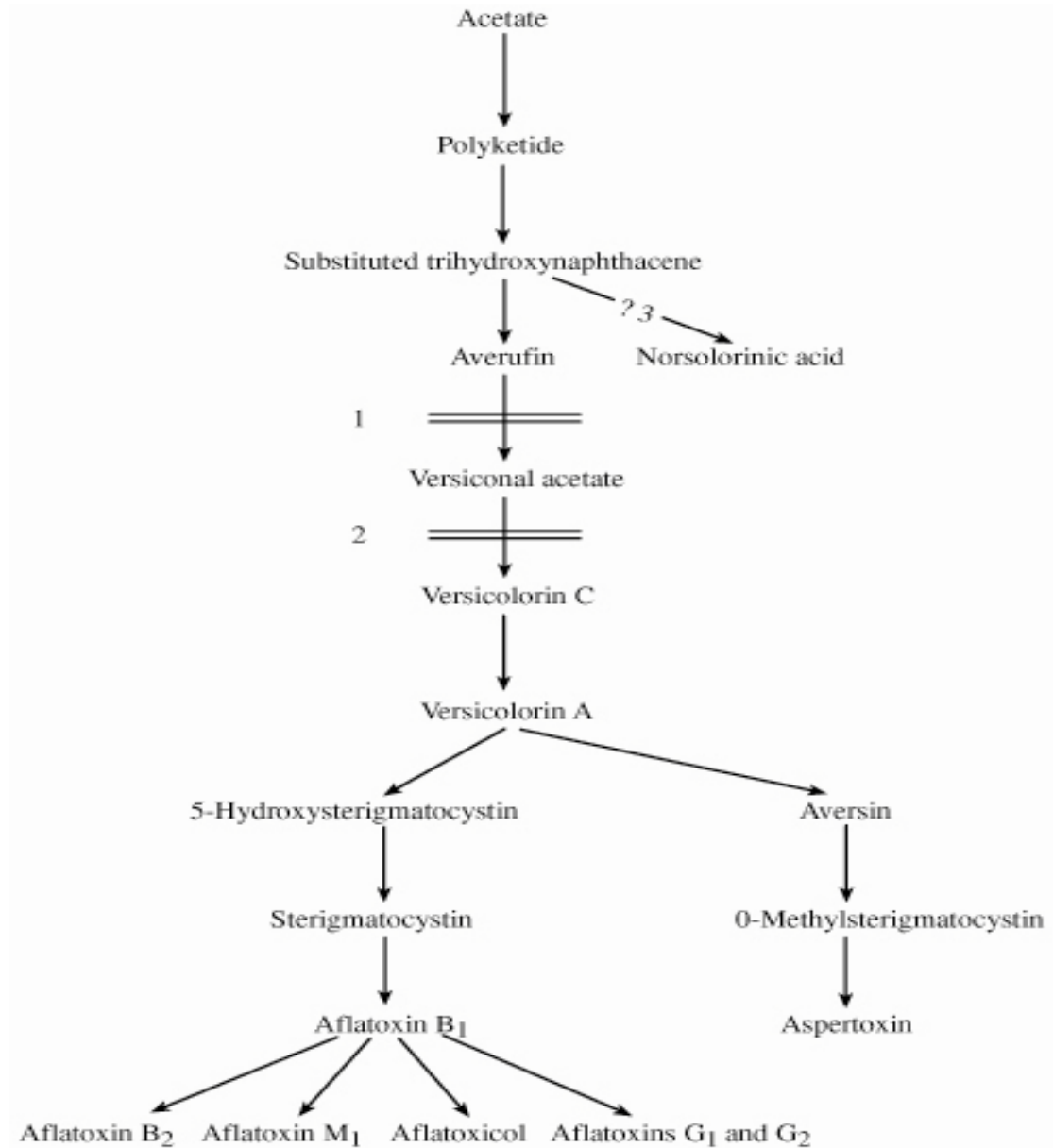
Aflatoksinler, metanol, kloroform ve diğer birçok organik çözücünde çözünmektedir. Ancak sudaki çözünürlükleri azdır (10–30 µg/mL). Toksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B₁ ve B₂ 425 nm de; aflatoksin G₁ ve G₂ ise 450 nm de floresan emisyonu oluştururlar. Aflatoksin çeşitlerinin molekül formülleri, molekül ağırlıkları, erime sıcaklıkları, floresan emisyonları, UV emilimleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde çok karardır, ancak çok düşük veya yüksek pH'larda (3'den az ve 10'dan büyük), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler (Stoloff 1977; Groopman and Kensler 1988).

Çizelge 2.1. Aflatoksinlerin formül ve özelliklerini gösteren çizelge (Wyllie and Morehouse 1977)

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

Toksijenik *A.flavus* kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden AFB₁ ve daha az olarak da AFG₁ sorumludur. Bu durum, her iki toksinin terminal furan halkasının 8, 9 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Groopman and Kensler 1988; Özkaya ve Temiz 2003). Aflatoksin B₂, B₁'in, aflatoksin G₂ de G₁'in dihidro türevleridir (Betina 1989; Özkaya ve Temiz 2003) ve “*in vivo*” koşullarda metabolik olarak B₁ ve G₁'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler (Groopman and Kensler 1988; Özkaya ve Temiz 2003). Bu dört aflatoksin dışında aflatoksin M₁ ve aflatoksin M₂ olarak isimlendirilen önemli iki aflatoksin türevi daha bulunmaktadır. M toksinleri aflatoksinli yemle beslenen laktasyon devresindeki memeli hayvanların sütlerinden ve idrarlarından izole edilmiştir. Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı

altında mavi floresan verirler ve B toksinlerinden daha düşük R_f değerlerine sahip olmalarıyla ayrılırlar (Bullerman 1979; Betina 1989; Özkaya ve Temiz 2003).



Şekil 2.2. Aflatoksinlerin sentez basamakları (Wyllie and Morehouse 1977)

Aflatoksin M₁ ve M₂, aflatoksin B₁ ve B₂'nin hidroksi türevleridir. Aflatoksin M₂ aynı zamanda, dihidro-aflatoksin M₁'dir (Şekil 2.2.). Aflatoksin çeşitlerinin sentez

basamakları Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Aflatoksin B₁ ve G₁’in hemiasetal türevleri olan aflatoksin B_{2a} ve G_{2a} da (Şekil 2.2.), *A. flavus*’un doğal metabolitleri olarak izole edilmişlerdir. Bu türevler, aflatoksin B₁ ve G₁’in asitli ortamda hidrosillenmesi ile elde edilmektedir ve bu özellikten aflatoksin B₁ ve G₁’in doğrulanmasında yararlanılmaktadır (Betina 1989).

2.1.3. Aflatoksinlerin konsantrasyonunun azaltılması

Hayvanların yemlerine karnitin ilavesinin de faydalı olacağı bildirilmektedir. Bu yönde yapılan bir çalışmada, aflatoksinli yemlere karnitin ilavesi ile karaciğerde meydana gelen bozuklukların azaldığı, aflatoksin etkili yağlı karaciğer olgusunun karnitin tarafından engellendiği saptanmıştır (Sachan and Yatim 1992).

Aflatoksin içeren yemlere bağlı olarak safra kanalı hücre hiperplazisi, çekirdek büyümesi, karaciğer hücre büyümesi gibi bozukluklar mangan sülfat ilavesiyle önemli düzeyde engellenmiştir. Ayrıca hayvanlarda aflatoksikozise bağlı olarak şekillenen serum kolesterolü ve karaciğer glikojenindeki artışlar da mangan sülfat ilavesiyle azaltılmıştır (Hastings and Llewellyn 1987).

2.1.4. Aflatoksinlerin canlılar üzerine etkileri

Aflatoksinler, yüksek dozlarda akut, subletal dozlarda ise kronik toksisite göstermektedirler. Düşük dozda sürekli alımları, birçok hayvan denemesinde karsinojen etki ile sonuçlanmıştır. Aflatoksinler içerisinde en yüksek toksisiteyi AFB₁ göstermektedir. Aflatoksinlerden hayvanların birçoğu etkilenmektedir, ancak duyarlılık türden türe değişmektedir ve aynı türün genç olanları yaşlı olanlardan daha duyarlıdır. Ayrıca toksik etki, tüketilme miktarı ve sıklığına, hayvanın cinsine, yaşına, cinsiyetine, sağlık durumuna ve beslenmesine bağlı olarak değişmektedir (Hsieh *et al.* 1977; Bullerman 1979, 1986).

Civciv, piliç ve ördek yavruları en duyarlı olanlardır, bunları sırasıyla hindi yavrusu, sülün palazı, tavuklar ve bıldırcınlar izler. Memeliler arasında ise aflatoksinle etkilenme sırası; 3–12 haftalık domuzlar, hamile domuzlar, yetişkin domuz, sığır ve koyunlar şeklindedir. Alabalıklar ve köpekler de aflatoksine duyarlı hayvanlardır. Alabalıklarda, ppb düzeyindeki çok düşük konsantrasyonda bile karaciğer kanseri etkisi görülmektedir (Bullerman 1979; Smith and Moss 1985).

Aflatoksinler, yüksek dozlarda akut toksisiteye neden olabilirler. Hayvanların çoğunda gözlenen akut aflatoksikozisin klinik bulguları; iştah azalması, ağırlık kaybı, nörolojik anormallikler, mukoz membranlarda sarılık, kasılma ve sonunda ölümdür. Karaciğerde rengin açılması veya tamamen renksizleşme ve yağ birikimi belirgin olarak görülür. Vücut boşluklarında sıvı birikimi ile böbrek ve bağırsaklarda kanama da meydana gelebilir (Bullerman 1979).

Aflatoksinler, subletal dozlarda, kronik etki göstermektedir. Subletal dozlarda aflatoksin uygulanan hayvanlarda, karkasın sararması ve karaciğerde siroz görülmüştür (Bullerman 1979). Düşük düzeyde ancak uzun süreli aflatoksin alımı ise, birçok deney hayvanında karaciğer kanseri ile sonuçlanmaktadır. Deney hayvanlarından alınan bu sonuçlara bağlı olarak aflatoksinin kuvvetli bir hepatokarsinojen olduğunun belirlenmesi üzerine, insanlar üzerindeki etkisini anlamak amacıyla çok sayıda etiyolojik çalışma yapılmıştır. Asya ve Afrika'nın çeşitli ülkelerinde yapılan bu çalışmalarda; karaciğer kanserine yakalanma sıklığı ile aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketim düzeyi arasında kuvvetli bir ilişki gözlenmiştir (Wilson 1978; Ueno 1985). Bu etiyolojik çalışmalarda bir dönem diğer hepatokarsinojenik etmen olan hepatit B virüsü enfeksiyonunun dikkate alınmadığı gerekçesiyle bir tartışma başlatılmıştır (Denizel 1989). Ancak son yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalarda, aflatoksinin insanlarda karaciğer kanserine neden olduğu konusunda önemli bulgular elde edilmiştir (Öztürk 1995). İnsan karaciğer kanseri, kanser türleri arasında dünyada 5. sırada sık gözlenen bir kanserdir. Ölümle sonuçlanan kanserler sıralamasında ise 3. sıradadır (Parkin *et al.* 2001). Uluslar arası kanser araştırmaları ajansına göre Çin'de görülen karaciğer kanserlerinin %54'ü aflatoksin ve hepatit B

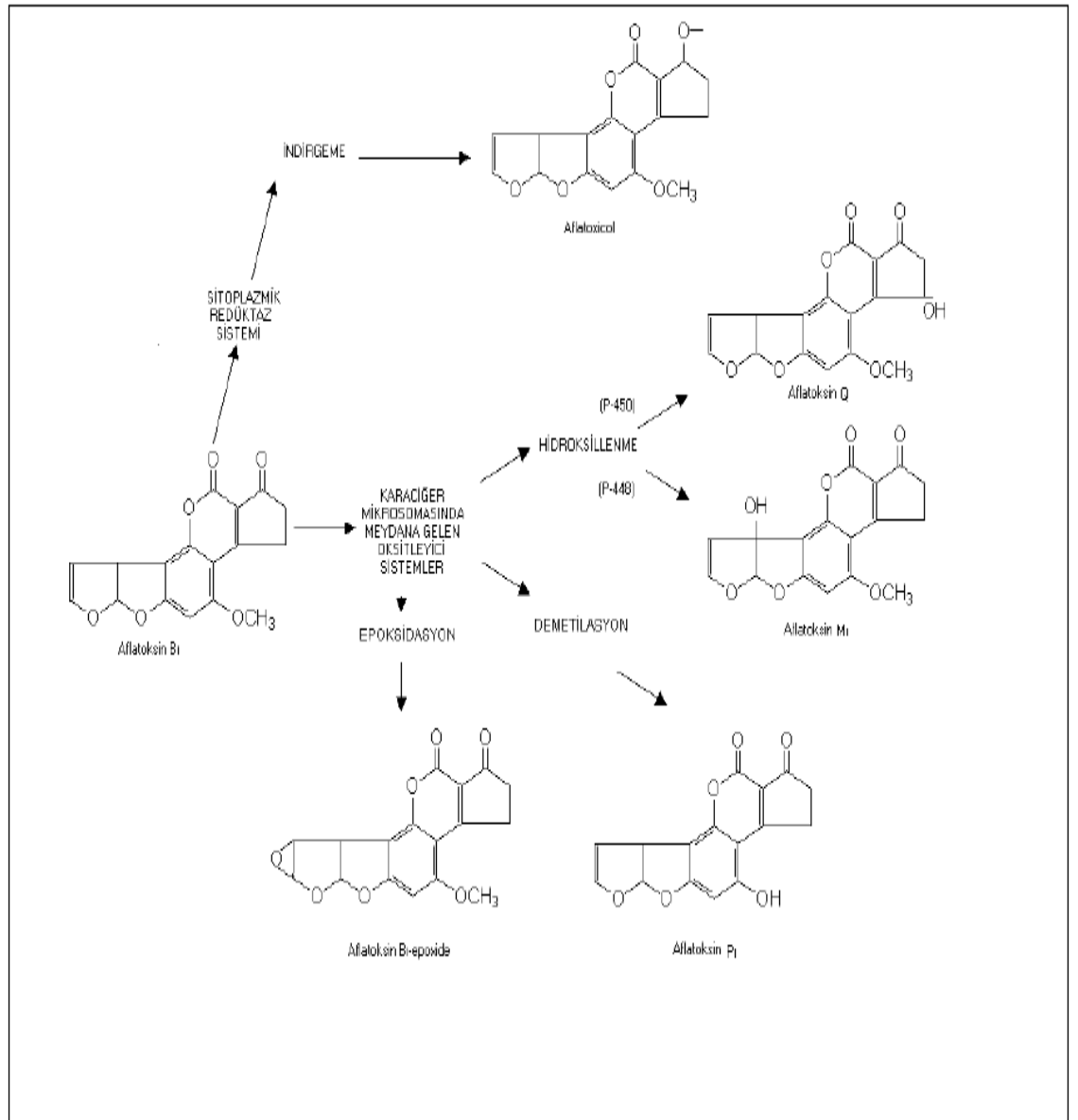
kaynaklıdır (IARC 1985). Uganda, Tayland, Kenya, Mozambik ve Çin’de yapılan araştırmalarda aflatoksin tüketimi ile karaciğer kanseri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. ABD’nin aflatoksin tahmini tüketimi daha fazla olan güneydoğusunda kuzey ve batısına göre %10 daha fazla karaciğer kanserine rastlanmaktadır. IARC’e göre aflatoksinlerin neden oldukları kanser oranları artmaktadır (IARC 1987). Daha sonraki raporlarda da bu tekrarlanmıştır (IARC 1993,2002).

İnsan kromozomları üzerine AFB₁’in AFG₁’e göre daha toksik olduğu görülmüştür. Ayrıca insan kromozomlarından bazı kromozomların AFB₁’e daha dirençli, bazı kromozomların ise daha dirençsiz olduğu tespit edilmiştir. AFB₁’in özellikle 2, 11, 19 ve 20. kromozomları daha çok, AFG₁’in de 1, 2, 3, 4 ve 5. kromozomları daha çok etkilediği ortaya konulmuştur. Genel olarak da boyca uzun olan kromozomların aflatoksinlerden daha çok etkilendikleri tespit edilmiştir (El-Zawahri *et al.* 1977,1990).

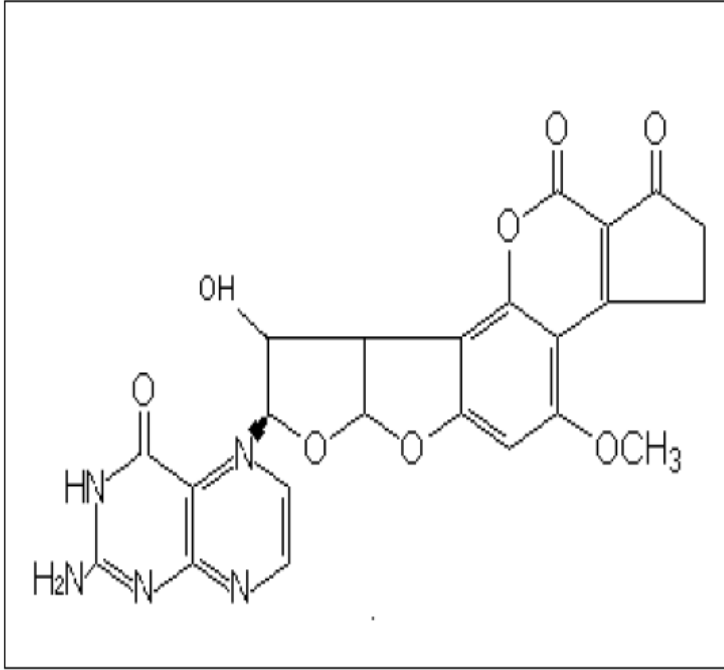
AFB₁’in karsinojenite ve mutajenitesi vücuttaki metabolizması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aflatoksinler, hayvanlarda öncelikle mikrozomal ve sitoplazmik oksijenaz enzim sistemleri tarafından metabolize edilmektedir. Bu enzim sistemleri, esas olarak karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan, sitokromla ilişkili enzimlerle, O₂’ye ve NADPH’a bağımlı enzimlerin kompleks bir organizasyonudur. Bu enzimler, çeşitli hidroksillenmiş türevlerin ve yüksek reaktif özelliğe sahip epoksid metabolitin oluşmasıyla sonuçlanan AFB₁’in oksidatif metabolizmasını katalize etmektedir (Ueno 1985). Bu sistemlerle AFB₁’in metabolizma yolları ve AFB₁’in çeşitli metabolitlere biyotransformasyonu Şekil 2.3. de görülmektedir.

Aflatoksin M₁ daha önce de değinildiği gibi, AFB₁’in hidroksillenmiş türevlerinden biridir ve karsinojenik gücünün AFB₁’den 10 kat daha düşük olduğu belirtilmektedir. Mikrozomal hidroksilasyon ve dimetilasyon reaksiyonları sonucunda oluşan aflatoksin Q₁ ve P₁ metabolitleri de AFB₁’den çok daha az aktif olan maddelerdir. Bu nedenle bu reaksiyonlar, detoksifikasyon prosesi olarak kabul edilmektedir. Metabolizmada AFB₁ in detoksifikasyonu; hidroksillenmiş metabolitlerin sülfat ve glukuronik asitle

birleşerek, suda çözünebilir sülfat veya glukuronid esterlerine dönüşmesi, ardından da idrar ve safra ile atılması ile tamamlanmaktadır. Bu biyotransformasyon olaylarında esas önemli olan proses, yine bu enzim sistemleriyle meydana gelen AFB₁'in epoksidasyonu prosesidir. Burada, bifuran halkasındaki çift bağın epoksidasyonu sonucu çok reaktif bir form oluşmaktadır. Bu elektrofilik epoksid DNA, RNA ve protein gibi hücresel makromoleküllerdeki çeşitli nükleofilik merkezlere kovalent olarak bağlanabilmektedir (Ueno 1985).



Şekil 2.3. AFB₁'in farklı metabolitlere dönüştürülmesi (Ueno 1985)



Şekil 2.4. AFB₁-N7-Guanil kompleksi (Ueno 1985)

Bu bağlanmanın sonucu olarak da DNA sentezini, DNA'ya bağlı RNA polimeraz aktivitesini, mRNA ve protein sentezini inhibe edilmektedir (McLean and Dutton 1995). AFB₁'in epoksi formunun bu aktifleşme reaksiyonunun sonucunda DNA ile birleşerek AFB₁-N7-Gua kompleksini oluşturduğu bilinmektedir. Şekil 2.4.'de AFB₁-N7-Gua kompleksinin yapısı görülmektedir. Bu kompleks organizma veya hücreler için biyolojik bir tehlike oluşturmakta, karsinojenik ve genotoksik etkilerin sorumlusu olarak değerlendirilmektedir. AFB₁ alımı ile karaciğer kanseri arasında pozitif ilişki bulunan Kenya'nın bir bölgesinde hastalardan toplanan idrarlarda AFB₁-N7-Gua kompleksi belirlenmiştir (Ueno 1985).

İnsanlarda AFB₁ sitokrom P450 enzimi tarafından reaktif bir form olan aflatoksin-exo-8,9-epoksit formuna dönüştürülür. Bu formdaki AFB₁ DNA'ya ve serum albüminine bağlanabilir. Aflatoksinin endo epoksit formunun mutajenitesi yaklaşık 1000 kat kadar exo formuna göre daha düşüktür. AFB₁-exo-8,9-epoxid formu DNA'nın yapısında guanin nükleotidine bağlanarak transversiyon tipi mutasyona neden olurlar. AFB₁-N7-Gua nin formuda 3 farklı reaksiyona uğrar. Ya AFB₁-8,9-dihydrodiol forma dönüşür

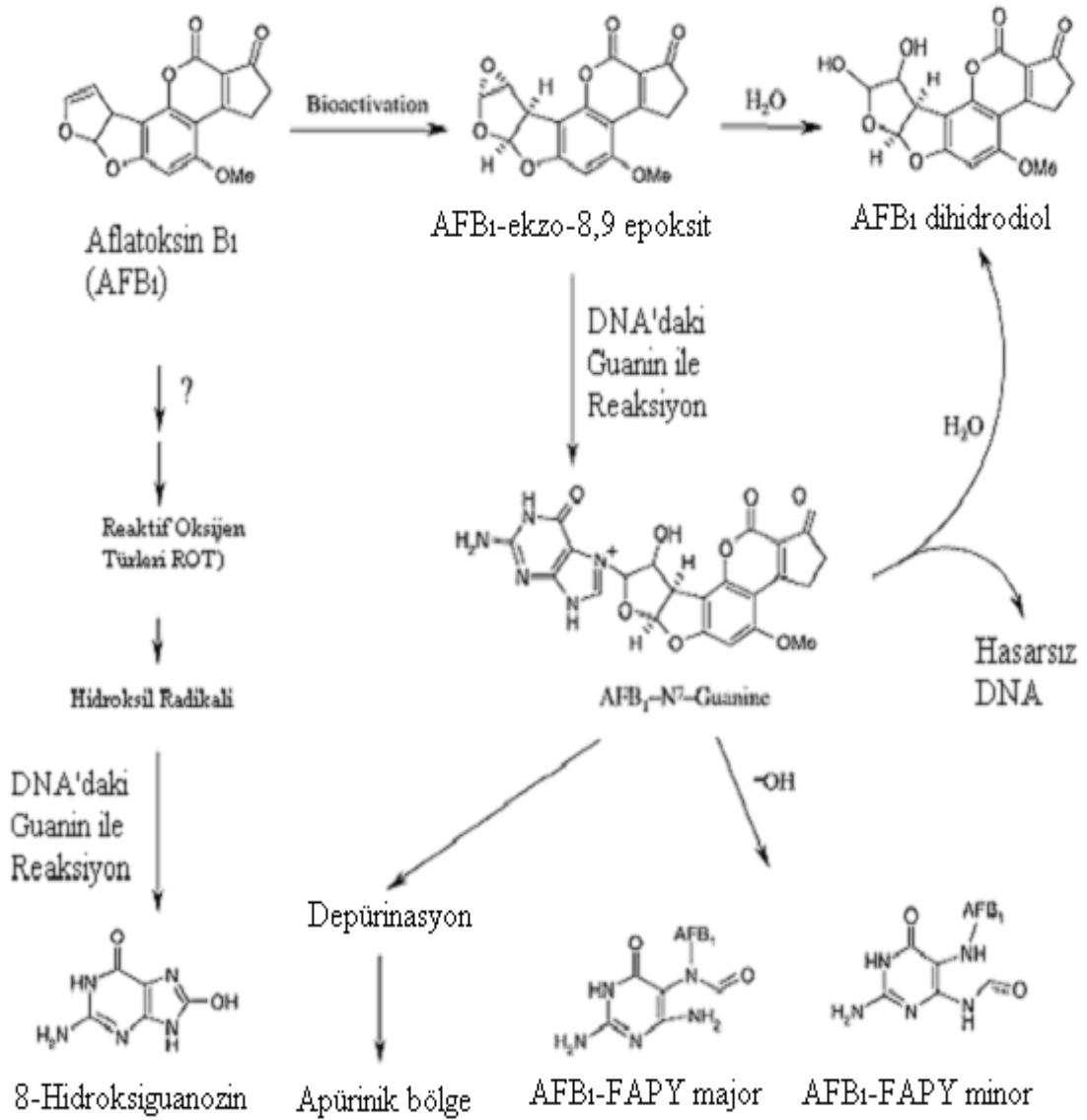
veya depürinasyona uğrar ya da imidazol halkasının açılması ile AFB₁-formamidopyrimidine (AFB₁-FAPY) minor ve major formlarına dönüşür (Şekil 2.5.) (Bedard and Massey 2006).

AFB₁'in karaciğer kanserine neden olmasının en önemli sebebi, DNA'daki N7-Guanine bağlanarak G-T transversiyona neden olmasıdır (Şekil 2.4.). Özellikle bu mutasyonlar tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin 249. kodonunda meydana geldiğinde karaciğer kanserine sebep olur. İnsanlardaki kanser sayısı ve çeşitleri ile p53 geni arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Tahmini olarak aflatoksinli besinlerin daha çok tüketildiği Çin'de karaciğer kanseri olan hastaların yaklaşık %50'sinde p53 geninin 249. kodonunda G-T transversiyon olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık tahmini olarak aflatoksinli besinlerin daha az tüketildiği Avrupa ve Japonya'da p53 geninin 249. kodonunda mutasyon tespit edilmemiştir (Hsu *et al.* 1991). Yapılan başka bir araştırmada da Çin'in Quidong bölgesinde karaciğer kanseri hastalardan aflatoksine yüksek oranda maruz kalan 20 hastanın 9'unda (%45) 249. kodonda mutasyonu görülürken, Shanghai bölgesindeki 18 hastanın 3'ünde (%17) 3'te 1 hastada da (%33) 249. kodon mutasyonu tespit edilmiştir (Li *et al.* 1993).

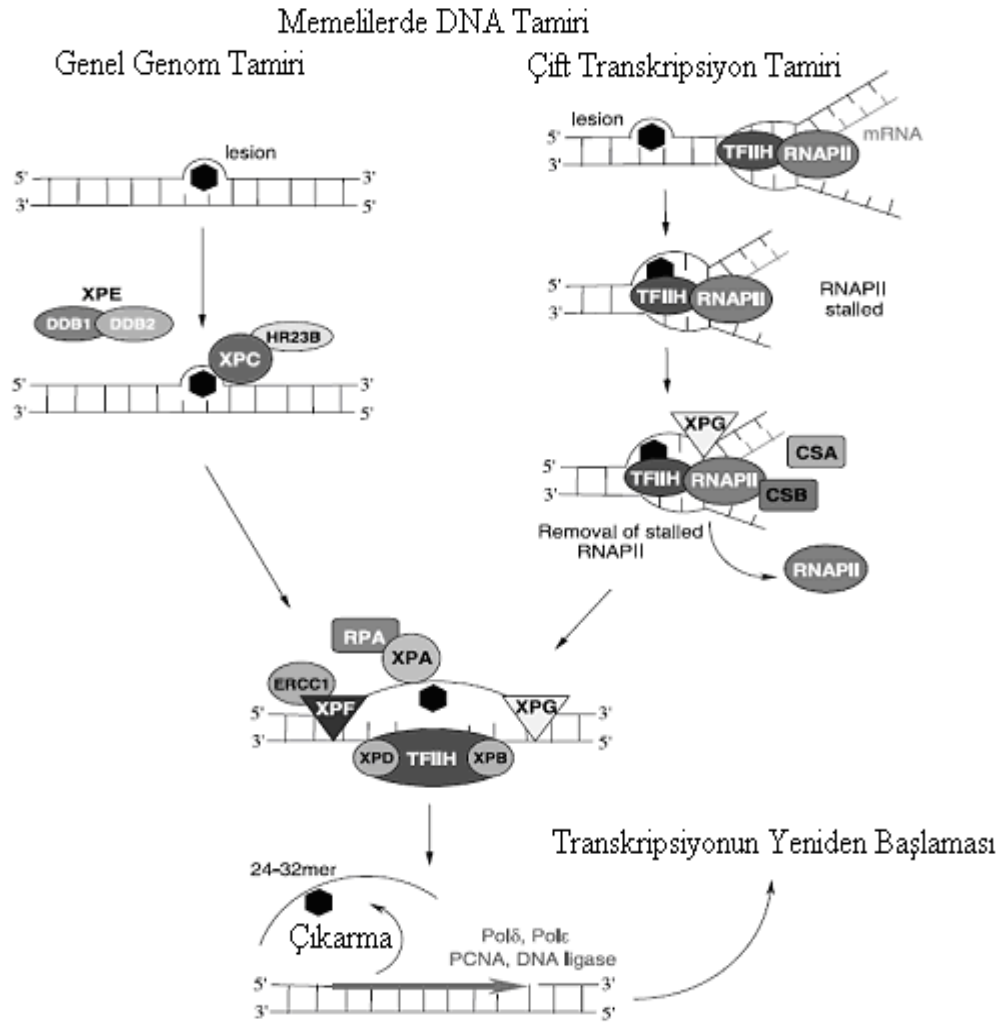
Tümör supressör geni olan p53 geni hücre siklusunun kontrol noktalarından DNA hasarı kontrol noktasında (G1/S) DNA'yı kontrol eder. Eğer DNA'daki hasar onarılacak düzeyde ise DNA tamir edilinceye kadar hücre döngüsünü durdurur, DNA tamir edilemeyecek düzeyde hasarlı ise hücreyi apoptosise yönlendirir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

AFB₁'in neden olduğu DNA hasarları tamir edilebilir. Memelilerde DNA'daki hasarı tamir (nucleotide excision repair = NER) mekanizması vardır. Burada AFB₁ DNA'ya bağlanarak hasara neden olduğu için hasarlı olan nükleotid DNA'dan çıkarılarak tamiri gerçekleştirilebilir. NER iki şekilde gerçekleştirilir. İlk olarak transkripsiyona bağlı olmadan DNA'da nükleotidlerdeki hasar tespit edilerek genel genom tamiri (global genome repair = GGR) mekanizması ile tamir edilebilir. İkinci olarak ta DNA'nın transkripsiyonu sırasında hasarlı bölge bir dizi reaksiyon ve çift transkripsiyon tamiri

(transcription coupled repair = TCR) sonunda çıkarılır. Daha sonrada transkripsiyon tekrar başlatılır (Şekil 2.6.) (Bedard and Massey 2006).



Şekil 2.5. AFB₁ in biyoaktivasyonu ve DNA ile etkileşimleri (Bedard and Massey 2006)



Şekil 2.6. Memeli hücrelerinde meydana gelen hasarların onarım mekanizması (Bedard and Massey 2006).

DNA'daki hasarı tamir (nucleotide excision repair = NER) mekanizması, genel genom tamiri (global genome repair = GGR) ve çift transkripsiyon tamiri (transcription coupled repair = TCR) olmak üzere iki yolu vardır. CSA, CSB: Cockayne's sendromu proteini A ve B; DDB1, DDB2, hasarlı DNA bağlı proteinler; PCNA: bölünen hücre nükleer antijeni; Polδ, Polε, DNA polimeraz; RNAPII, RNA polimeraz II; RPA, replikasyon protein A; XP, xeroderma pigmentosum.

2.2. Likenler

Likenler tanım olarak, bir mikobiyont olarak anılan fungal ortak ile bir ya da daha fazla sayıda alg ya da siyanobakteri olabilen ve fotobiyont veya fotosentetik olarak anılan ortak simbiyotik organizmalardır (Nash and Thomas 1996). Şekil ve yaşayış bakımından kendilerini oluşturan alg ve mantarlardan tamamen ayrı bir yapı gösterirler. Renksiz bir mantar hifinden oluşan tallusun yapısına katılan fotosentetik canlı (fotobiyont), genellikle yeşil alg ya da bir cyanobakteridir; fakat bazı sarı-yeşil alglerden ve kahverengi alglerden de oluştukları bilinir. En çok Cyanophyta ve Chlorophyta'ya ait cinsler ve Xanthophyta ve Phaeophyta'dan bazı alg türleri görülür. Mantarlarda ise genellikle Ascomycetes ve az olarak Basidiomycetes'e ait cinslerdir (Cocchietto *et al.* 2002; Sanders 2004).

Günümüzde likenlerin ikili yapısı büyük ölçüde biliniyor olmasının yanı sıra, bazı likenlerin üç ya da daha fazla ortak içeren simbiyotik canlılar olduğu da bilinmektedir (Nash and Thomas 1996). Alg ve mantarın birbirleri ile birleşmeleri farklı şekillerde olabilir. Eğer alg ve mantar dağılımı homojen şekildeyse bu likenler; "Homeomerik liken", heterojen bir dağılım varsa "Heteromerik liken" olarak isimlendirilirler (<http://tr.wikipedia.org/wiki/likenler> (01.03.2010)).

Önceleri mantarın klorofil içermemesi nedeniyle bir parazit gibi alglerden yararlandığı düşünülmeye karşın daha sonraları bu açıklama önemini yitirmiştir (Aslan 1995).

Likenleri oluşturan alg ve mantarlar (funguslar) arasında bazı fizyolojik iş bölümleri vardır. Funguslar, kendi karbohidratını üretmez, alg ve cyanobakterilerden hazır olarak alırlar. Bunlar da ekosistem için çalışır ve fungus için glukoz üretirler. Simbiyotik organizmalardan alg, klorofil taşıdığından fotosentez yapar ve birliğin karbohidrat gereksinimini karşılar. Mantar ise su ve madensel maddelerin alınmasında görev alır.

Likenlerde metabolik aktivite su, ısı ve ışıkla değişkenlik gösterir. Su içeriği %65–90 arasında olduğunda fotosentez oranı artar, 15–20°C fotosentez için en uygun sıcaklıktır.

Depo maddesi olarak nişasta bulunur (Cocchietto *et al.* 2002; <http://tr.wikipedia.org/wiki/likenler> (01.03.2010)). İki organizma da tek başlarına yaşayamayacakları yerlerde beraber kolonize olup yaşayabilirler (Nash and Thomas 1996).

Yeterli nemin bulunduğu kızgın çöllerde, Arktik ve Antartik bölgeler ile yüksek dağların dondurucu soğuklarında diğer bitkilerin yaşayamadığı taşlar, verimsiz topraklar, kuru ağaç kabukları ve kiremitler üzerinde dahi yetişebilmektedirler (Nash and Thomas 1996; Aslan *et al.* 1998).

Likenlerin besin maddelerine olan ihtiyaçları azdır. Yalnız havası temiz olan yerlerde yaşayabilirler, kirli havaya karşı çok duyarlık gösterirler. Endüstri bölgelerinde büyük şehirlerin yakınlarında liken florası çok fakirdir. Buna karşılık havası temiz olan bölgelerde kayaların, ağaç ve dallarının üzerini çeşitli renk ve şekilde örterler. Onun için likenler bir bölgenin havasının temiz olup olmadığını belirten iyi bir göstericidir (Karamanoğlu 1971).

Temiz hava olmak şartıyla, likenler içerisinde kısa ömürlü olan türler genellikle nadir bulunmaktadır. Günümüzde çevre kirliliği, küresel ısınma, ozon tabakasının delinmesi vb. çevre sorunları dikkate alındığında likenlerin yaşam ömrü azalmış olsa da, likenler uygun şartlar altında (temiz hava, yeterli nem ve ışık vb.) yine de 5000 yıldan fazla hayatta kalabilirler. Mezar taşları ve bazı tarihi eser anıtların yaşları ile heyelan ve depremlerin meydana geliş tarihleri likenler incelenerek belirlenebilir (Armstrong 2004). Likenlerde yıllık büyüme bir veya birkaç milimetreden bir kaç santimetreye kadar değişir. Daha hızlı büyüyen türler biyokütlelerini yılda %20–40 artırabilirler ve özellikle siyanolikenler baskınsa, bulundukları ekosistemin mineral döngüsünde önemli bir rol oynayabilirler (Richardson 1975; Richardson 1992; Nash and Thomas 1996; Baron 1999; Gilbert 2000; Dobson 2005)

Dünya üzerindeki ototroflar içerisinde likenler minyatür olarak ilginç varyasyonlar gösterirler. Renk olarak fantastik bir turuncu, sarı, kırmızı, yeşil, gri, kahverengi ve

siyah, ihtişamlarını sergilemektedir. Ebat olarak 1mm²'den, ağaç dallarında 2 m'ye kadar sarkan, uzun, asılı formlar olmak üzere değişik boyutlarda bulunabilirler.

Kayalar üzerinde en açık likenler yüzeyde epilitik (topluluklar hâlinde taş ya da kayalar üzerinde yaşayan algler) olarak ortaya çıkarlar ancak diğerleri kaya yüzeyine gömülü yani endolitik (asit salgılayarak bulunduğu ortamı parçalayan)'tir (Nash and Thomas 1996; Boustie and Grube 2005).

Likenlerin sekonder ürünleri olan liken asitleri likenlere doğadaki karasal süksesyonda öncül bitki olma özelliği kazandırmıştır (Aslan 1995). Kumul, kayalık, killi, bataklık ve çakıllı olan ortamlar öncelikle likenler tarafından işgal edilir. Bunlara öncü populasyonlar denir. Likenler ortamın toprak kalitesini yükseltir. Tutundukları kayaları salgıladıkları maddelerle yavaş yavaş parçalayarak kaya üzerinde ince bir toprak tabakası oluştururlar. Daha sonra liken parçaları ve orada gelişen karayosunlarının da katılmasıyla organik maddenin sürekli artması sonucu daha yüksek bitkilerin gelişmesine olanak sağlarlar (Lawrey 1989; Nash and Thomas 1996; Müller 2001; <http://tr.wikipedia.org/wiki/likenler> (01.03.2010)). Likenler doğal abiyotik şartlara (canlılardan kaynaklanmayan ortam şartlarına) çok dayanıklıdır (Nash and Thomas 1996).

Günümüzde 17000 den fazla türe sahip olduğu bilinen likenlerin, ülkemizdeki florası henüz tamamlanmamış olup bölgemiz ile ilgili yapılan çalışmalar ise şimdilik sınırlı olmasına karşın gün be gün artmaktadır (Öztürk ve Aslan 1991; Aslan ve Öztürk 1994; Aslan 2000).

Diğer yandan Ülkemizde 9000'e yakın bitki türünün doğal olarak yetiştiği ve bunların kimyasal içerikleri hakkındaki çalışmaların yeterli olmadığı da vurgulanmaktadır (İlçim *et al.* 1998). Bitkisel organizmalar içerisinde incelenen likenler de antik çağlardan beri morfolojik özelliklerine dayanılarak (örneğin: akciğere benzeyen *Lobaria pulmonaria*) o organdaki hastalıkların tedavisinde yararlanılmaya çalışılmış ve tıbbi özellikleri itibarıyla değerlendirilmişlerdir (Boustie and Grube 2005; Dilsizoğlu vd 2004).

Fungus (mycobiont) ve alg (phycobiont) partnerlerinin oluşturduğu simbiyotik bitkiler olan likenler, yavaş üremelerinden kaynaklanan rekabette zayıf kalma dezavantajlarını, ürettikleri özel maddeler sayesinde telafi ederler. Özellikle aromatik yapılı sekonder metabolitler, onların en güçlü antagonistik maddelerini oluşturmaktadır. Diğer taraftan likenlerin boya ve kozmetik sanayisinde ham madde olarak ve hava kirliliğini belirlemek amacıyla kullanıldıkları da kaydedilmiştir. (Cocchietto *et al.* 2002; Dilsizoğlu vd 2004; Yazıcı ve Aslan 2006). Her ne kadar likenlerin global krizlerde besin kaynağı olarak kullanılabileceği teklif edilmişse de, doğal yolla üremeleri çok yavaş olduğundan, bu tür bir değerlendirmenin ekonomik olmadığı ifade edilmiştir (Harmala *et al.*1992).

Likenlerin üstün yaşam mukavemeti kendi bünyelerinde ürettikleri çok özel moleküllerden ileri gelmekte ve yapılan biyolojik aktivite ölçümlerinde liken metabolitlerinin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmekte ve ilaç özelliklerinin araştırılmasında önemli yer tutmaktadır (Huneck 1999). Likenlerin insanlardaki toksisitesiyle ilgili çok az sayıda veri bulunmakla birlikte, kaydedilmiş yan etkiler lokal tahrişler ve bazen konjunktivit (genel anlamda gözü koruyan zarın iltihaplanması) ile beraber meydana gelen alerjik deri iltihabı ile sınırlıdır. Likenlerin sebep olduğu alerjik kontakt dermatitis çok uzun zamandan beri bilinmekte ve bunun yaygın olmamakla birlikte liken bileşenlerine karşı duyarlılık potansiyelleriyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Ingólfssdottir 2002).

Likenler, dünyada ve ülkemizde çok eski zamanlardan beri halk hekimliğinde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) birçok ülkedeki yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre, dünyada tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam tür sayısı 20.000 civarındadır (Öztürk ve Aslan 1991; Aslan ve Öztürk 1994; Aslan 2000).

Son yıllardaki araştırmalar, liken metabolitleri ve onların antimikrobiyal etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırmalar sonucunda 800'ün üzerinde liken metabolitinin yapısı aydınlatılmıştır (Huneck 1999; Ingólfssdottir 2002; Boustie and Grube 2005).

Likenlerdeki bu antimikrobiyal etkileri, yapılarında bulunan asitlerden ileri gelmektedir. Farklı liken türlerinden izole edilmiş protolikesterinik asit, pulvinik asit türevleri, depsid grubundan evernik, olivetorik asit, tridepsid grubundan giroforik asit, depsidon grubundan fisodik, lobarik, fumarprotosetrarik asitler ile dibenzofuran türevlerinden usnik asitin antimikrobiyal etkileri saptanmıştır. Bunlardan özellikle protolikesterinik asit, pulvinik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asitin en yüksek antimikrobiyal etki gösteren liken maddeleri olduğu belirlenmiştir (Vartia 1950; Dülger vd 1997; Dülger vd 1998; Ingólfssdottir 2002; Boustie and Grube 2005).

Likenlerde bulunan maddelerin çoğu asit özelliği gösterdiği için bunlara karakteristik olarak “liken asitleri” denilmektedir. Likenlerin kayaları parçalama özelliğini sentezledikleri bu asitler vasıtası ile gerçekleştirdiklerine inanılmaktadır. Likenlerin bu asidik maddeleri %1–5 oranında, liken ekstratlarının ise çoğu zaman %25'lere varan oranlarda içermeleri bu maddelerin izolasyonunu kolaylaştırmakta, dolayısıyla da likenlerin bu yönüyle tohumlu bitkilerden daha fazla önem kazanmasına neden olmaktadır (Öztürk ve Aslan 1991). *Cladonia* sp., *Evernia* sp., *Cetraria* sp., *Usnea* sp., *Alectoria* sp., *Ramalina* sp. cinsleri antibiotik özelliğe sahip asitler yönünden önemlidir. Bu maddeler gram pozitif koklara, verem basiline ve difteri etkenine karşı etkilidir (Aslan vd 1998). Likenlerin primer metabolitleri yalnız algler tarafından fotosentezle sentezlenmektedir. Likenlere özgü çeşitli polisakkaritlerin yanı sıra çeşitli aminoasit, amin ve proteinler de likenlerden izole edilmiş primer metabolitlerdir (Huneck 2001; Boustie and Grube 2005). Likenler tarafından sentezlenen alifatik ve aromatik bileşikler ise sekonder metabolitler olup günümüze kadar 300'den fazla sekonder metobolitin saflaştırılmış ve yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak karakterize edilmiştir (Huneck 1999; Culberson 1969; Boustie and Grube 2005).

Liken ekstraktlarının ve likenlerden elde edilen moleküllerin antimikrobiyal antimutajenik ve antigenotoksik etkilerinin incelendiği araştırmalar vardır (Gulcin vd 2002).

Ülkemizde likenlerin antioksidan aktiviteleri üzerine yapılmış bazı çalışmalar da mevcuttur (Odabaşoğlu vd 2006; Aslan vd 2006; Güllüce vd 2005).

2.3. Kardeş Kromatid Değişimi

Biyolojik varlıklarda bir kısım fiziksel, kimyasal veya farklı kaynaklardan oluşan mutajenlerin genom materyali üzerinde hasar oluşturabileceği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Bu genotoksik etkileri gösterebilmek ve kantitatif olarak belirleyebilmek için bir çok test sistemleri geliştirilmiştir. Bu test sistemleri gerek *in vivo* gerekse *in vitro* ortamlarda kullanılabilir. Bunlar içerisinde en sık kullanılanlardan biri olan KKD replikasyon esnasında bir metafaz kromozomunda kromozom morfolojisini değiştirmeden kardeş kromatidler arasında değişimi ifade etmektedir. KKD testi hızlı ve güvenilir olmasının yanında duyarlı ve basit bir testtir.

KKD testi, çevredeki atıkların etkisini araştırmak için 1957 yılında Taylor ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, kısa süreli mutajenite ve karsinogenite testleri arasında en hassas ve en fazla kabul edilen yöntem haline gelmiştir (Taylor *et al.* 1957). Mutajen ve kanserojenlerin KKD'yi artırdığını belirtmelerinden sonra KKD yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Perry and Evans 1975). KKD genetik hasarlar hakkında bilgi verebilen ve sitogenetikte oldukça yaygın bir kullanıma sahip olan hassas bir testtir (Öztürk 1995).

Mutajen ve kanserojenlerin toksik dozların altındaki dozlarda meydana getirdikleri genetik hasarların kısa zamanda, hassas bir şekilde ve nicel olarak gösterilmesinin KKD analizi ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bir maddenin mutasyon meydana getirmesi ile KKD oluşumunun uyarılması arasında lineer bir ilişki olduğunu da belirtmişlerdir. Görüldüğü gibi bir maddenin mutajen ve kanserojen olup olmadığının belirlenmesi, bu maddenin KKD'ni uyarmadığının saptanması ile de mümkün olabilmektedir (Carrano *et al.* 1978). Ancak KKD'de ortaya çıkan artışların uzun süre sonra yapılan kontrollerinde ise KKD'deki bu artışın normale inmesi şeklinde düzelmelerin olduğu da tespit edilmiştir (İkbal *et al.* 2003). Buradan da şu fikre

varılabilmektedir ki, belli kimyasal veya fiziksel etkiler arasında genom materyalin vermiş olduğu KKD'deki artış yönündeki tepki, yine genom içerisinde kalıcı olmadan da düzeltilebileceğidir. Şu da unutulmamalıdır ki, KKD artışlarının hangi durumda veya ortamda düzelebileceği ve hangi durumlarda kalıcı olacağı kesinlikle bilinmemektedir.

2.3.1. KKD yöntemini etkileyen faktörler

KKD frekansı sağlıklı insanlarda da belirli düzeyde görülmektedir. İnsan lenfositlerinde KKD'nin ve KA'in temel sıklığında kişiden kişiye ve kişinin yaşına, cinsiyetine, sigara alışkanlığına, yaşam şekline, mesleğine bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (Latt and Schreck 1980). İnsanda oluşan KKD'ye, enfeksiyon, kimyasal maddeler, radyasyon ve virüsler de neden olabilmektedir (Garret *et al.* 1986). Tarım ile uğraşan ve pestiside maruz kalan insanlarla bu bileşiklere maruz kalmayan bireyler arasında yapılan çalışmalar, pestiside maruz kalan insanlarda, yapısal ve sayısal KA' ler ile KKD'nin yüksek oranlarda tekrarlandığını göstermektedir (De Ferrari *et al.* 1991). Adriamycin ile Down sendromlu hastalarda yapılan çalışmalarda, adriamisinin KKD'yi önemli derecede artırdığı bulunmuştur (Gadhia *et al.* 1991). KKD oranları sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde (bayanlarda, erkeklerde ve genel toplamda) daha yüksek olduğunu belirleyerek sigaranın KKD bazında genotoksik etkisini belirlemişlerdir (Akbaş vd 2001). Sigara ve tütün kullanımının KKD oranlarına etkisini incelediği çalışmada kontrol grubunda 5.48 olan KKD oranının sigara içenlerde 8.15'e ve pipo kullananlarda 10.12'ye yükseldiğini saptamıştır (Ghosh *et al.* 1987). KD'yi etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

a) Yaş: KKD sıklığında yaşın bir etkisi olmadığı şeklinde çalışmalar yanında, çocuklarda KKD sıklığının yetişkinlere göre daha az olduğunu gösteren yayınlar da vardır (Baysal *et al.* 2003).

b) Genetik: Birçok kalıtsal hastalıkta (Bloom sendromu vs.) KKD oranının çok arttığı bilinmektedir (Baysal *et al.* 2003).

- c) Diyet: Sigara kullanımı ve kronik alkoliklerde KKD sıklığında artış bildirilmiştir (Gantt *et al.* 1978).
- d) İlaç kullanımı: Kullanılan birçok ilacın (Penisilin, Nitrofrontoin vs.) KKD sıklığını arttırdığı yönünde bulgular bulunmaktadır (Baysal *et al.* 2003).
- e) Hastalık ve Enfeksiyon: Behçet hastalığı, anklizon spondilit vb birçok kronik hastalıkta, viral enfeksiyonlarda KKD sıklığının arttığı gösterilmiştir (Baysal *et al.* 2003).
- f) Kanın çalışma zamanı: Alınan kanların 24 saat içerisinde çalışılması önerilmiştir (Baysal *et al.* 2003).
- g) Diğer: İnsektisitler, Peptiside, X-ray, UV ve petrol ürünü gibi kimyasal ajanların dahil olduğu çevresel faktörlerin KKD oranını arttırdığı bilinmektedir (Baysal *et al.* 2003).

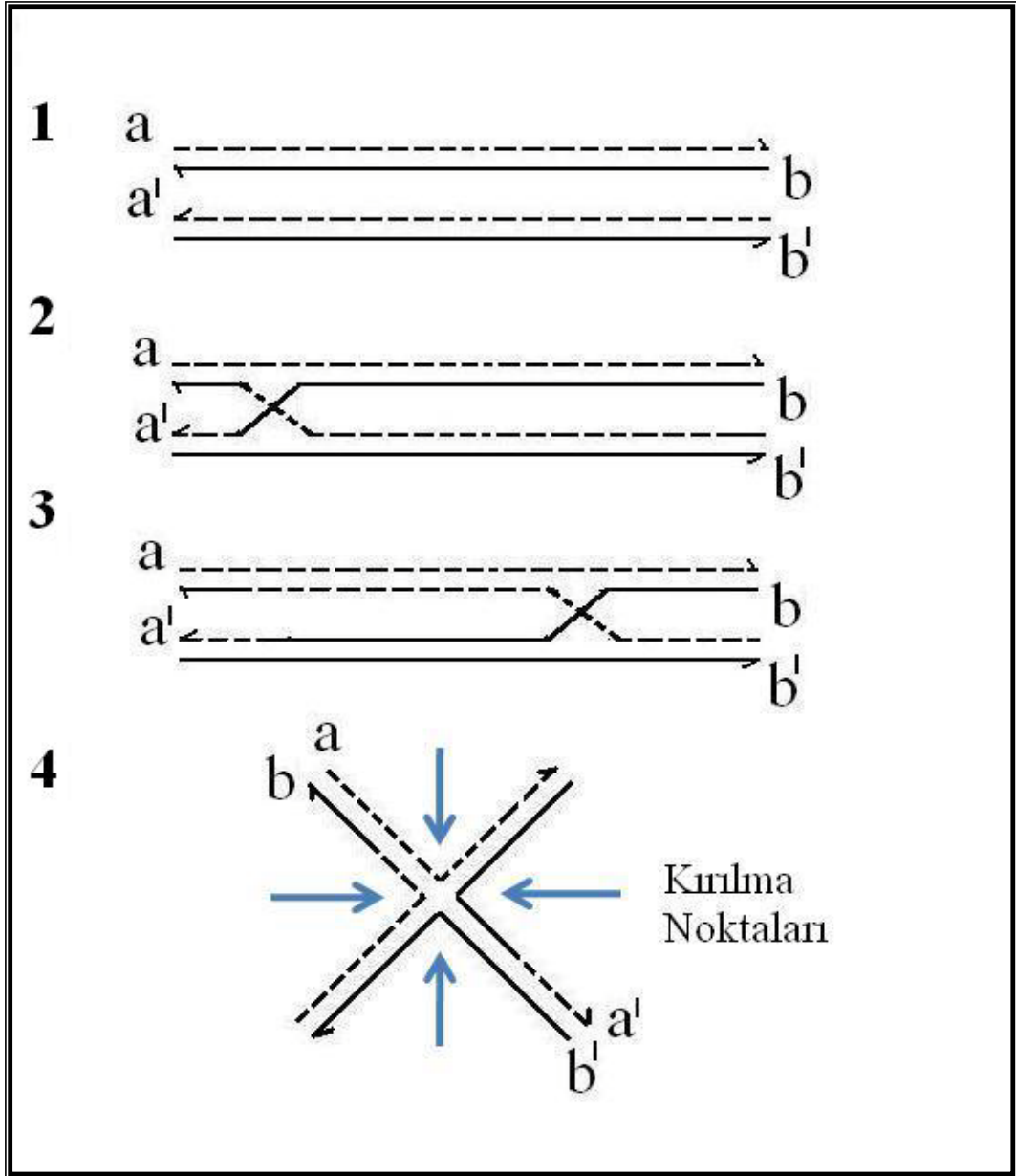
2.3.2. KKD'nin oluş mekanizmaları

İç veya dış etkenlerin etkisiyle hücre DNA'sındaki değişikliklere bağlı olarak meydana gelen KKD'lerin oluş mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Birçok araştırmacı tarafından değişik modeller öne sürülmüştür.

Loveday ve Latt tarafından öne sürülen modelde, her bir çift sarmalda tek zincir kırığı oluşmakta ve çiftlerden birindeki bir zincir ile karşı DNA'nın tamamlayıcı zinciri arasında gerçekleşmektedir. Kalıp DNA'dan timidin yerine 5-bromodeoksiüridine (BrdU) alınarak komplementer DNA zinciri sentezlenmektedir (Şekil 2.7.). Rekombinant heterodubleks uçlar oluşmakta, sentezin ilerlemesiyle heterodubleks bölgeler uzamaktadır. DNA molekülünün kırılma ve tekrar tamir edilme noktası etrafındaki rotasyonu ile X formasyonu meydana gelmektedir. Bu yapıdaki çentiklerin oluşması ve bunların ligazla birleştirilmesi sonucu her iki zincirde BrdU ve her iki zincirde timin içeren iki rekombinant yapı oluşmaktadır (Şekil 2.7.). Bunlar farklı boyanarak KKD'lerin görünür hale gelmesini sağlar (Latt and Schreck 1980). Bu yöntemde timidin bazının analogu olan BrdU replikasyonu aksatmadan DNA'nın yapısına girer. BrdU mevcudiyetinde, replikasyonun ilk siklusunda iki kardeş

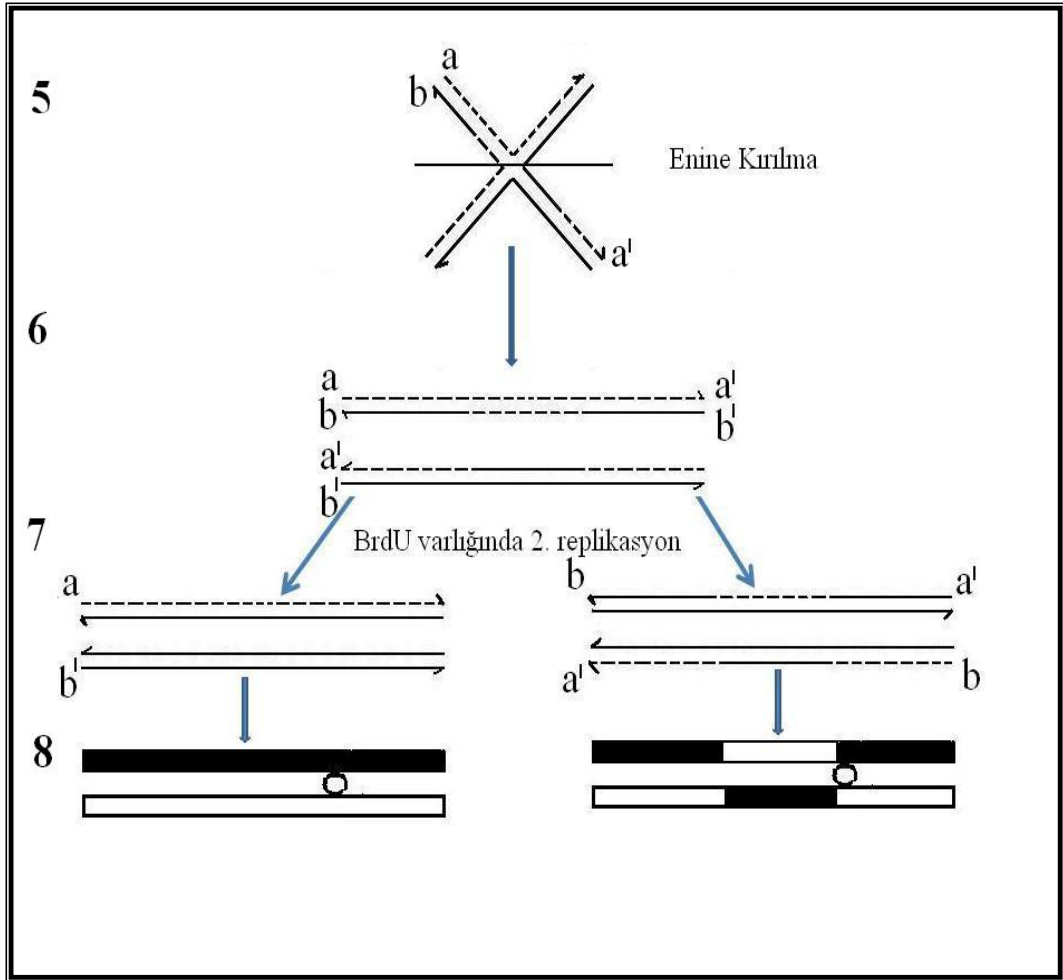
kromatidden yalnızca birisi BrdU içerir, diğeri içermez. BrdU'nin timinin yerine girdiğİ kromatidde boya bağlama kapasitesi azalmıştır. Giemsa ile boyanınca ayrı fizikokimyasal özellikler taşıyan BrdU ve timidin içeren DNA bölgeleri farklı affinite gösterdiğinden, iki kardeş kromatidden BrdU içeren DNA bölgeleri daha az ve daha açık tonda boyanmasıyla kardeş kromatidlerin ayrılması mümkün olmaktadır (Zakharov *et al.* 1974).

1973'de Latt floresan bir boya olan Hoechst-33258 ile insan kromozomlarında kardeş kromatidlerin farklı tonlarda boyandığını göstermiştir (Allen and Latt 1976). Sonuçta BrdU'li kromatid giemsa ile açık boyanırken, kardeş kromatidi koyu boyanmış olarak görülecektir.



Şekil 2.7. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması

- * 1-Timin içeren kalıp DNA Timin yerine BrdU alınarak sentezlenen koplementer DNA,
 2-Her bir dublekste tek zincir kırığı oluşması ve zincirlerin krosing-over sonucu kardeş DNA dubleksinin zinciri ile birleşmesi,
 3-Sentezin ilerlemesi ile timin ve BrdU içeren heterodubleks zincirlerin oluşması,
 4-Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile X formunun meydana gelmesi,



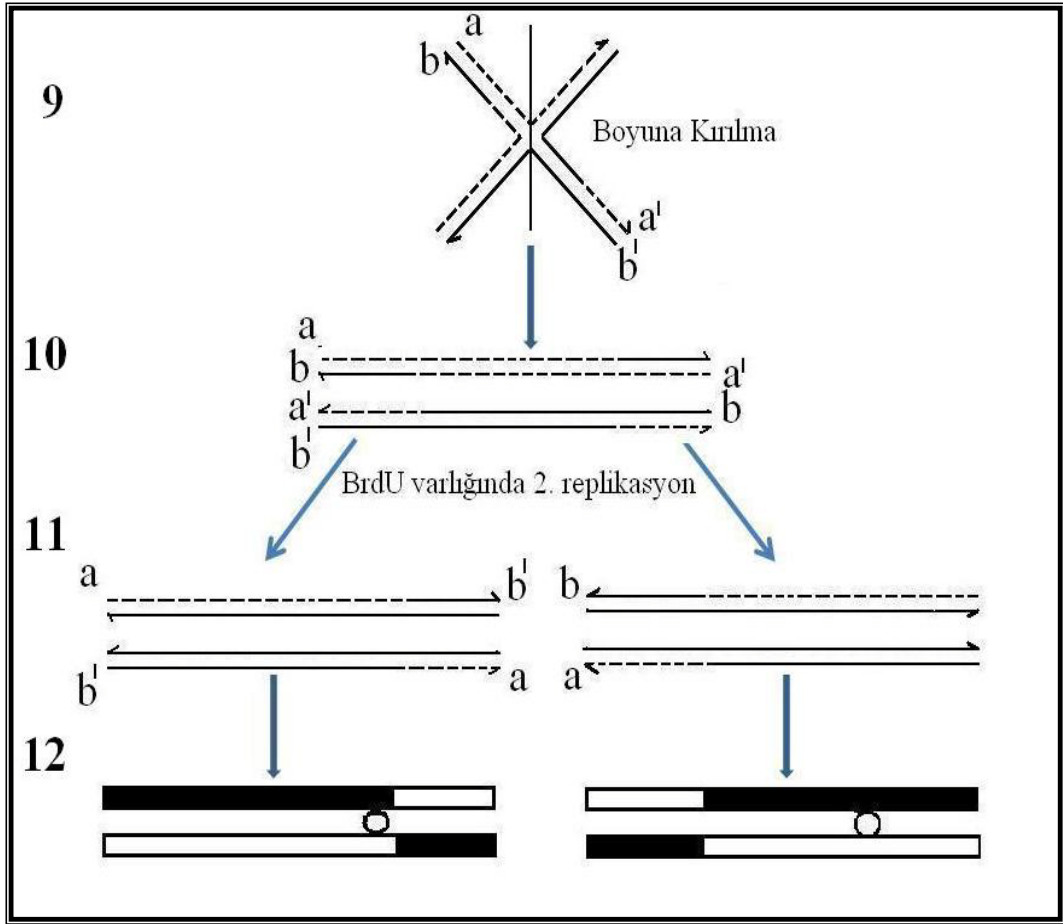
Şekil 2.7. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması (devam)

*5-Molekülün Krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda enine kırılma meydana gelmesi,

6-Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,

7-Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun geçirilmesi ve sadece BrdU içeren koplementer zincirlerin sentezlenmesi,

8-Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi bu mekanizmanın esasını oluşturmaktadır.



Şekil 2.7. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması (devam)

- * 9-Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda boyuna kırılma meydana gelmesi,
- 10-Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,
- 11-Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun geçirilmesi ve sadece BrdU içeren komplementer zincirlerin sentezlenmesi,
- 12-Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi bu mekanizmanın esasını oluşturmaktadır.

KKD oluşum yerleri aktif replikon veya replikon kümeleri (cluster) ile ilişkilidir. KKD, tahminen aynı kromatid üzerindeki homolog yerde bulunan DNA replikon ürünlerinin intrakromozomal alışverişidir. KKD ni oluşturan replikon kümeleri 10-100'er adetlik DNA replikasyon ünitelerinden (replikonlardan) oluşur. Bu replikonların her biri 100 kilobaz (1 kilobaz=1.000 bazlık DNA segmenti) uzunluğundadır (İkbal *et al.* 2003). Böylece bir clusterin büyüklüğü 1–10 megabaz (1 megabaz = 1.000.000 baz) olarak hesaplanabilir, bu da yaklaşık olarak yüksek rezolusyonlu bir kromozom bandındaki DNA miktarına eşittir. Bu durumda clusterler ışık mikroskobu ile görülebilecek büyüklüğe ulaşmış olurlar (İkbal *et al.* 2003). Boya replikasyon kümeleri arasındaki birleşme çizgileri, KKD formasyonuna eğilimli kararsız yerler olduğunu belirtmektedir. DNA hasarları replikon kümelerindeki replikasyon çatalında bir engel oluşturarak o segmentte replikasyonu durdurabilir. Replikasyonun iki yöne doğru ilerlediği düşünülürse yeni sentezlenmiş bir segmentle eski bir segment uç uca gelebilir ve KKD gerçekleşebilir. Bu tür bileşimlere DNA'daki çift zincir kırıkları da neden olabilir, bunlar da KKD oluşumuna yol açar (İkbal *et al.* 2003).

2.4. Mikronükleus (MN)

Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur.

Mikro nükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde

fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır.(Vanparys *et al* 1990; Zijno *et al* 1994).

MN testi 1950’lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970’lerde hayvan hücrelerinde (Widel *et al.* 2001; Jagetia *et al.* 2001) ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş (Schmid 1975) insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar (Von *et al.* 1973; Högstet *et al.* 1958) geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN’lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN’lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir. Eastmond ve Tucker (Eastmond and Tucker 1989) aynı amaçla antikinetokor antikorları kullanarak kinetokor pozitif MN’lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN’lerin ise asentrik kromozom fragmanı içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır. Daha sonraları Fenech ve Morley (Fenech and Morley 1985,1986) tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır.

Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman’ın (Heddle and Countryman 1976) kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN’ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman’ın kriterlerine göre:

1. MN çapının esas ekirdeğın 1/3'inden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğının esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır.

Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniğı, eksfoliyatif hücrelere 1982 yılında ilk defa Stich ve arkadaşları (Stich *et al.* 1982) tarafından uygulanmıştır. Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliyatif hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerdirmek mümkün olmuştur (Rosin and Gilbert 1990; Stich and Rosin 1984). Hızla çoğalan bu epitelyal dokular çevreleriyle sürekli temas halindedir ve epitelin yüzeyel tabakasını oluşturan eksfoliyatif hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte, dolayısıyla uğradıkları genotoksik hasar da kolaylıkla gösterilebilmektedir. Böylece bu hücreler ait oldukları dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değışiklikleri ve kanseri gsterebildiklerinden bir biyomarker olarak değerdendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilmektedir (Stich and Rosin 1984; Moore *et al.* 1996) Eksfoliyatif hücrelerde uygulanan MN tekniğinde Fuelgen-Fast Green boyama yöntemi kullanılmakta, hücrenin çekirdeğı parlak pembe, sitoplazması ise açık yeşil boyanmaktadır. MN testi sigara, pestisid ve parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerdendirebilmek için kolaylıkla kullanılmaktadır.

1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde arttı.

Mavournin ve arkadaşları (Mavournin *et al.* 1990) 1990 yılına kadar kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için yapılan tüm MN test sonuçlarını toplayarak, ABD evre Koruma Grubunun Gen-toks Programı dahilinde değerdirmeye almışlardır. Memelilerin kan ve kemik iliğinde in vivo çalışılmış olan

414 bileşiğin sadece 220'sinin kriterlere uygun test edilebildiği ortaya çıkmıştır. Uygun test edilen kimyasallar arasında karsinojenlerin oranı %'91 olarak saptanmış; ancak negatif testlerin azlığı ciddi bir eksiklik olarak bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda esas alınan ve yıllar önce Schmid (Cruz *et al.* 1994) tarafından tanımlanan MN test protokolünün modifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu ve daha fazla çalışmanın gerekli olduğu vurgulanmıştır.

Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN çalışmaları yanında, 13 Eylül 1987'de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek için kullanılmıştır. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış gözlenmiş ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerilmiştir. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte ele alınarak değerlendirilmiştir. (Cruz *et al.* 1994). Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonizan radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisini açıkça ortaya konulmuş ve ayrıca mikro dalga ışınların, anöploidi uyaran bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğu gösterilmiştir. (Jagetia *et al.* 2001; Yoshida *et al.* 2001; Jagetia and Jacob 1994).

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

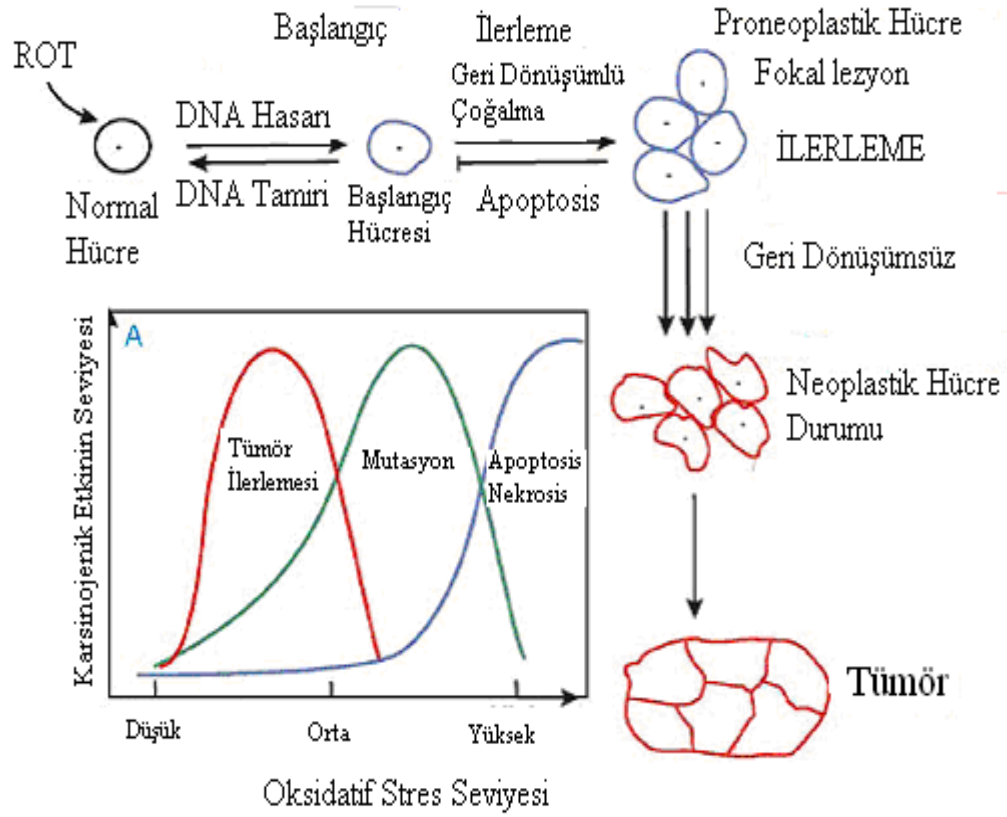
Sonuç olarak; sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir bir test olarak kabul edilmiştir (Demirel ve Zamani 2002).

2.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren molekül ya da atomlardır (Woods *et al.* 2001). Elektronların bu dizilimi kararsız olduğundan radikaller hızlı bir şekilde diğer moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan en etkili serbest radikaller ROT'tur. (Basu 1999; Woods *et al.* 2001).

Organizmalardaki en aktif ROT üreticileri fagositoz hücreleridir. Çeşitli metabolik yangırlarla uyarıldıklarında, oksijeni indirgeyerek hidroksil radikali (OH[•]), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve superoksit (O₂^{•-}) gibi ROT'ları oluştururlar. Diğer ROT kaynakları; yine oksijenin katıldığı mitokondriyal elektron taşıma zinciri, doymamış yağ asitlerinin ve katesolaminlerin oksidasyonu ile NADPH bağımlı oksidazlardır (Basu 1999; Thannickal and Fanburg 2000).

ROT üretimi hem ekzojen hem de endojen kaynaklı olabilmektedir. Ekzojen kaynaklar: Hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüsler (Halliwell and Gutteridge 2001). Endojen kaynaklar: Mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (Sitokrom P450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir (Akkuş 1996).



Şekil 2.8. Oksidatif stres seviyesinin hücrelerde meydana getirdiği etkiler (Valko *et al.* 2006)

* Şekil 2.8.'de görüldüğü gibi oksidatif stresin düşük seviyede olması tümör oluşumunu teşvik ederken, orta seviyede mutasyonlara, yüksek seviyede oksidatif stres ise hücre ölümlerine neden olmaktadır (Valko *et al.* 2006).

Çizelge 2.2. Papas (1999)'a göre ROT nin oluşumu (Turna 2008)

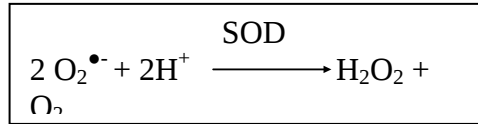
Aktif oksijen türleri	Oluşum
Süperoksit($O_2^{\bullet-}$)	Oksijenin, enzimatik veya nonenzimatik yolla bir elektron redüksiyonu
Hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$)	Suyun radyolizi, H_2O_2 'in metal-katalizli parçalanması, NO ve $O_2^{\bullet-}$ etkileşmesi
Alkoksil ve peroksil radikalleri ($LO^{\bullet}$),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

ROT'lerinin başlıcaları süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijeni, peroksil ve alkoksil radikalleridir.

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

Nordberg ve Arner (2001)'e göre moleküler oksijenin indirgeyici bir ajandan bir elektron alması sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşur. Çok reaktif bir serbest radikal değildir. Süperoksit nötral çözeltilerde negatif yüklüdür, lipit membranlara penetre olma özelliği yoktur, biyomembranları sadece anyon kanalları yoluyla aşabilmektedir ve bu nedenle üretildiği kısımda kalmaktadır (Turna 2008).

Süperoksit radikali oluştuğu yerden fazla uzağa gidemez. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla hasar veremez, asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali sulu çözeltilerde H_2O_2 oluşturmaktadır. Süperoksitlerden biri elektronlarını diğerine verir, böylece birinci süperoksit O_2 'ye okside olurken ikinci süperoksit H_2O_2 'e redükte olur. Bu reaksiyon dismutasyon olarak adlandırılır (Gutteridge and Halliwell 1994).



Süperoksit genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde ortamın pH'ına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda peroksit radikali (HO_2) ismini alır (Cherubini *et al.* 2005).

Süperoksit radikalının kimyasal davranışı nerede çözündüğüne göre değişir. Suda süperoksit çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak okside edici ajan olarak davranabilir. Buna örnek olarak askorbik asidin oksitlenmesi verilebilir (Gutteridge and Halliwell 1994).



Artmış süperoksit düzeyleri ise SOD enzimiyle H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyi sıkı kontrol altına alınmış olur (Cherubini *et al.* 2005).

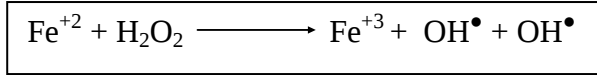
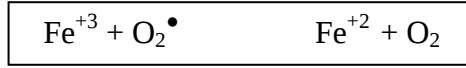
2.5.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında eşlenmemiş elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz (Halliwell and Gutteridge 1984). Üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Cherubini *et al.* 2005). Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü gibi davranmasıdır (Halliwell *et al.* 1984).

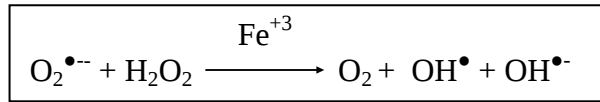
2.5.3. Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\bullet}$)

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\text{OH}^{\bullet}$, su dahil, ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler $\text{OH}^{\bullet}$ 'ın eşlenmemiş elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell *et al.* 1984). Aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğuyla reaksiyona girebilirler. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır (Cherubini *et al.* 2005). Başka yere göç edecek kadar uzun ömürlü değildir (Gutteridge and Halliwell 1994).

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



Doğal enzimler ve glutasyon yetersiz düzeyde iseler süperoksit ve hidrojen peroksit ortamda serbestleşmiş halde bulunan Fe^{+3} veya Cu^{+2} katalizörlüğünde birbirleriyle reaksiyona girerek en güçlü radikal olan $\text{OH}^\bullet$ molekülünü oluşturur. Bu reaksiyona Haber-Weis reaksiyonu denir (Aruoma *et al.*1991).



Hidroksil radikali yüksek enerjili iyonize radyasyon ile suyun radyolizi sonucu oluşabilmektedir (Gutteridge and Halliwell 1994). Hidroksil radikali, UV ile indüklenen hidrojen peroksitin O-O bağlarının homolitik kırılması sonucu da oluşmaktadır (Halliwell and Gutteridge 1996). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden $\text{OH}^\bullet$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998).

2.5.4. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijen molekül yapısında iki adet eşlenmemiş elektron taşır. İhtiva ettiği yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönüşebilir veya kovalent tepkimelere girerler (Stahl and Sies 2002).

2.5.5. Peroksil ($\text{ROO}^\bullet$) ve alkoksil ($\text{RO}^\bullet$) radikalleri

Karbon merkezli radikaller, lipit, nükleik asit, karbonhidrat, protein gibi biyolojik moleküllerin hidroksil grubu ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Bunlar hızlı bir şekilde O_2 ile reaksiyona girerek peroksi radikalini ($\text{ROO}^\bullet$) oluşturur. Peroksi radikalinden de alkoksil radikali ($\text{RO}^\bullet$) oluşabilir. Peroksil radikalleri askorbat ve NADH'ı okside etmekte; oksijen varlığında NADH'ın oksidasyonu ise süperoksit oluşumuna yol açmaktadır. Peroksil radikalleri ayrıca singlet oksijen oluşturmak üzere birbirleriyle reaksiyona girebilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1996).

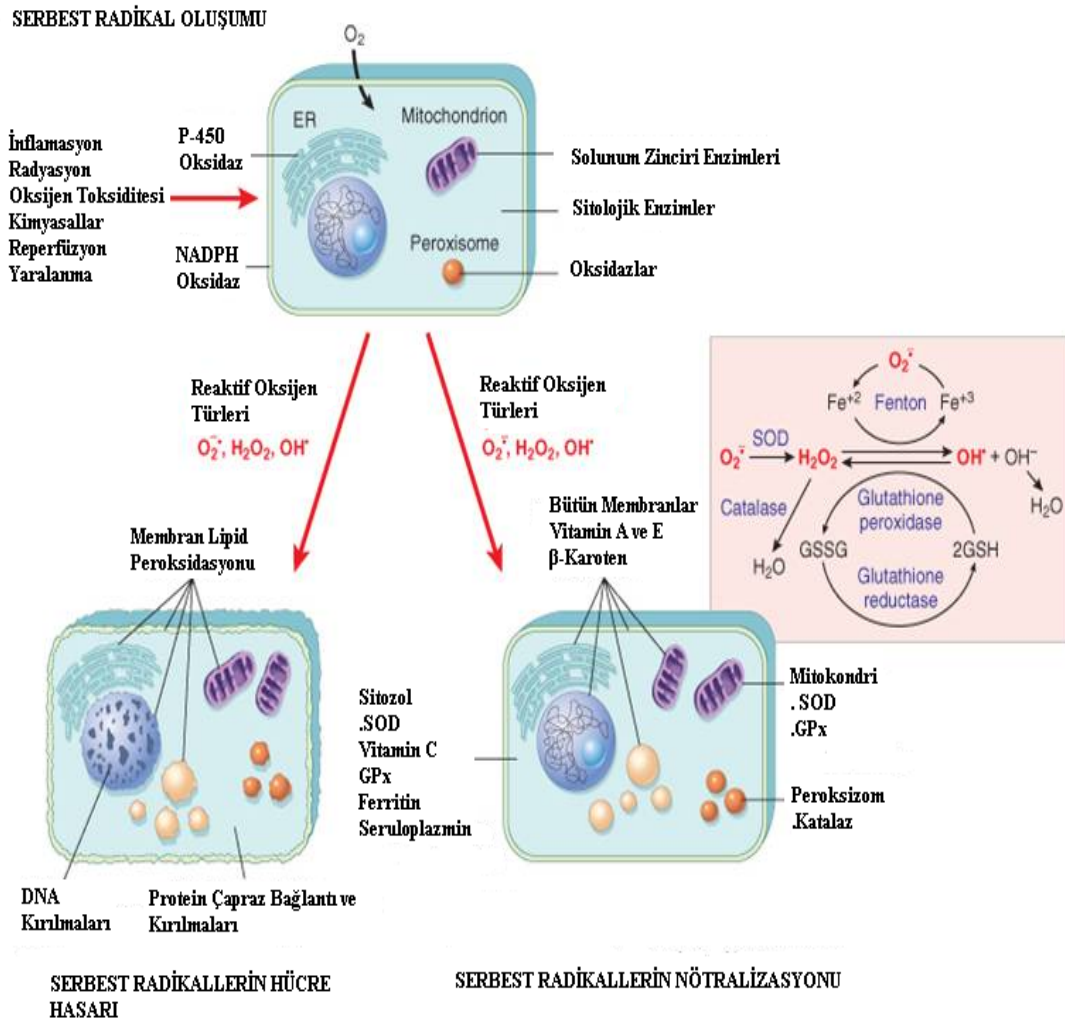
Genel olarak hücredeki ROT'nin oluşumu ve oluşan ROT'nin hasar meydana getirdiği hücre yapıları ve bunları etkisiz hale getiren antioksidan sistemler Şekil 2.9'de gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan özelliğe sahip SOD, GPx, GR gibi enzimlerle GSH ın ROT'leri ile etkileşimi ile Fe atomlarının etkisinde Şekil 2.9'da gösterilmiştir.

2.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır (Powell 2000). Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır.

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

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



Şekil 2.9. ROT ve antioksidanlar (Erdemli 2006)

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, CAT ve GPx enzimleridir. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez, GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak ta adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten sorumludur. SOD, GPx ve CAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitamini de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Her ikisi de hücre membranlarındaki lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine, hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (Halliwell 1991).

Antioksidan bileşiklerin etki şekli ve etkinlik düzeyi oldukça farklıdır. Genelde antioksidanlar reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı veya yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi oldukça farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan bilinen bu etki şekillerinden birçoğunu yerine getirebilme özelliğine sahiptir (Biewenga *et al.* 1994).

Cherubini ve arkadaşlarına (2005) göre biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir. Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Temizleme (Scavenging) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından gerçekleştirilir.
2. Baskılama (Quencher) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi: Serbest radikallerin meydana getirdiği zararlı etkinin onarılmasıdır.

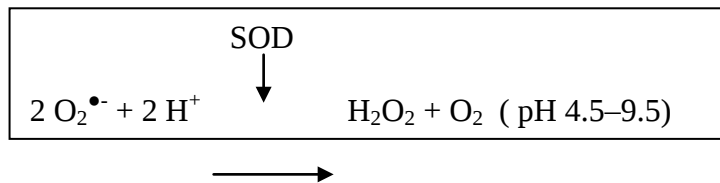
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (Turna 2008).

2.6.1. Enzimatik antioksidanlar

En önemli enzimatik antioksidantlar SOD ve GPx'tir.

2.6.1.a. Süperoksit dismutaz (SOD)

Hücre içi antioksidanların en önemlilerinden biridir. Antioksidan bir enzim olan SOD $O_2^{\cdot-}$ yi O_2 'ye ve daha az reaktif olan H_2O_2 'ye katalizler. 1939'ların başlarında izole edilen SOD' un antioksidan aktivitesi 1969'da McCord ve Fridovich tarafından tespit edilmiştir (Mc Cord and Fridovich 1969). İnsanlarda SOD enziminin 3 formu vardır. Sitozolda bulunan Cu ve Zn-SOD, mitokondride bulunan Mn-SOD ve ekstraselular SOD (EC-SOD) dur (Landis and Tower 2005).



Cu-Zn SOD: Genellikle sitozolde ve lizozom organellerinde bulunur. Cu-Zn SOD enzimi 32 kDa molekül ağırlığında iki alt birimden oluşmuştur. Her bir alt birim bakır ve çinkodan oluşan küme halinde iki çekirdekli aktif bölge bulundurur. Enzim aktivitesi pH'ın 5–9.5 olmasına bağlıdır. Cu ve Zn atomları arasındaki köprü histaminle sağlanır. Cu-Zn SOD'un antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığına inanılır (Mates 1999).

Mn-SOD (Mitokondrial SOD): Mitokondride bulunur ve kofaktörü mangandır. Mn-SOD'lar bakterilerden yüksek yapılı organizmalar kadar, pek çok kaynaktan izole edilmiştir. Yüksek yapılı organizmalardan elde edilen tüm Mn-SOD'lar tetramerdir ve

her alt ünite de bir Mn^{+2} iyonu içerirler (Fridovich 1985). Mn-SOD en etkili antitümör aktiviteye sahiptir (Behrend 2003). Mn-SOD 96 kDa molekül ağırlığındadır (Mates 1999).

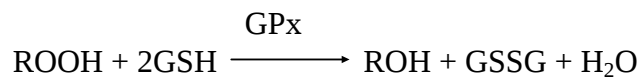
Ekstraselüler SOD (EC-SOD) tetramerik bir proteindir, ekstrasellüler bölümlere salgılanır. Heparin bir domaine sahiptir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir. Cu-Zn SOD enzimi gibi EC-SOD enziminin de kofaktörleri çinko ve bakırdır (Mates 1999).

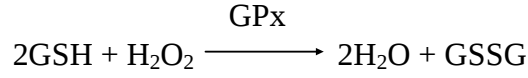
Bu üç çeşit SOD enziminin dışında son zamanlarda *Streptomyces*'lerde keşfedilen Ni-SOD enzimi vardır. 117 aminoasitlik küçük bir proteine sahip bu enzim diğer SOD enzimleri ile sekans homolojisi göstermemektedir (Barondeau 2004).

2.6.1.b. Glutasyon peroksidaz (GPx)

GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanıdır. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur (Armstrong 1998). H_2O_2 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller (Kalaycıoğlu vd 1998) ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GPx ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyum yapılarında bulundurulur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Brigelius and Flohe 1999; Karagül vd 2000).

GPx ilk kez 1957'de Mills tarafından tanımlanmıştır. Glutasyon sisteminin ilk enzimi olan GPx, lipid peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger, bunu yaparken de GSH'ı kofaktör olarak kullanır (Bukan 1999).





Mates (1999)'e göre üç peptidli glutasyonu (GSH) kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan hidrojen peroksidi de ortadan kaldırabilme özelliğine sahiptir. GPx'ın selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki tipi vardır. Farklı substratları kullanırlar. Selenyum bağımlı formu sitoplazmada bulunur ve düşük bir kapasiteye sahiptir.

Selenyum bağımsız formu ise organik hidrojen peroksitleri kullanır ve daha yüksek bir aktiviteye sahiptir. Glutasyon metabolizması antioksidan savunma sistemlerinden en önemlilerinden biridir. İnsan dokuları majör peroksit uzaklaştırıcı enzim olarak GPx içermektedir. İnsanlarda selenyuma bağlı 4 farklı GPx vardır (Turna 2008).

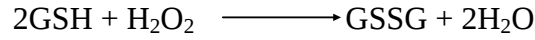
CAT ve SOD başlıca membranın hidrofilik bölgelerinde etki gösterir. Glutasyon peroksidaz ise hidrofobik membran komponentlerinde lipid peroksidasyonuna karşı indirekt olarak koruyucu etki yapmaktadır. Dolayısıyla glutasyon peroksidaz, CAT ve SOD'un kombine bulunduğu durumlarda serbest radikal ataklarına karşı hücre bütünlüğünün korunmasında daha etkili olmaktadır (Mates 1999). E vitamini yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı GPx korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır (Chao *et al.* 2002).

2.6.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.6.2.a. Glutasyon (GSH)

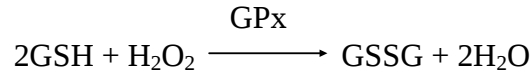
GSH ise önemli bir intraselüler antioksidandır. Okside edilmiş şekli, serbest radikallerinin inhibisyonunda (Boehme *et al.* 1992), indirgenmiş sülfidril gruplarının

stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Armstrong 1998). Ayrıca GPx'in kofaktörü olarak da görev yapar (Boehme *et al.* 1992).



Glutasyon sitozolde bol miktarda bulunur. Sitozolde (1–11 mM), nukleusta (3–15 mM) ve mitokondride (5–11 mM) bulunur, ayrıca suda çözünür (Masella *et al.* 2005). Tabiatı yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş ve glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Ancak 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmıştır (Gözükara 1997).

Glutasyon sistein içeren bir tripeptid olup glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Glutasyon hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tioldür. Doku GSH düzeyi sadece senteze katılan enzimler tarafından düzenlenmez, tiol içeren aminoasitlerin yeterince olması da oldukça önemlidir (Parcell 2002). GSH'ın antioksidan özelliği bulundurduğu –SH grubundan veya koenzim veya kofaktör olarak görev yaptığı enzimlerin ROT'lerini etkisizleştirmelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Janssen *et al.* 1993). *In vivo* sentezlenebilen ve ince bağırsaktan kısmen emilebilen GSH endojen ve eksojen bir antioksidandır. Glutasyon, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrat olup ksenobiyotik ve ROT'nin detoksifikasyonuna katılır. Ayrıca, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (Parcell 2002). GPx GSH' ın GSSG' ye oksitlenme reaksiyonunu katalizler. GSH ile GSSG arasındaki dinamik dengenin korunabilmesi için glutasyonun oksitlenmiş formu (GSSG) glutasyon redüktaz (GSSG-red) enzimi ile GSH'a indirgenir ve kofaktör olarak NADPH kullanılır (Luberda 2005).



GSH eksikliği hücre ölümüne yol açabilir. Karaciğer iki GSH havuzuna sahiptir. Birincisinin yarı ömrü 2–4 saat ve sitozoliktir, ikincisinin yarı ömrü 30 saattir ve mitokondriyaldir. Ökaryotik hücrelerde GSH'nin %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride, çok azı da endoplazmik retikulumda bulunur. GSH oksidasyonu, apoptozis sürecin erken belirticidir ve metabolik sinyal gibi davranabilir. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Masella *et al.* 2005).

3.MATERYAL ve METOD

3.1.Deney Bitkilerinin Temini ve Teşhisi

Bu araştırma döneminde çalışma materyali olarak bölgemizde bulabileceğimiz *Cetraria islandica* (ATA-KKEF-460), *Cladonia rangiformis* (ATA-KKEF-461), *Lecanora muralis* (ATA-KKEF-462), *Parmelia somloensis* (ATA-KKEF-463), *Rhizoplaca chrysoleuca* (ATA-KKEF-464), *Umbilicaria vellea* (ATA-KKEF-465), *Usnea longissima* (ATA-KKEF-466), isimli farklı liken türleri tercih edildi. Liken örnekleri, 2008–2009 yıllarının Haziran-Eylül aylarında muhtelif zaman aralıklarıyla Artvin, Erzurum, Giresun illeri ve çevresinden toplandıktan sonra uluslararası teşhis yöntemleri kullanılarak Dr. Ali Aslan tarafından türlerin teşhisi yapıldı (Aslan 2000; Aslan vd 2002; Purvis *et al.* 1992). Liken türlerin birer herbaryum örneğinde Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Herbaryumu'nda depolanmıştır.

3.2. Bitki Türlerinin Ekstraksiyonu ve Etken Maddelerin İzolasyonu

Liken örnekleri toplandıktan sonra yabancı maddelerden temizlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuru örnekler bir havanda sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. Her bir liken türünün 10 g örneği ayrı ayrı metanol ekstraksiyonu soksoletle hazırlandı, daha sonra evapore edilerek 4°C'ta muhafaza edildi. Likenlerimiz 5µg/ml ve 10µg/ml olacak şekilde hazırlandı. 0.012 gr liken %10'luk 10 mL DMSO'da çözüldü. Hazırladığımız bu stoktan 250 µl kültür ortamına katılınca medium ortamında son konsantrasyon 5µg/ml oldu ve 500 µl kültür ortamına katılınca medium ortamında son konsantrasyon 10 µg/ml oldu.

3.3. KDD Analizi

3.3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

RPMP-1640

Fitohemaglutinin (FHA)

Fetal Bovine Serum (FBS)

Karyotyping Medium Peripheral Blood (Biological Industries)

L-Glutamine

Penisiline-Streptomisin (PS)

Kolşemide solüsyonu (Biological Industries)

KCl (MERCK)

KH₂PO₄ (MERCK)

Na₂HPO₄ (MERCK)

Giemsa boyası (MERCK)

Asetik asit (MERCK)

Methanol (MERCK)

5-Bromo-2-deoksiüridin (BrdU) (Sigma)

Hoechst 33258 (Sigma)

Aflatoxin B₁ (Sigma)

DMSO (Dimetil sulfoxide)

3.3.2 Kullanılan alet ve cihazlar

Elektronik terazi (Precisa 160 M)

pH metre (Jenway 3010)

Santrifüj (nüve CN180, NF048)

Mikroskop (Olympus BX2)

Mikroskop (Nikon)

Kromozom Görüntüleme (Nikon)

UV kaynağı

Su banyosu (Nüve BM402)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica)

Cam erlen mayer

Cam mezür

Cam şale

Plastik pastör pipeti

Kültür tüpleri

3.3.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

AFB₁ çözeltisinin hazırlanması

10 mg AFB₁ %10'luk 10 mL DMSO'da çözüldü. Bu çözeltiden 2.5 mL alınarak üzeri 1 L'ye distile su ile tamamlandı. 800 μ M'lık stok çözelti hazırlandı. Bu stoktan kültür ortamına 0.5 mL katılınca medium ortamında son konsantrasyon 10^{-5} olarak ayarlandı.

Tespit solüsyonunun hazırlanması

1/3 asetik asit metanol

Hipotonik solüsyonun hazırlanması

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

Hoechst 33258 stok çözeltisi hazırlanması

25 mg'lık Hoechst 33258 (sigma) şişesi 5 mL distile su ile sulandırıldı. Karanlık ortamda -20°C'de saklandı.

Hoechst 33258 çalışma çözeltisi hazırlanması

1 mL Hoechst 33258 Stok Çözeltisi ile 99 mL PBS çözeltisi taze hazırlanarak kullanıldı.

5-bromo–2-deoksiüridin çözeltisinin hazırlanması

5-Bromo–2-deoksiüridin (BrdU) (Sigma) 0.0026 g tartıldı ve 5 mL RPMI 1640 ile sulandırıldı. Alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda +4°C’de saklandı. Kültürde son konsantrasyon 10^{-2} M olacak şekilde ayarlandı.

20XSSC çözeltisinin hazırlanması

175.3 gr NaCl ve 88.2 gr Na-Sitrat 800 mL distile suda çözüldü ve toplam hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

2XSSC çözeltisinin hazırlanması

100 mL 20XSSC solüsyonuna 850 mL distile su eklendi. pH NaOH ile 7.0’ye ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

PBS çözeltisinin hazırlanması

0.2 gr KCl + 0.2 gr KH_2PO_4 + 8 gr NaCl + 1.15 gr (anhidro) Na_2HPO_4 1 litre distile suda çözüldü (pH 7.0)

Boya solüsyonunun hazırlanması

9.08 gr/L KH_2PO_4 , 14.8 gr/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hazırlandı. 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alınıp üzerine 40 mL KH_2PO_4 solüsyonu eklenerek pH 6.8’e ayarlandı.

Lenfosit Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Saklanması

100 mL RPMI-1640

20 mL FBS

5 mL FHA

2 mL L-Glutamine

1 mL PS

Hazırlanan solusyon 7.5 mL olacak şekilde steril hücre kültür tüplerine paylaştırıldı. Kullanım zamanına kadar -20°C’de saklandı.

3.3.4. Donör seçimi

Sağlıklı 25 ile 35 yaş arasında 2 erkek ve 2 kadından oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 4 donör seçildi. Donörler sigara kullanmayanlar arasından seçildi (pasif içicide olmadıkları belirlenerek). Son 6 ay içerisinde her hangi bir nedenle antibiyotik, X-Ray almadıkları, bilinen veya tanımlanan akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanları ile kabul edildi. Donörlerden deneye başlanacağı saatte kan alındı.

3.3.5. Deney düzeneğinin oluşturulması

Daha önce hazırlanan besi yerleri -20°C'den çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlandı. Oda ısısına gelen besi yerine aşağıda planlanan kimyasallar, belirlenen oranlarda steril (filtre) edilerek eklendi. Bu işlemler sonrasında belirlenen donörden alınan kan örneklerinden 1 mL eklendi (her bir tüp için). Bu deney düzeneği toplam 4 donör için tekrarlandı.

Kültür 1: Sadece besi yeri

Kültür 2: Besi yeri + 5 μ M AFB₁

Kültür 3: Besi yeri + 10 μ M AFB₁

Kültür 4: Besi yeri + 5 μ M AFB₁ + 5 μ g/ml liken

Kültür 5: Besi yeri + 5 μ M AFB₁ + 10 μ g/ml liken

Kültür 6: Besi yeri + 10 μ M AFB₁ + 5 μ g/ml liken

Kültür 7: Besi yeri + 10 μ M AFB₁ + 10 μ g/ml liken

3.3.6. Lenfosit kültürü

Donörlerden alınan periferik kan örneği ve ilgili kimyasallar ile hazırlanan 8 mL'lik hücre kültür tüpüne 5 damla 10^{-2} M stok BrdU çözeltisi eklenerek 72 saat 37°C'de kapalı hücre kültürüne alındı. Kültür tüpleri aliminyum folya ile sarılarak karanlık ortam sağlandı.

Kültürün 69. saatinde her kültür tüpüne 5 damla kolşisin solüsyonu eklendi.

72. saatte kültüre edilen tüpler 1000 rpm’de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı biyokimyasal analizler için ayrıldı.

Pellet üzerine hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) eklendi ve tüpler 25 dakika 37°C’lik etüvde bekletildi.

1000 rpm’de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1:3 oranında soğuk asetik asit metanol karışımı eklenerek tespit işlemi gerçekleştirildi.

Tespit işlemi toplam üç kez tekrarlandı. Tespit işlemi sonunda süpernatantın 1–1.5 mL’lik alt kısmı hariç diğer bölümü atıldı.

Dipte kalan pellet çalkalanarak resüspanse edildikten sonra soğuk tespit içinde bekleyen lamaların her birine 5–6 damla bu süspansiyondan damlatılarak 5 lam hazırlandı.

Hazırlanan preparatlar üç gün oda sıcaklığında bekletilerek yaşlandırıldı.

Bu süre sonunda her bir preparat floresan plus giemsa tekniği ile boyandı.

3.3.7. Floresan plus giemsa tekniği ile boyama

Bu işlem sırası ile şu şekilde tatbik edildi;

Üç gün oda ısısında kurutulan preparatlar 100 mL PBS tampon çözeltisi bulunan alüminyum folyoya sarılı temiz bir şalede 5 dakika oda ısısında bekletildi.

Süre sonunda şaleden çıkarılan preparatlar 0.5 µgr/mL konsantrasyondaki stok Hoechst 33258 solüsyonundan 1/100 oranında PBS tampon çözeltisi içerisinde hazırlanarak bu solüsyonda 10 dakika karanlık ortamda bekletildi.

1–2 saniye PBS’te yıkanan preparatlar bir kaba horizontal olarak dizilip üzerlerine lamel kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar 13 cm yükseklikte bulunan UV lambasının altında 25 dakika bekletildi.

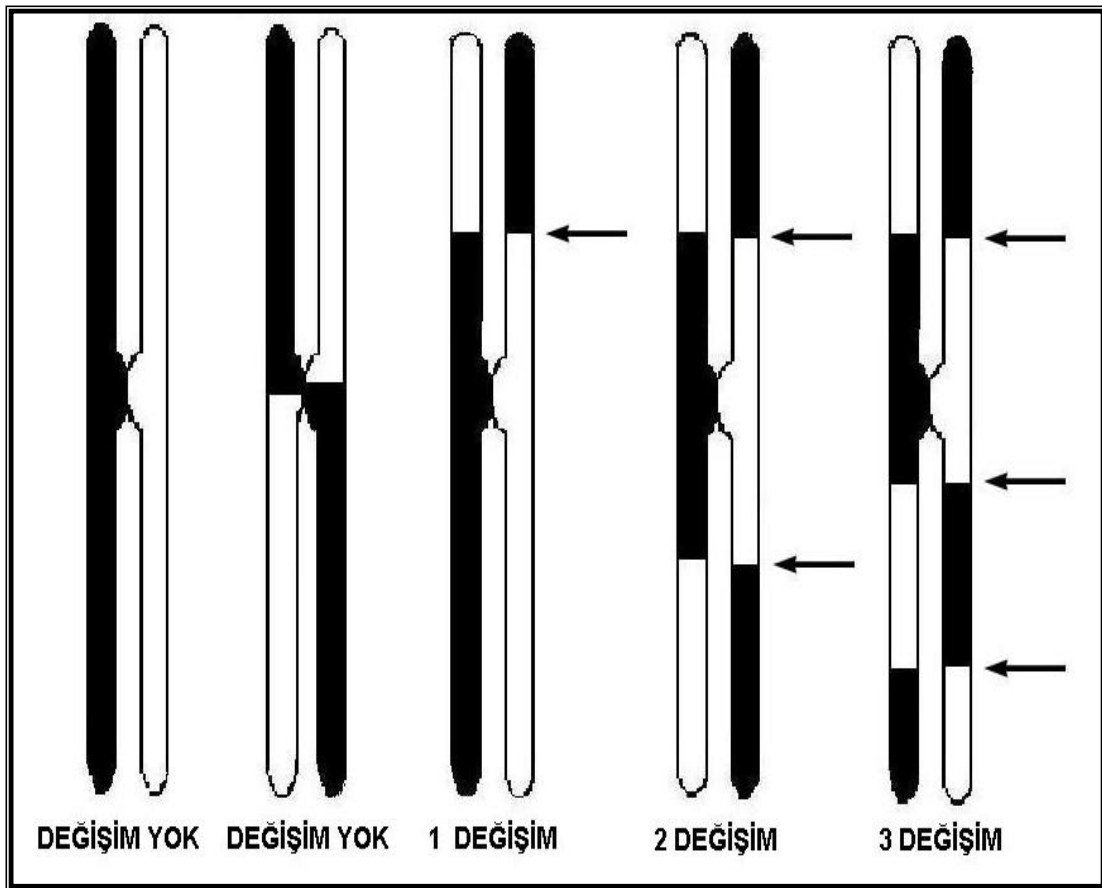
Preparatlardan lameller kaldırılarak 65°C’deki 2XSSC solüsyonu içinde 15 dakika bekletildi.

2XSSC solüsyonundan çıkartılan preparatlar distile su ile yıkandı.

Preparatlar 5 dakika Giemsa boyasında tutularak boyandı ve incelemeye alındı.

3.3.8. KKD sayımı

Her bir donör için en az 20 metafaz mikroskopta (Olympus BX50 100x büyütmede) değerlendirildi. Her kromozomda koyu boyalı KKD bölgelerinin bir kromatitten diğerine atladığı bölgeler bir adet değişim olarak kabul edildi. Aynı kromozom üzerinde 1 den fazla geçiş görüldüğü durumlarda bunların her biri ayrı ayrı sayıldı. Sentromerden geçiş gösteren bölgeler değerlendirmeye alınmadı (Şekil 3.1.). Planlanan deney düzeneğine uygun olarak her bir donörden alınan kan örnekleri ve uygulanan kimyasalların farklı konsantrasyonları için ayrı ayrı olmak üzere ortalama KKD sıklığı belirlendi.



Şekil 3.1. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler

3.4. MN Analizi

3.4.1. Kullanılan kimyasal maddeler

RPMI-1640

Fitohemaglutinin (FHA)

Fetal Bovine Serum (FBS)

L-Glutamine

Karyotyping Medium Peripheral Blood (Biological Industries)

Penisiline-Streptomisin (PS)

KCl (MERCK)

KH₂PO₄ (MERCK)

Na₂HPO₄ (MERCK)

Giemsa boyası (MERCK)

Asetik asit (MERCK)

Metanol (MERCK)

Aflatoxin B₁ (Sigma)

DMSO (Dimetil sulfoxide)

Cytochalasin B (Sigma)

3.4.2 Kullanılan alet ve cihazlar

Elektronik terazi (Precisa 160 M)

pH metre (Jenway 3010)

Santrifüj (nüve CN180, NF048)

Mikroskop (Olympus BX2)

Mikroskop (Nikon)

Kromozom Görüntüleme (Nikon)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica)

Cam erlen mayer

Cam mezür

Cam şale

Plastik pastör pipeti

Kültür tüpleri

Etüv

3.4.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Tespit solüsyonunun hazırlanması

1/3 asetik asit metanol

Hipotonik solüsyonun hazırlanması

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

Boya solüsyonunun hazırlanması

9.08 gr/L KH_2PO_4 , 14.8 gr/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hazırlandı. 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alınıp üzerine 40 mL KH_2PO_4 solüsyonu eklenerek pH 6.8'e ayarlandı.

Lenfosit besi yerlerinin hazırlanması ve saklanması

100 mL RPMI-1640

20 mL FBS

5 mL FHA

2 mL L-Glutamine

1 mL PS

Karyotyping Medium Peripheral Blood Biological Industries

Hazırlanan solüsyon 7.5 mL olacak şekilde steril hücre kültür tüplerine paylaştırıldı.

Kullanım zamanına kadar -20°C 'de saklandı.

3.4.4. Donör seçimi

Sağlıklı 25 ile 35 yaş arasında 2 erkek ve 2 kadından oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 4 donör seçildi. Donörler sigara kullanmayanlar arasından seçildi (pasif içicide olmadıkları belirlenerek). Son 6 ay içerisinde her hangi bir nedenle antibiyotik, X-Ray almadıkları, bilinen veya tanımlanan akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanları ile kabul edildi. Donörlerden deneye başlanacağı saatte kan alındı.

3.4.5. Deney düzeneğinin oluşturulması

Daha önce hazırlanan besi yerleri -20°C'den çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlandı. Oda ısısına gelen besi yerine aşağıda planlanan kimyasallar, belirlenen oranlarda steril (filtre) edilerek eklendi. Bu işlemler sonrasında belirlenen donörden alınan kan örneklerinden 1 mL eklendi (her bir tüp için). Bu deney düzeneği toplam 4 donör için tekrarlandı.

Kültür 1: Sadece besi yeri

Kültür 2: Besi yeri + 5 μ M AFB₁

Kültür 3: Besi yeri + 10 μ M AFB₁

Kültür 4: Besi yeri + 5 μ M AFB₁ + 5 μ g/ml liken

Kültür 5: Besi yeri + 5 μ M AFB₁ + 10 μ g/ml liken

Kültür 6: Besi yeri + 10 μ M AFB₁ + 5 μ g/ml liken

Kültür 7: Besi yeri + 10 μ M AFB₁ + 10 μ g/ml liken

3.4.6. Lenfosit kültürü

Donörlerden alınan periferik kan örneği ve ilgili kimyasallar ile hazırlanan 8 mL'lik hücre kültür tüpünü 72 saat 37°C'de kapalı hücre kültürüne alındı. Kültürün 44. Saatinde her bir tüpe 6 μ g/ml Cytochalasin B ilave edildi.

72. saatte kültüre edilen tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı biyokimyasal analizler için ayrıldı.

Pellet üzerine hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) eklendi ve tüpler 25 dakika 37°C'lik etüvde bekletildi.

1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1:3 oranında soğuk asetik asit metanol karışımı eklenerek tespit işlemi gerçekleştirildi.

Tespit işlemi toplam üç kez tekrarlandı. Tespit işlemi sonunda süpernatantın 1–1.5 mL'lik alt kısmı hariç diğer bölümü atıldı.

Dipte kalan pellet çalkalanarak resüspanse edildikten sonra soğuk tespit içinde bekleyen lamaların her birine 5–6 damla bu süspansiyondan damlatılarak 5 lam hazırlandı.

Hazırlanan preparatlar üç gün oda sıcaklığında bekletilerek yaşlandırıldı.

Bu süre sonunda her bir preparat giemsa boyası ile boyandı.

3.4.7 Giemsa ile boyama

Bu işlem sırası ile şu şekilde tatbik edildi;

Üç gün oda ısısında kurutulan preparatlar Giemsa boyası ile 10 dk boyandı ve incelemeye alındı.

3. 5. SOD, GPx, MDA Ölçümü

SOD, GPx, MDA, Ölçümü için 72 saat kültüre edilen tüpler 1000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısmı analiz için kullanıldı.

3. 5. 1. Superoksit dismutaz (SOD) ölçümü:

Kullanılan reaktifler:

* Deney reaktifi (Ksantin 0.3 mM; EDTA 0.6 mM; NBT 150 µM; Na₂CO₃ 4 M; BSA 1 gr/L)

* Ksantin oksidaz 167 U/L

Cu,Zn-SOD aktivitesi hücre kültürü süpernatantında Sun ve arkadaşlarının tarif ettiği metod kullanılarak ölçüldü (Sun *et al.* 1988). 100 µl numune üzerine 2.45 mL assay reaktifi (0.3 mM xanthine, 0.6 mM Na₂EDTA, 0.15 mM NBT, 0.4 M Na₂CO₃, 1 g/L bovine serum albumin (BSA) katıldı. Ksantin oksidaz (50 µl, 167 U/L) ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksit anyon radikalleri tarafından NBT’nin indirgenmesi ile oluşan absorbans değişimi 560 nm de ölçüldü. NBT’nin indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesi 1 enzim ünitesi olarak tanımlandı. Cu, Zn-SOD aktivitesi mg proteinde SOD ünitesi olarak ifade edildi.

3. 5. 2. Glutasyon peroksidaz (GPx) Ölçümü:

Kullanılan Reaktifler:

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

GSH (150 mM)

Glutasyon redüktaz (30 U/mL)

NADPH (8 mM)

NaN₃ (0.12 M)

H₂O₂ (2 mM)

NADPH (8 mM)

GPx aktivitesi, hücre kültürü süpernatantında Paglia ve Valentine metodu ile ölçüldü (Paglia and Valentine 1967). Özetle, bir küvet içerisine 50 µl numune, 100 µl NADPH (8 mM), 100 µl redükte glutatyon (150 mM), 20 µl glutatyon redüktaz (30 U/mL), 20 µl sodyum azid çözeltisi (0.12 M) ve 2.65 mL potasyum fosfat tamponu (50 mM) (pH 7.0, 5 mM EDTA) birleştirildi. 30 dk. 37°C’de inkübe edildi. 100 µl H₂O₂ (2 mM) ilave edilip alt üst edilerek karıştırıldı ve reaksiyon başlatıldı. NADPH’ın NADP’ye dönüşümü 5 dk. 340 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Enzim aktivitesi, 340 nm dalga boyundaki NADPH’ın molar absorbtivite katsayısı (6.22×10^{-6}) kullanılarak hesaplandı ve ünite/gr protein olarak ifade edildi.

3. 5. 3. Malondialdehit (MDA) Ölçümü:

Kullanılan Reaktifler:

% 8.1 sodyum dodesil sulfat

%20 asetik asit

n-bütanol/piridin (15:1, v/v)

EDTA 0.1 M

Tiobarbutirik asit (TBA) çözeltisi % 1

NaOH 0.05 N

MDA seviyesi hücre kültürü süpernatantında Ohkawa tarafından tanımlanan metoda göre spektrofotometrik olarak belirlendi (Ohkawa 1979). Toplam hacim 4 mL olacak şekilde % 8.1 sodyum dodesil sulfat, %20 asetik asit, %0.9 tiobarbiturik asit karışımına 0.2 mL numune eklenerek 1 saat 95°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine 1 mL distile su ile 5 mL n-bütanol/piridin (15:1, v/v) eklendi. Numuneler 4000xg 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatantın 532 nm’de absorbansı ölçüldü ve standart grafik yardımı ile MDA

konsantrasyonu hesaplandı. 1.1.3.3-Tetraetoksipropan standart olarak kullanıldı. MDA konsantrasyonu $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

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

3.6. İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen KKD verileri ile sayı, ortalama ve standart hatalar ($\bar{X} \pm \text{SE}$) hesaplandı. AFB₁'in KKD üzerine etkisi ve liken ekstratlarının nasıl bir ilişki içerisinde olduğu SPSS 11.5 analiz programında T-Testi ile değerlendirildi. Sonuçların $p < 0.05$ olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Elde edilen MN verileri ile sayı, ortalama ve standart hatalar ($\bar{X} \pm \text{SE}$) hesaplandı. AFB₁'in MN üzerine etkisi ve liken ekstratlarının nasıl bir ilişki içerisinde olduğu SPSS 11.5 analiz programında Duncan's ile değerlendirildi. Sonuçların $p < 0.05$ olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

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

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmamızın sonuçları; mutajenite testleri olan Kardeş Kormatid Değişimi (KKD), Mikronukleus (MN) ve biyokimsal analizlerden olan SOD, GPx, MDA için bulgular üç ana başlık halinde verilmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklar her bir değişken grup için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.1. KKD Bulguları

Deney gruplarının her biri için ortalama KKD frekansları ($\pm$ SE) hesaplanmış, donörlara ait KKD frekansları üzerine AFB₁ ve AFB₁ ile beraber yedi liken türünün *Cetraria islandica* (C.İ.M.E.), *Cladonia rangiformis* (C.R.M.E.), *Lecanora muralis* (L.M.M.E.), *Parmelia somloensis* (P.S.M.E.) metanol ekstraktı Çizelge 4.1’de; *Umbilicaria vellea* (U.V.M.E.), *Usnea longissima* (U.L.M.E.)ve *Rhizoplaca chrysoleuca* (R.C.M.E.) metanol ekstraktı Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

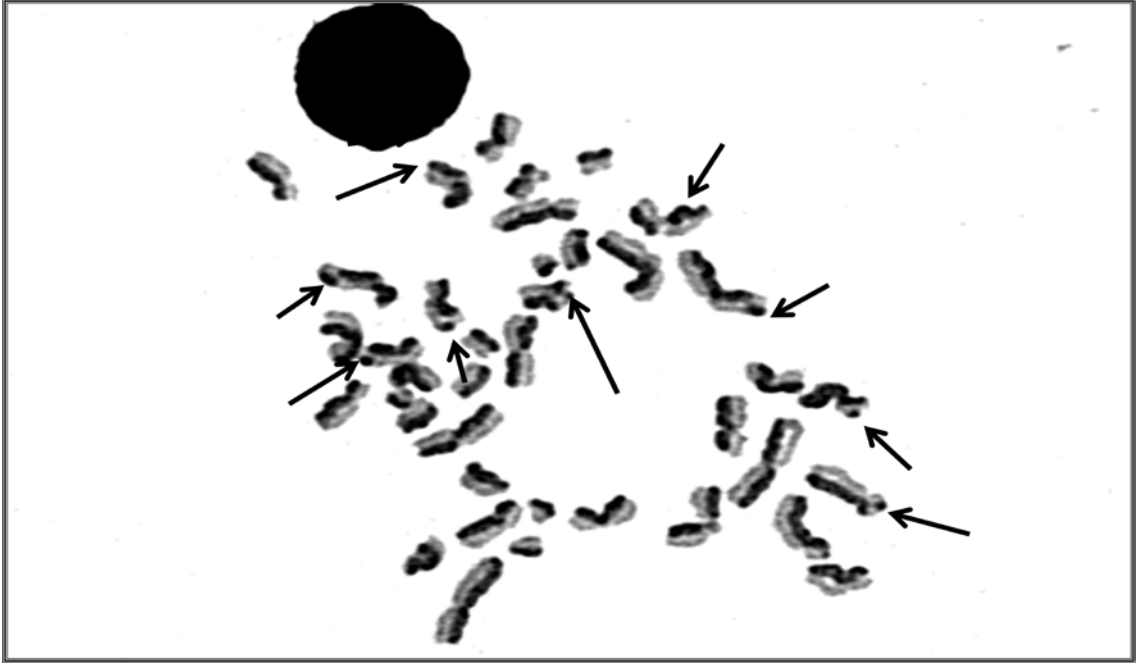
Bütün deney gruplarında elde edilen KKD bulguları değerlendirildiğinde; metafaz alanlarında en az 2, en fazla 17 KKD değişimlerinin bulunduğu gözlenmiştir. Donör kanlarından elde ettiğimiz bazı KKD görüntüleri aşağıda verilmiştir(Şekil 4.1- 4.4.)



Şekil 4.1. Dönörlara ait elde edilen metafaz alanında 11 adet KKD değışimi



Şekil 4.2. Dönörlara ait elde edilen metafaz alanında 13 adet KKD değışimi



Şekil 4.3. Dönörlara ait elde edilen metafaz alanında 9 adet KKD değışimi



Şekil 4.4. Dönörlara ait elde edilen metafaz alanında 14 adet KKD değışimi

AFB₁'in 5 µM dozu verildiğinde KKD frekansı 7.92±1.74 bulunmuştur bu değerimizi kontrol ile kıyaslandığımızda AFB₁'in KKD'yi artırdığı ve istatistiksel olarak önemli bulunduğu tespit edilmiştir.(p<0.001). AFB₁'in 10 µM dozu verildiğinde ise KKD frekansı 8.2±2.49 bulunmuş ve bu değer kontrolle kıyaslandığında istatistiksel açıdan daha anlamlı görülmüştür (p<0.001). AFB₁'in 5 µM konsantrasyonu ile birlikte verildiği C.R.M.E'in 5µg/ml ve 10 µg/ml dozlarındaki verildiğinde KKD frekansları sırasıyla 5.97±1.32, 5.95 ±1.66, 6.75 ±2.04 ve 7.05±2.08 olarak bulunmuştur. Bu değerler C.R.M.E'in AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisini engellediği gösterilmektedir. AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, C.R.M.E'in 5µg/ml dozlarındaki uygulamaların etkisinin daha net olduğu ve istatistik olarak önemli olduğu fakat C.R.M.E'in 10µg/ml'lık dozu ile kontrol grubu arasında KDD değeri birbirine yakın ve istatistiksel olarak da önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. *Cladonia rangiformis* metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları (±SE) ve MN Frekansları (±SE)

	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre	MN/Hücre
Kontrol	20	2-9	5.95±1.75	1.57±0.12
AFB₁ 5 µM	20	4-13	7.92±1.74 ^a	3.17±0.20*
AFB₁ 10 µM	20	6-15	8.2±2.49 ^{ac}	4.45±0.57*
AFB₁(5µM)+C.r. 1	20	5-10	5.97±1.32 ^b	2.1±0.37*
AFB₁(5µM)+ C.r. 2	20	4-9	5.95 ±1.66 ^b	1.58±0.21*
AFB₁(10µM)+C.r. 1	20	3-12	6.75 ±2.04 ^{bd}	2.40±0.65
AFB₁(10µM)+C.r. 2	20	5-14	7.05±2.08 ^a	2.45±0.60

KKD için;

AFB₁ =5 µM, AFB₁ =10 µM, C.r. 1 = 5µg/ml C.R.M.E, C.r. 2 = 10 µg/ml C.R.M.E

^ap<0,001 Kontrole göre, ^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre, ^dp<0,05 AFB₁ 10µM a göre

MN için;

(*) P<0.01 önemli, () önemsiz

AFB₁'in 5 µM konsantrasyonu ile birlikte C.İ.M.E'nin 5µg/ml ve 10 µg/ml dozlarındaki KKD frekansları karşılaştırıldığında C.İ.M.E'nin AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisinin engellendiği görülmüştür özellikle yine diğer likenlerde olduğu gibi özellikle 5µg/ml dozunun Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi daha etkili olduğu gözlenmiştir (P<0.001).

Çizelge.4.2. *Cetraria islandica* metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları (±SE) ve MN Frekansları (±SE)

	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre	MN/Hücre
Kontrol	20	2-8	4.9±1.79	1.91±0.85
AFB₁ 5 µM	20	3-11	6.42±1.79 ^a	3.0±0.65*
AFB₁ 10 µM	20	5-14	7.75±2.41 ^{ac}	4.19±0.19*
AFB₁(5µM)+ C.i. 1	20	4-11	5.02±1.51 ^b	2.82±0.82
AFB₁(5µM)+C.i. 2	20	3-8	4.91 ±1.67 ^b	1.92±0.56*
AFB₁(10µM)+C.i. 1	20	3-10	4.98 ±1,76 ^{bd}	2.05±0.15
AFB₁(10µM)+C.i. 2	20	5-13	4.92±2.40 ^a	1.93±0.8*

KKD için;

AFB₁=5 µM, AFB₁=10 µM, C.i. 1 = 5µg/ml C.İ.M.E, C.i. 2 = 10 µg/ml C.İ.M.E

^ap<0,001 Kontrole göre ^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre ^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre

MN için;

(*) P<0.01 önemli, () önemsiz

AFB₁'in 5 µM verildiği kültürlerin L.M.M.E ;P.S.M.E ve R.C.M.E'nin 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarındaki KKD frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 6.05 ±1.73, 5.87 ±1.65, 6.85 ±2.35 ve 6.82 ±1.93 ; 7.02 ±1.34, 5.82±1.44, 5.85 ±1.95 ve 5.82 ±1.96; 7.02 ±1.34, 5.82±1.44, 5.85 ±1.95 ve 5.82 ±1.96 olarak bulunmuştur. Bu değerler ile L.M.M.E ;P.S.M.E ve R.C.M.E'nin AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisinin engellendiği görülmüştür. AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, özellikle L.M.M.E ;P.S.M.E ve R.C.M.E'nin 5µg/ml dozunun, istatistiksel olarak daha önemli olduğu,diğer dozların ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 4.3.- 4.4.- 4.5.)

Çizelge 4.3. *Lecanora muralis* metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları (±SE) ve MN Frekansları (±SE)

	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre	MN/Hücre
Kontrol	20	2-9	6.2 ±2.22	2.12±0.27
AFB₁ 5 µM	20	4-13	7.02±2.56 ^a	3.8±0.13*
AFB₁ 10 µM	20	6-15	8.3±2.67 ^{ad}	5.64±0.38*
AFB₁(5µM)+ L.m. 1	20	5-10	6.05 ±1.73 ^a	2.30±0.29*
AFB₁(5µM)+L.m. 2	20	4-9	5.87 ±1.65 ^b	2.15±0.11*
AFB₁(10µM)+L.m. 1	20	3-10	6.85 ±2.35 ^{bc}	3.6±0.08
AFB₁(10µM)+L.m. 2	20	5-13	6.82 ±1.93 ^{bc}	3.5±0.35

KKD için;

AFB₁ =5 µM, AFB₁ = 10 µM, L.m. 1 = 5µg/ml L.M.M.E, L.m.2 = 10 µg/ml L.M.M.E

^ap<0,001 Kontrole göre ^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre ^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre

MN için;

(*) P<0.01 önemli, () önemsiz

Çizelge 4.4. *Parmelia somloensis* metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ($\pm$ SE) ve MN Frekansları ($\pm$ SE)

	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre	MN/Hücre
Kontrol	20	2-9	5.25 $\pm$ 1.59	1.90 $\pm$ 0.37
AFB₁ 5 μM	20	4-13	8.15 $\pm$ 2.27 ^a	3.94 $\pm$ 0.06*
AFB₁ 10 μM	20	6-15	8.2 $\pm$ 2.18 ^a	5.15 $\pm$ 0.23*
AFB₁(5μM)+P.s. 1	20	5-10	7.02 $\pm$ 1.34 ^{ac}	3.5 $\pm$ 0.37
AFB₁(5μM)+P.s. 2	20	4-9	5.82 $\pm$ 1.44 ^{be}	3.4 $\pm$ 0.17
AFB₁(10μM)+P.s. 1	20	3-10	5.85 $\pm$ 1.95 ^{ad}	2.01 $\pm$ 0.54*
AFB₁(10μM)+P.s. 2	20	5-13	5.82 $\pm$ 1.96 ^{ad}	1.91 $\pm$ 0.20*

KKD için;

AFB₁=5 μ M, AFB₁=10 μ M, P.s 1.= 5 μ g/ml P.S.M.E, P.s. 2 = 10 μ g/ml P.S.M.E

^ap<0,001 Kontrole göre, ^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5 μ M a göre, ^dp<0,001 AFB₁ 10 μ M a göre, ^ep<0,001 AFB₁ 5 μ M göre

MN için;

(*) P<0.01 önemli, () önemsiz

Çizelge 4.5. *Rhizoplaca chrysoleuca* metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ($\pm$ SE) ve MN Frekansları ($\pm$ SE)

	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre	MN/Hücre
Kontrol	20	3-8	6.2 $\pm$ 1.69	2.37 $\pm$ 0.39
AFB₁ 5 μM	20	4-12	7.3 $\pm$ 1.94 ^b	3.5 $\pm$ 0.15*
AFB₁ 10 μM	20	7-16	7.8 $\pm$ 2.46 ^b	5.8 $\pm$ 0.45*
AFB₁(5μM)+ R.c. 1	20	5-10	6.3 $\pm$ 1.75 ^{bc}	3.1 $\pm$ 0.32
AFB₁(5μM)+ R.c. 2	20	4-8	6.25 $\pm$ 1.67 ^{bc}	2.37 $\pm$ 0.55
AFB₁(10μM)+ R.c. 1	20	3-12	6.35 $\pm$ 1.96 ^{be}	2.40 $\pm$ 0.24*
AFB₁(10μM)+ R.c. 2	20	5-14	6.55 $\pm$ 1.56 ^{be}	2.85 $\pm$ 0.60*

KKD için;

AFB₁ = 5 μ M, AFB₁ = 10 μ M, R.c. = 5 μ g/ml R.C.M.E, R.c. = 10 μ g/ml R.C.M.E

^ap<0,001 Kontrole göre ^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5 μ M a göre ^dp<0,001 AFB₁ 10 μ M a göre ^ep<0,05 AFB₁ 10 μ M göre

MN için;

(*) P<0.01 önemli, () önemsiz

AFB₁'in 5 μ M ve 10 μ M verildiği kültürlerin U.V.M.E'nin 5 μ g/ml ve 10 μ g/ml dozlarındaki KKD frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 6.71 $\pm$ 1.46, 6.51 $\pm$ 1.20, 6.55 $\pm$ 1.94 ve 6.45 $\pm$ 1.77 olarak bulunmuştur. Bu değerler ile U.V.M.E'nin AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisinin engellendiği görülmüştür. AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, U.V.M.E'nin 5 μ g/ml ve 10 μ g/ml'lık dozlarındaki uygulamaların her ikisinde de AFB₁'in etkisini azalttığı görülmüştür. (Çizelge 4.6.)

Çizelge.4.6. *Umbilicaria vellea*. metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ($\pm$ SE) ve MN Frekansları ($\pm$ SE)

	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre	MN/Hücre
Kontrol	20	2-9	6.4 $\pm$ 1.20	2.3 $\pm$ 0.39
AFB₁ 5 μM	20	4-13	7,82 $\pm$ 1.93 ^a	3.4 $\pm$ 0.10*
AFB₁ 10 μM	20	6-15	8.1 $\pm$ 2.07 ^{ac}	5.6 $\pm$ 0.40*
AFB₁(5μM)+ U.v. 1	20	5-10	6.71 $\pm$ 1.46 ^{bc}	3.1 $\pm$ 0.40
AFB₁(5μM)+ U.v. 2	20	4-9	6.51 $\pm$ 1.20 ^{bc}	2.67 $\pm$ 0.85
AFB₁(10μM)+ U.v. 1	20	3-10	6.55 $\pm$ 1.94 ^{bd}	2.40 $\pm$ 0.24*
AFB₁(10μM)+ U.v. 2	20	5-13	6.45 $\pm$ 1.77 ^{bd}	2.35 $\pm$ 0.19*

KKD için;

AFB₁ =5 μ M, AFB₁ = 10 μ M, U.v. = 5 μ g/ml U.V.M.E, U.v. = 10 μ g/ml U.V.M.E

^ap<0,001 Kontrole göre ^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5 μ M a göre ^dp<0,001 AFB₁ 10 μ M a göre

MN için;

(*) P<0.01 önemli, () önemsiz

AFB₁'in 5 μ M verildiği kültürlerin U.L.M.E'nin 5 μ g/ml ve 10 μ g/ml dozlarındaki KKD frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 6.7 $\pm$ 1.47, 6.75 $\pm$ 1.42, 5,75 $\pm$ 2.03 ve 5.65 $\pm$ 1.67 olarak bulunmuştur. Bu değerler ile U.L.M.E'nin AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisinin engellendiği görülmüştür. AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, U.L.M.E'nin 10 μ g/ml dozlarındaki uygulamalarında daha etkili olduğu istatistiksel olarakta önemli olduğu U.L.M.E'nin 5 μ g/ml'lık uygulamasının ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. *Usnea longissima* metanol ekstratları uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ($\pm$ SE) ve MN Frekansları ($\pm$ SE)

	Metafaz	KKD Aralığı	KKD/Hücre	MN/Hücre
Kontrol	20	2-9	5.7 $\pm$ 1.69	1.75 $\pm$ 0.21
AFB₁ 5 μM	20	74-12	7.2 $\pm$ 2.06 ^a	3.0 $\pm$ 0.50*
AFB₁ 10 μM	20	6-15	8.05 $\pm$ 2.14 ^a	4.9 $\pm$ 0.50*
AFB₁(5μM)+ U.I. 1	20	5-10	6.7 $\pm$ 1.47 ^{ac}	2.82 $\pm$ 0.30
AFB₁(5μM)+ U.I. 2	20	5-9	6.75 $\pm$ 1.42 ^{ac}	2.7 $\pm$ 0.20
AFB₁(10μM)+ U.I. 1	20	4-11	5.75 $\pm$ 2.03 ^{bd}	1.80 $\pm$ 0.15*
AFB₁(10μM)+ U.I. 2	20	6-13	5.65 $\pm$ 1.67 ^{bd}	1.77 $\pm$ 0.40*

KKD için;

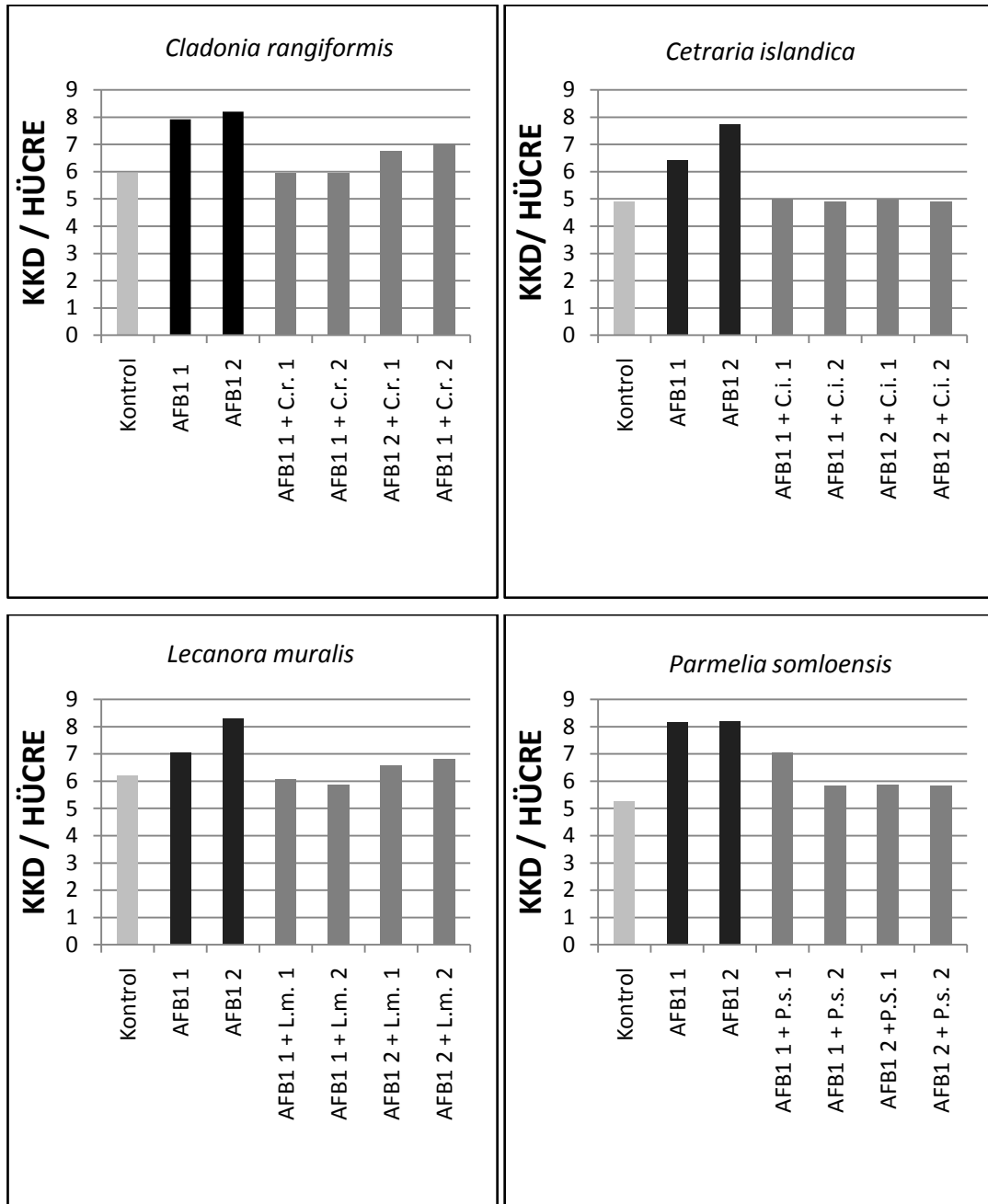
AFB₁ =5 μ M, AFB₁= 10 μ M, U.I. 1 = 5 μ g/ml U.L.M.E, U.I. 2 = 10 μ g/ml U.L.M.E

^ap<0,001 Kontrole göre ^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5 μ M a göre ^dp<0,001 AFB₁ 10 μ M a göre

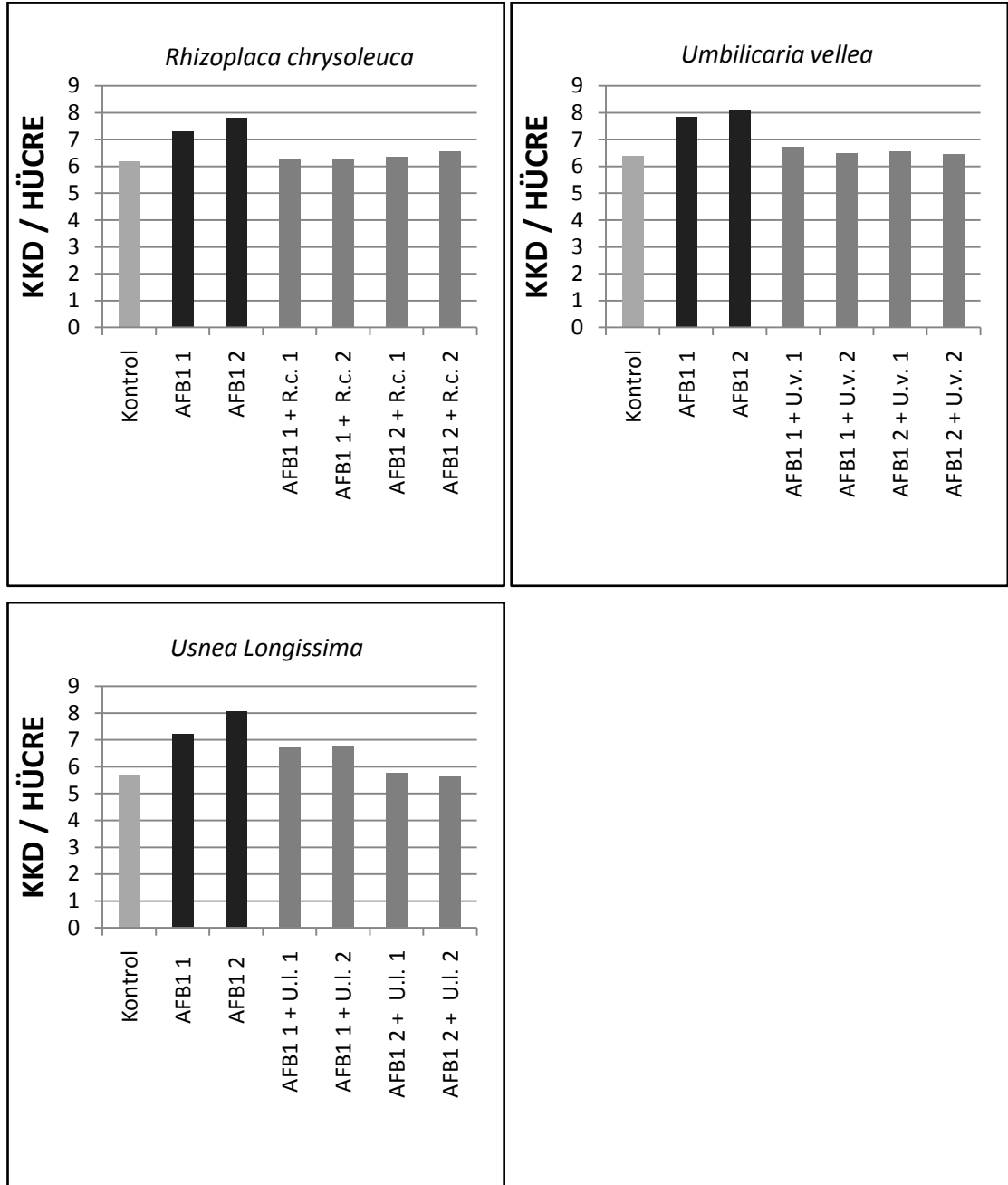
MN için;

(*) P<0.01 önemli, () önemsiz



Şekil 4.5. KDD üzerine AFB₁ ve *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiformis*, *Lecanora muralis* ve *Parmelia somloensis* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 =5µM AFB₁, AFB₁ 2 =10 µM AFB₁, C.i. 1 =5µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.i. 2 =10 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.r. 1=5 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, C.r. 2 =10 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, L.m. 1= 5 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı,, L.m. 2 = 10 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, P.s. 1= 5µg/ml *Parmelia somloensis*, P.s. 2 = 10 µg/ml *Parmelia somloensis*



Şekil 4.6. KDD üzerine AFB₁ ve *Rhizoplaca chrysoleuca*, *Umbilicaria vellea* ve *Usnea longissima* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 =5µM AFB₁, AFB₁ 2 =10 µM AFB₁, R.c. 1 =5µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı, R.c. 2 =10 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı, U.v. 1=5 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.v. 2 =10 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, L.m. 1= 5 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı,, L.m. 2 = 10 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı

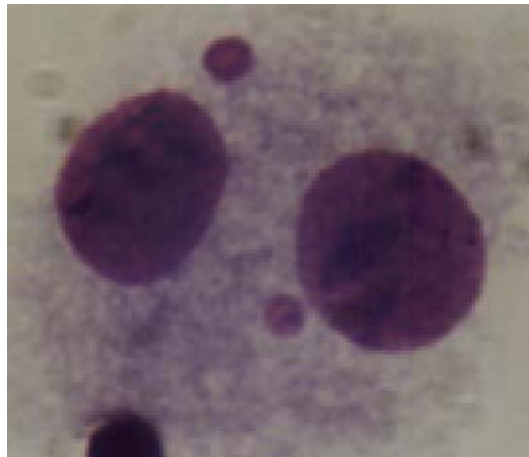
4.2. MN Bulguları

Deney gruplarının her biri için ortalama MN frekansları hesaplanmış, donörlara ait MN frekansları üzerine AFB₁ ve AFB₁ *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiformis*, *Lecanora muralis*, *Parmelia somloensis* metanol ekstraktı Çizelge 4.1- 4.4'de; *Umbilicaria vellea*, *Usnea longissima* ve *Rhizoplaca chrysoleuca* metanol ekstraktlarının etkileri Çizelge 4.5. - 4.7.'de sunulmuştur.

Donör kanlarından elde ettiğimiz bazı MN görüntüleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.7. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre



Şekil 4.8. Sitokinezi bolke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre



Şekil 4.9. Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre

AFB₁'in 5 µM luk ve 10 µM luk dozları verildiğinde MN frekansı AFB₁'in artışına bağlı olarak artmış ve bu değer (3.17 ± 0.20 ; 4.45 ± 0.57) istatistiksel açıdan daha anlamlı görülmüştür ($p < 0.01$). AFB₁'in 5 µM verildiği kültürlerin C.R.M.E'nin 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarındaki MN frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 2.1 ± 0.37 , 1.58 ± 0.21 , 2.40 ± 0.65 ve 2.45 ± 0.60 olarak bulunmuştur. Bu değerler ile C.R.M.E'nin AFB₁'in MN'yi arttırıcı etkisinin engellendiği görülmüştür. AFB₁'in MN frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, C.R.M.E'nin 10 µg/ml dozlarındaki uygulamalarında istatistiksel olarak önemli olduğu ve C.R.M.E'nin 5 µg/ml'lık uygulamasının ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.) (Şekil 4.2.).

5 µM AFB₁ ve 10 µM AFB₁ verildiği kültürlerin C.İ.M.E'nin 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarındaki MN frekanslarını etkilediği fakat 10 µg/ml dozunun daha etkili olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p < 0.01$) (Çizelge 4.2.). (Şekil 4.2.).

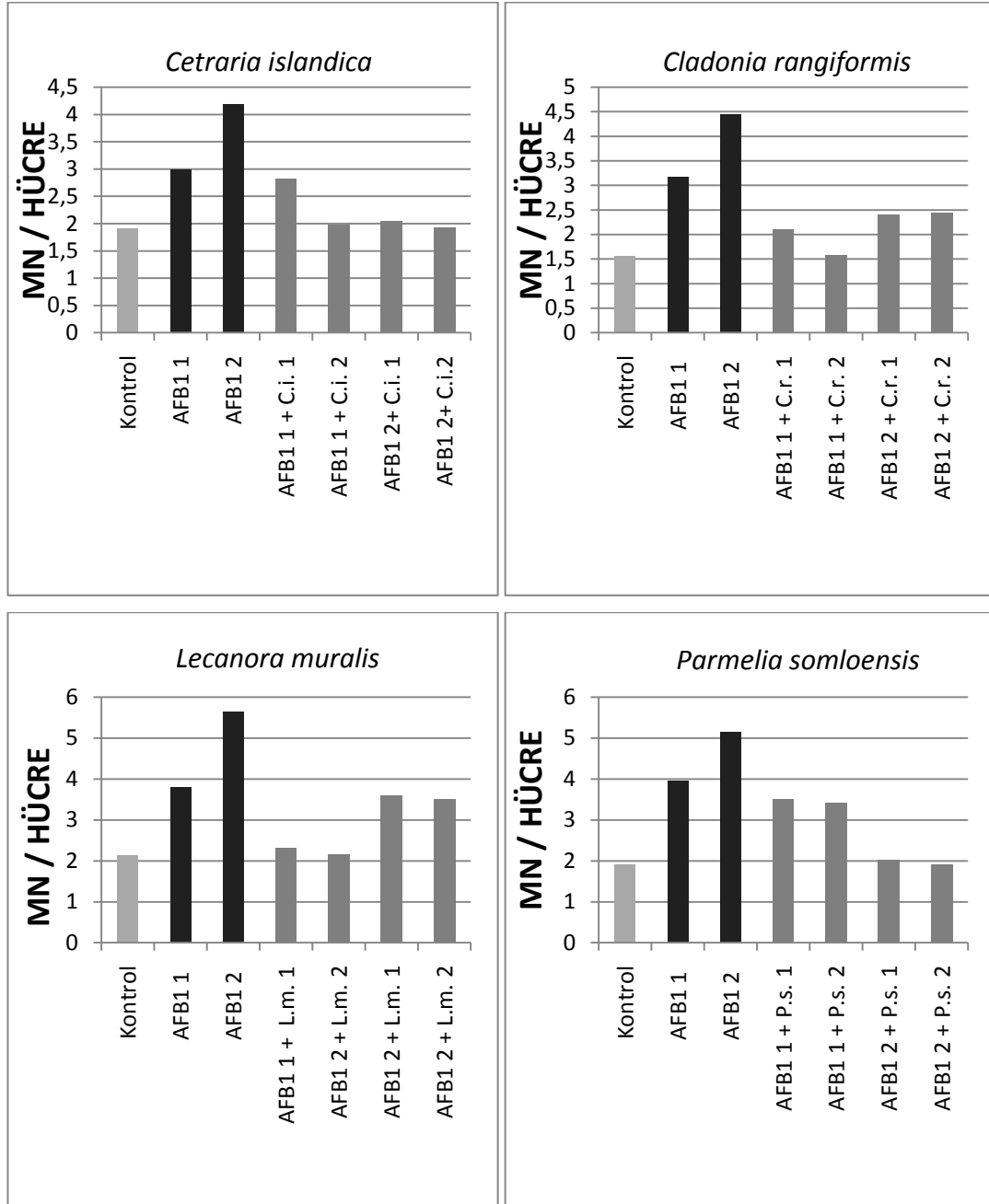
AFB₁'in 5 µM ve 10 µM verildiği kültürlerin L.M.M.E'nin 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarındaki MN frekanslarını karşılaştırdığımızda sırası ile 2.30 ± 0.29 , 2.15 ± 0.11 , 3.6 ± 0.08 ve 3.5 ± 0.35 olarak bulunmuştur. Elde etmiş olduğumuz bu değerler ile L.M.M.E'nin AFB₁'in MN frekansını yükseltici etkisinin baskıladığı belirlenmiştir. 5 µM AFB₁ ile 5 µg/ml L.M.M.E ve 5 µM AFB₁ ile 10 µg/ml L.M.M.E dozlarındaki uygulamalarımızda elde edilen sonuçlar; AFB₁'in MN frekansını yükseltici etkisini L.M.M.E'nin baskıladığı kanısı vardır (p < 0.001) (Çizelge 4.3.) (Şekil 4.2.).

P.S.M.E'nin 10 μ M AFB₁ ile beraber verilen 5 μ g/ml dozu ve 10 μ M AFB₁ ile beraber 10 μ g/ml'lık dozunun MN frekansı üzerine etkisinin daha fazla olduğu ve istatistiksel olarak($p<0.001$) seviyesinde önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.) (Şekil 4.2.).

5 μ M AFB₁ ile birlikte verilen 10 μ g/ml R.C.M.E'nin ve 10 μ M AFB₁ ile birlikte verilen 5 μ g/ml R.C.M.E'nin; AFB₁'in MN frekansını yükseltici etkisinin baskılandığı görülmüş ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.($p<0.001$) Bu likenin diğer konsantrasyonlarının MN frekansı ile olan etkileri kontrolle mukayese edildiği zaman istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.5.) (Şekil 4.2.).

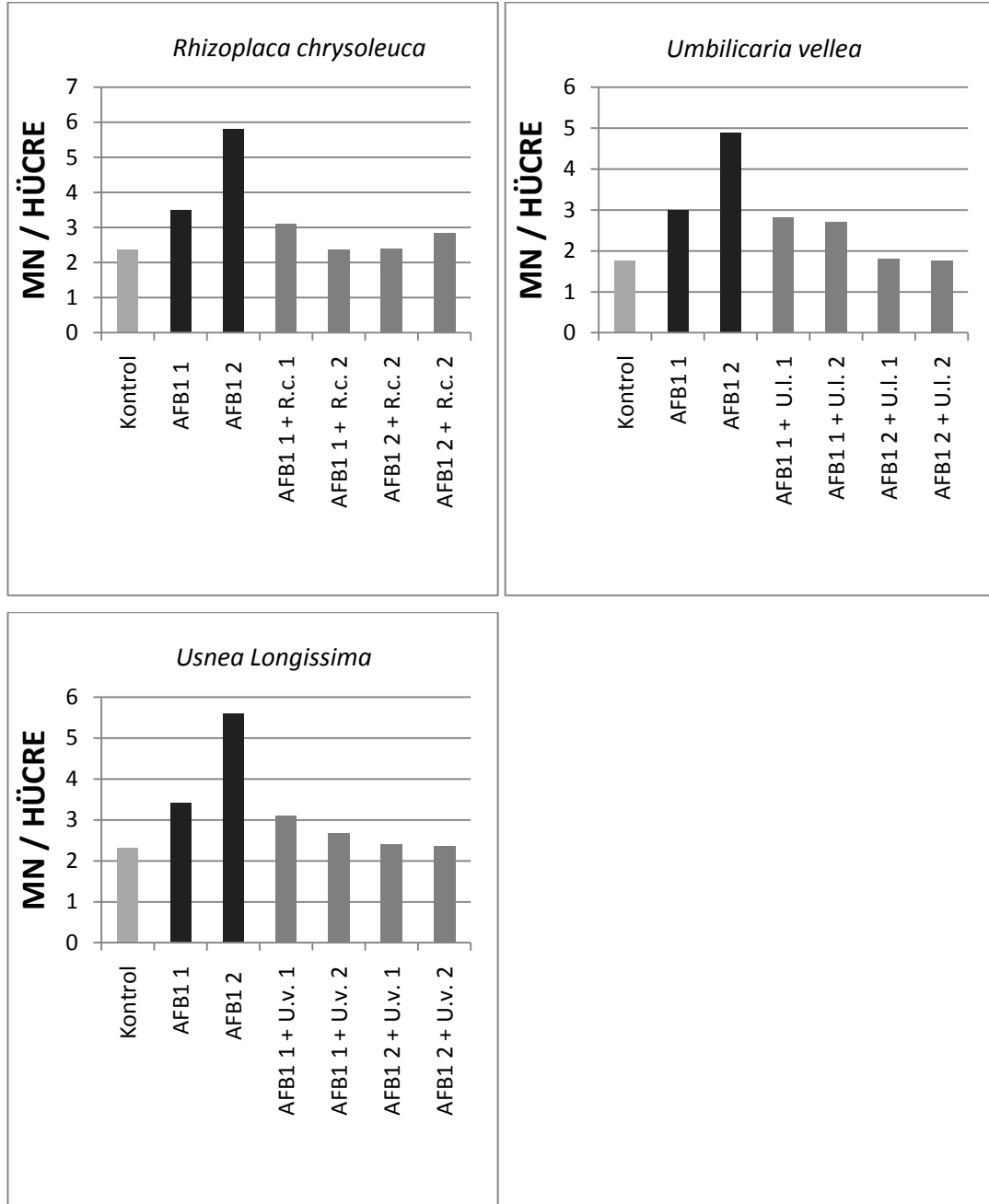
AFB₁'in 5 μ M ve 10 μ M verildiği kültürlerin U.V.M.E'nin 5 μ g/ml ve 10 μ g/ml dozlarındaki MN frekanslarını kıyasladığımız zaman, sırası ile 3.1 ± 0.40 , 2.67 ± 0.85 , 2.40 ± 0.24 ve 2.35 ± 0.19 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu değerler U.V.M.E'nin AFB₁'in MN frekansını arttırıcı etkisini baskıladığını göstermiştir. Özellikle AFB₁'in 10 μ M konsantrasyonunda 5 μ g/ml ve 10 μ g/ml U.V.M.E uygulanmasında MN frekansını baskıladığı istatistiksel olarak bu dozların etkili olduğu görülmüştür ($p<0.001$) (Çizelge 4.6.). (Şekil 4.2.).

AFB₁ ile birlikte verilen U.L.M.E'nin tüm konsantrasyonlarının MN frekansı üzerine etkisinin olduğu AFB₁'in MN frekansı üzerine olan olumsuz etkisini inhibe ettiği görülmüştür ($p<0.001$) (Çizelge 4.7.) (Şekil 4.2.).



Şekil 4.10. MN üzerine AFB₁ ve *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiformis*, *Lecanora muralis* ve *Parmelia somloensis* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 = 5µM AFB₁, AFB₁ 2 = 10 µM AFB₁, C.i. 1 = 5µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.i. 2 = 10µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.r. 1 = 5µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, C.r. 2 = 10 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, L.m. 1 = 5 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, L.m. 2 = 10 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, P.s. 1 = 5µg/ml *Parmelia somloensis*, P.s. 2 = 10 µg/ml *Parmelia somloensis*



Şekil 4.11. MN üzerine AFB₁ ve *Rhizoplaca chrysoleuca*, *Umbilicaria vellea* ve *Usnea longissima* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 =5µM AFB₁, AFB₁ 2 =10 µM AFB₁, R.c. 1 =5µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı, R.c. 2 =10 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı, U.v. 1=5 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.v. 2 =10 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, L.m. 1= 5 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı,, L.m. 2 = 10 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı

4. 3. SOD, GPx ve MDA Bulguları

Yaptığımız çalışmalarda sadece AFB₁ verilen grup kontrol grubuna göre, AFB₁ ile birlikte liken verilen gruplarda sadece AFB₁ verilen gruba göre değerlendirilmiştir. AFB₁'in her iki konsantrasyonunun kontrol grubuna göre önemli derecede ($p<0.001$) SOD aktivitesini azalttığı görülmüştür (Çizelge 4.8- 4.14.). AFB₁ ile birlikte kültür ortamına ilave likenler ve bunların 2 farklı konsantrasyonlarının SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. AFB₁ in SOD aktivitesini azaltmasına karşın, AFB₁ ile birlikte likenlerin 2 farklı konsantrasyonunun eklenmesi, bu enzimin aktivitesini önemli derecede artırdığı belirlenmiştir. (3.78 ± 0.22 , 2.98 ± 0.15) Likenlerin uygulanan konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak SOD aktivitesi de artmıştır. (Çizelge 4.8.- 4.14). Çizelge 4.8. ile Çizelge 4.9. ve Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi; C.R..M.E.'nin ve C.İ.M.E.'nin 5µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml'lık ve 10µg/ml'lık dozlarının SOD aktivitesi üzerine olan aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.001$ önemli bulunurken, 10µM AFB₁ ile birlikte verilen C.İ.M.E.'nin 5µg/ml'lık dozu ve 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml'lık dozu ile AFB₁ grupları arasındaki SOD aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. L.M.M.E.'nin 5µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml'lık dozu ve 5 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml'lık dozu ile AFB₁ grupları arasındaki SOD aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.001$ önemli bulunurken, C.İ.M.E.'nin 10µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml'lık dozu ve 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml'lık dozu ile AFB₁ grupları arasındaki SOD aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. (Çizelge 4.9. - 4.10)

R.C.M.E.'nin tüm konsantrasyonlarında AFB₁ grupları arasındaki SOD aktivitesi arttırdığı ve bunun istatistiksel olarak ($p<0.001$) önemli olduğu bulunmuştur. Çizelge 4.12. ve Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi R.C.M.E.'nin kontrole en çok yaklaştığı grup ise; 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml R.C.M.E.'dir.

U.V.M.E.'nin 5µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml'lık dozu ve 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml'lık dozu ile AFB₁ grupları arasındaki SOD aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.001$ önemli bulunurken, U.V.M.E.'nin 5µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml'lık dozu ve 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml'lık dozu ile AFB₁ grupları arasındaki SOD aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Şekil 4.13. ve Çizelge 4.13.).

U.L.M.E.'nin ve P.S.M.E.'nin tüm konsantrasyonlarında AFB₁ SOD aktivitesi üzerine olan olumsuz etkisini giderdiği ve bunun istatistiksel olarak ($p<0.001$) önemli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14. ve Çizelge 4.14.).

AFB₁ ve likenlerin GPx üzerine etkilerinde ise genel olarak AFB₁'in GPx aktivitesini azalttığı AFB₁ ile likenlerin 2 farklı dozunun verilmesi ile GPx aktivitesinin arttığı görülmüştür. Kontrol grubunda GPx aktivitesi 330 ± 25.04 U/g protein iken, 5µM AFB₁ ve 10 µM AFB₁ grubunda sırasıyla 210 ± 6.47 U/g proteine ve 160 ± 4.45 U/g proteine düşmüştür, GPx aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$).

Çizelge 4.9.' da görüldüğü gibi, C.İ.M.E.'nin ve P.S.M.E.'nin AFB₁ ile birlikte verildiği tüm konsantrasyonlarında GPx aktivitesini az miktarda artırdığı görülmüş ve istatistiksel açıdan $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. C.R.M.E.'nin 5 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml, 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml ve 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml dozlarının yine GPx aktivitesi artışı üzerine olan etkisinin olduğu bunda $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli tespit edilmiştir. C.R.M.E.'nin 5 µM AFB₁ ile birlikte verilen 5 µg/ml dozu ise $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.14.)

L.M.M.E.'nin, R.C.M.E.'nin ve U.L.M.E.'nin GPx aktivitesi artışı üzerine olan etkisi sonuçlarında ise ; bu üç likenin 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml ve 10 µM AFB₁ ile birlikte verilen 10µg/ml'lık dozları Çizelge 4.8. ;Çizelge 4.12.; Çizelge 4.14.; Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi kontrol gruplarına en yakın değerler olduğu ve

bununda istatistik açıdan önemli olduğu ($p<0.001$) gözlenmiştir. U.V.M.E.'nin 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 10 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozu GPx aktivitesi artışı üzerine olan etkisi $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunurken U.V.M.E.'nin 5 μM AFB₁ ile birlikte verilen 5 $\mu\text{g/ml}$, 5 μM AFB₁ ile birlikte verilen 10 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarında GPx aktivitesi $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur.

MDA miktarı ile yaptığımız çalışmalarda, AFB₁ lipid peroksidasyonunu artırdığından dolayı MDA miktarında önemli derecede artışa neden olmuştur. Fakat AFB₁ ile birlikte antimutajenik özelliğe sahip olan likenlerin ilave edilmesi ile MDA miktarının azaldığı gözlenmiştir.

Kontrol grubunda MDA aktivitesi $1,21\pm 1.75$ $\mu\text{mol/L}$ iken, 5 μM AFB₁ ve 10 μM AFB₁ grubunda sırasıyla $1,45\pm 1.74$ $\mu\text{mol/L}$ ve $1,7\pm 2.49$ $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Bu sonuçlar AFB₁'in MDA miktarında artışa sebep olduğunu ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.9.'da görüldüğü gibi, C.İ.M.E.'nin 10 μM AFB₁ ile birlikte verildiği 5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozunda MDA miktarı $1,26\pm 1.32$ $\mu\text{mol/L}$ dir. Bu sonuçlar C.İ.M.E.'nin bu konsantrasyonun kontrol grubuyla aynı olduğunu göstermiş ve MDA miktarındaki bu azalma AFB₁ grubu ile mukayese edildiği zaman istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). C.R.M.E.'nin 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 5 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozları MDA miktarında azalmayı sağlamıştır ve istatistiksel açıdan $p<0.001$ seviyede önemli olduğu tespit edilmiştir.(Çizelge 4.8.) L.M.M.E.'nin 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 10 $\mu\text{g/ml}$ dozu MDA miktarında azalmaya sağlarken L.M.M.E.'nin 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 5 $\mu\text{g/ml}$ dozu MDA seviyesinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmazken (Çizelge 4.10). L.M.M.E.'nin AFB₁ ile birlikte verilen diğer konsantrasyonları ise $p<0.05$ seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. Çizelge 4.12.'de görüldüğü gibi R.C.M.E.'nin 5 μM AFB₁ ile birlikte verilen 10 $\mu\text{g/ml}$ dozunun kontrol ile aynı seviyeye düştüğü bu konsantrasyonun istatistiksel açıdan $p<0.001$ seviyesinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir.. R.C.M.E.'nin 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 μM AFB₁ ile birlikte verilen 10 $\mu\text{g/ml}$ dozları AFB₁ grubu ile mukayese edildiği zaman MDA

miktarındaki bu azalma istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. U.V.M.E.'nin ve U.L.M.E.'nin $5 \mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $5\mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $10\mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $5\mu\text{g/ml}$ ve $10 \mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $10\mu\text{g/ml}$ dozlarında MDA miktarındaki azalma olduğu tespit edilmiş ve bu değerler istatistiksel açıdan $p<0.005$ seviyesinde önemli görülmüştür (Çizelge 4.13.-4.14.).

P.S..M.E.'nin $5\mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $5\mu\text{g/ml}$ 'lık dozu, $5\mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $10\mu\text{g/ml}$ 'lık dozu, ve $10 \mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $5\mu\text{g/ml}$ 'lık dozu ile AFB₁ grupları arasındaki MDA aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.001$ seviyesinde önemli bulunurken, P.S.M.E.'nin $10\mu\text{M}$ AFB₁ ile birlikte verilen $5\mu\text{g/ml}$ 'lık dozu ile AFB₁ grupları arasındaki MDA aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur.(Şekil 4.13. ve Çizelge 4.14.)

Çizelge 4.8. AFB₁ ve *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri

	SOD (U/mg protein)	GPx (U/g protein)	MDA (µmol/L)
Kontrol	6,41±0.55	280±15.34	1,244±1.72
AFB₁ 5 µM	4,39±0.85 ^a	140±5.05 ^a	1,607±1.64 ^b
AFB₁ 10 µM	3,15±0.76 ^a	90±6.25 ^a	1,708±2.23 ^b
AFB₁(5µM)+C.R. 1	8,1±0.21 ^{ad}	160±3.55	1,267±1.31 ^c
AFB₁(5µM)+ C.R. 2	6,89±0.17 ^{ade}	220±5.85	1,302±1.40 ^c
AFB₁(10µM)+C.R. 1	5,6±0.22 ^{bc}	270±6.54	1,24±2.98 ^{de}
AFB₁(10µM)+C.R. 2	4,74±0.31 ^{bc}	275±3.90	1,211±2.79 ^e

* C.r. 1 = 5µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı C.r. 2 =10 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı

^ap<0,001 Kontrole göre,

^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre,

^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre,

^ep<0,001 AFB₁ 5µM göre

Çizelge 4.9. AFB₁ ve *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPx ve MDA üzerine etkileri

	SOD (U/mg protein)	GPx (U/g protein)	MDA (µmol/L)
Kontrol	5,18±0.20	330±22.14	1,21±1.84
AFB₁ 5 µM	3,25±0.05 ^a	210±10.7 ^a	1,45±1.33 ^a
AFB₁ 10 µM	2,52±0.08 ^a	160±6.15 ^a	1,7±2.26 ^a
AFB₁(5µM)+C.İ. 1	9,9±0.16 ^{ac}	250±7.65 ^b	1,26±1.16 ^c
AFB₁(5µM)+ C.İ. 2	11,3±0.10 ^{ac}	280±6.34 ^{bc}	1,2±1.55 ^{ad}
AFB₁(10µM)+C.İ. 1	6,52±0.33 ^{ad}	295±5.87 ^{ad}	1,21±2.89 ^{ad}
AFB₁(10µM)+C.İ. 2	2,68±0.03 ^b	297±7.63 ^{ad}	1,23±2.38 ^b

* C.i. 1 = 5µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı C.i. 2 =10 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı

^ap<0,001 Kontrole göre,

^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre,

^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre,

^ep<0,001 AFB₁ 5µM göre

Çizelge 4.10. AFB₁ ve *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri

	SOD (U/mg protein)	GPx (U/g protein)	MDA (µmol/L)
Kontrol	5,54±0.5	506±30.13	1,21±1.62
AFB₁ 5 µM	5,23±0.10 ^b	79±8.58 ^a	1,6±1.32 ^a
AFB₁ 10 µM	4,55±0.20 ^b	250±5.95 ^b	1,72±2.24 ^a
AFB₁(5µM)+L.M. 1	8,49±0.4 ^c	350±10.12 ^c	1,24±1.51 ^c
AFB₁(5µM)+ L.M. 2	5,71±0.20 ^{de}	320±4.70 ^c	1,27±1.68 ^c
AFB₁(10µM)+L.M. 1	4,42±0.5 ^c	500±9.19 ^d	1,23±2.43 ^c
AFB₁(10µM)+L.M. 2	3,03±0.12 ^c	506±8.02 ^{de}	1,19±2.06 ^c

* L.m. 1 = 5µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı L.m. 2 =10 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı

^ap<0,001 Kontrole göre,

^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre,

^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre,

^ep<0,001 AFB₁ 5µM göre

Çizelge 4.11. AFB₁ ve *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri

	SOD (U/mg protein)	GPx (U/g protein)	MDA (µmol/L)
Kontrol	6,27±0.12	350±28.15	1,18±1.59
AFB₁ 5 µM	4,81±0.6 ^a	220±7.65 ^a	1,51±1.14 ^a
AFB₁ 10 µM	2,5±0.02 ^a	160±5.56 ^a	1,97±2.19 ^a
AFB₁(5µM)+P.S. 1	5,15±0.11 ^a	290±7.03 ^c	1,27±1.10 ^c
AFB₁(5µM)+ P.S. 2	5,5±0.8 ^a	295±5.70 ^c	1,23±1.11 ^c
AFB₁(10µM)+ P.S. 1	4,85±0.4 ^c	308±8.11 ^{cde}	1,27±2.09 ^c
AFB₁(10µM)+ P.S. 2	7,26±0.3 ^c	345±6.44 ^{ade}	1,28±2.04 ^c

* P.s. 1 = 5µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı P.s. 2 =10 µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı

^ap<0,001 Kontrole göre,

^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre,

^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre,

^ep<0,001 AFB₁ 5µM göre

Çizelge 4.12. AFB₁ ve *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX ve MDA üzerine etkileri

	SOD (U/mg protein)	GPx (U/g protein)	MDA (µmol/L)
Kontrol	8,06±0.12	310±24.22	1,22±1.73
AFB₁ 5 µM	6,41±0.27 ^a	194±7.87 ^a	1,47±1.30
AFB₁ 10 µM	4,43±0.03 ^a	97±6.35 ^a	1,6±2.29
AFB₁(5µM)+R.C. 1	5,86±0.29 ^b	260±4.47 ^c	1,43±1.36
AFB₁(5µM)+R.C. 2	7,01±0.14 ^b	290±5.24 ^c	1,22±1.99
AFB₁(10µM)+R.C. 1	9,97±0.06 ^b	295±6.18 ^{cd}	1,29±2.52
AFB₁(10µM)+R.C. 2	7,27±0.09 ^a	300±8.10 ^{ad}	1,23±2.75

* R.c. 1 = 5µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı R.c. 2 =10 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı

^ap<0,001 Kontrole göre,

^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre,

^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre,

^ep<0,001 AFB₁ 5µM göre

Çizelge 4.13. AFB₁ ve *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX, GSH ve MDA üzerine etkileri

	SOD (U/mg protein)	GPx (U/g protein)	MDA (µmol/L)
Kontrol	5,14±0.08	410±29.13	1,17±1.83
AFB₁ 5 µM	2,43±0.5	320±7.20	1,31±1.72 ^b
AFB₁ 10 µM	3,39±0.4	250±6.36	1,61±2.49 ^a
AFB₁(5µM)+U.V. 1	9,4±0.09	390±5.34	1,29±1.73 ^b
AFB₁(5µM)+ U.V. 2	6,96±0.15	395±6.43	1,24±1.81 ^b
AFB₁(10µM)+U.V. 1	4,54±0.4	398±5.25	1,23±2.75 ^{bd}
AFB₁(10µM)+U.V. 2	3,71±0.13	405±6.18	1,21±2.30 ^{bd}

* U.v. 1 = 5µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı U.v. 2 =10 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı

^ap<0,001 Kontrole göre,

^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5µM a göre,

^dp<0,001 AFB₁ 10µM a göre,

^ep<0,001 AFB₁ 5µM göre

Çizelge 4.14. AFB₁ ve *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı'nın SOD, GPX, GSH ve MDA üzerine etkileri

	SOD (U/mg protein)	GPx (U/g protein)	MDA (μmol/L)
Kontrol	6,27±0.9	350±26.56	1,18±1.66
AFB₁ 5 μM	4,81±0.28 ^a	220±6.89 ^a	1,51±1.65 ^a
AFB₁ 10 μM	2,5±0.13 ^a	160±5.33 ^a	1,97±2.38 ^a
AFB₁(5μM)+U.L. 1	5,15±0.25 ^{bc}	290±7.43 ^c	1,27±1.55 ^b
AFB₁(5μM)+ U.L. 2	5,5±0.47 ^{bc}	295±5.66 ^c	1,23±1.76 ^b
AFB₁(10μM)+ U.L. 1	4,85±0.42 ^b	308±8.09 ^c	1,27±2.52 ^b
AFB₁(10μM)+U.L. 2	7,26±0.13 ^b	345±7.20 ^a	1,28±2.78 ^b

* U.L. 1 = 5μg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı U.L. 2 =10 μg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı

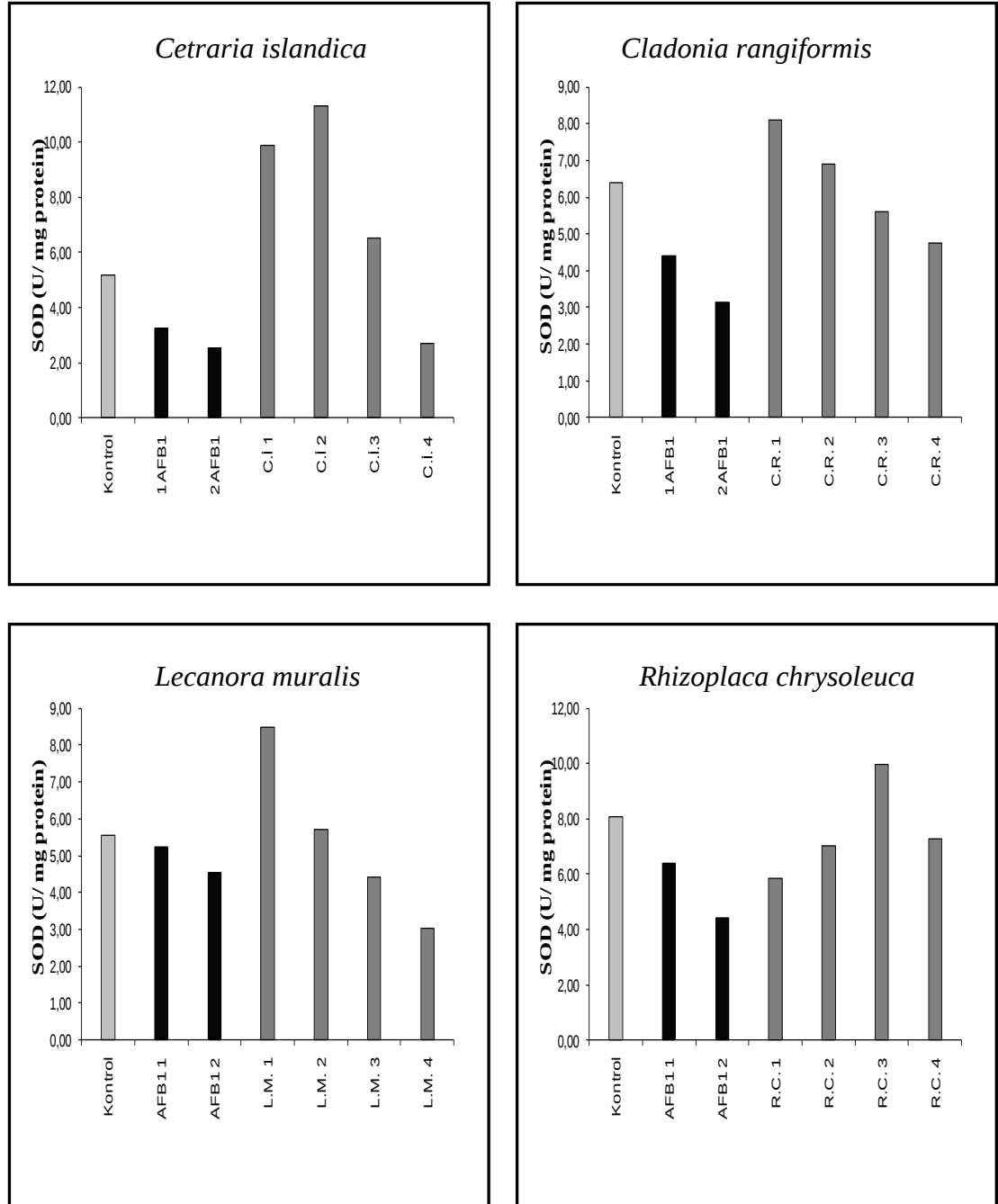
^ap<0,001 Kontrole göre,

^bp<0,05 Kontrole göre

^cp<0,05 AFB₁ 5μM a göre,

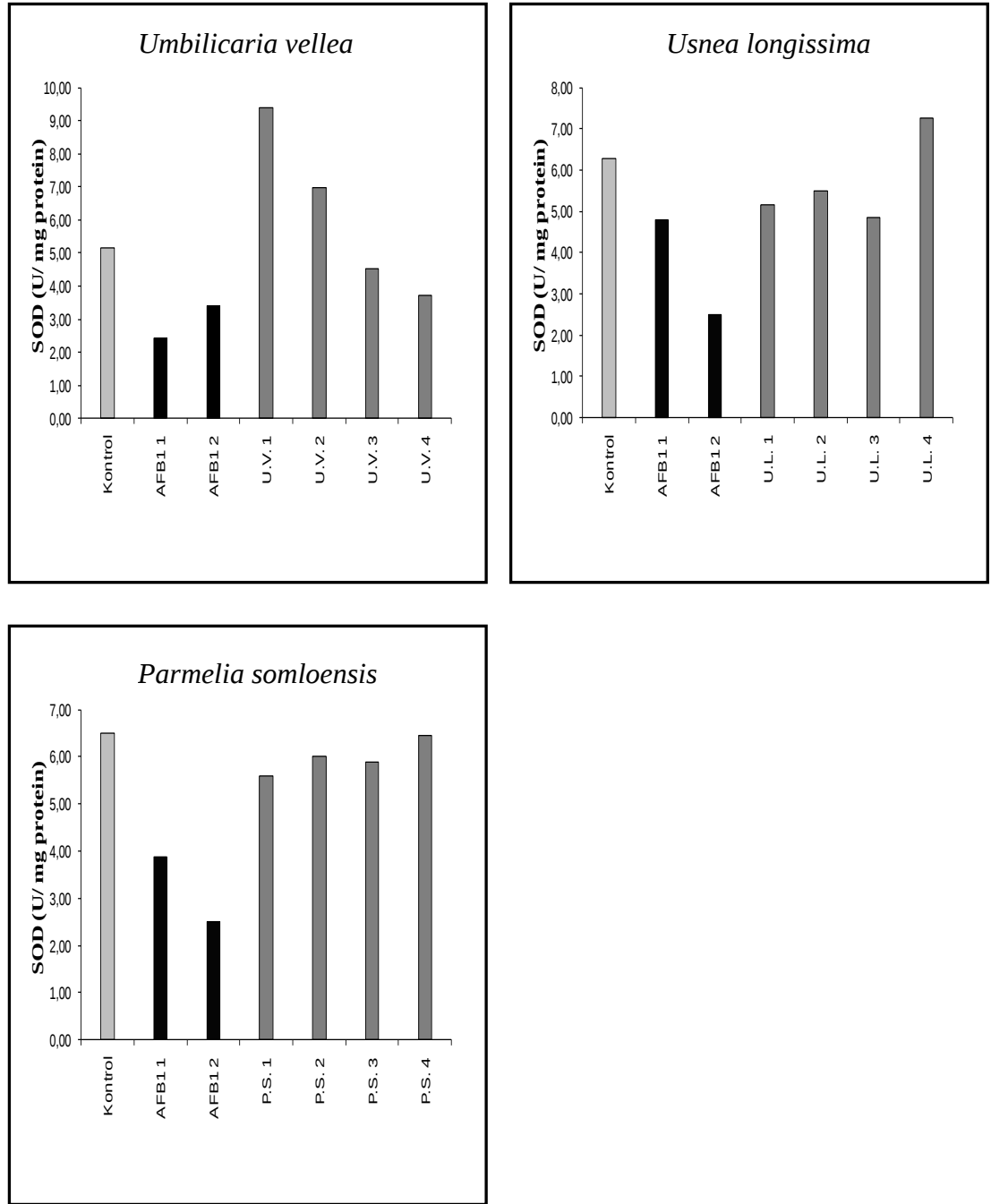
^dp<0,001 AFB₁ 10μM a göre,

^ep<0,001 AFB₁ 5μM göre



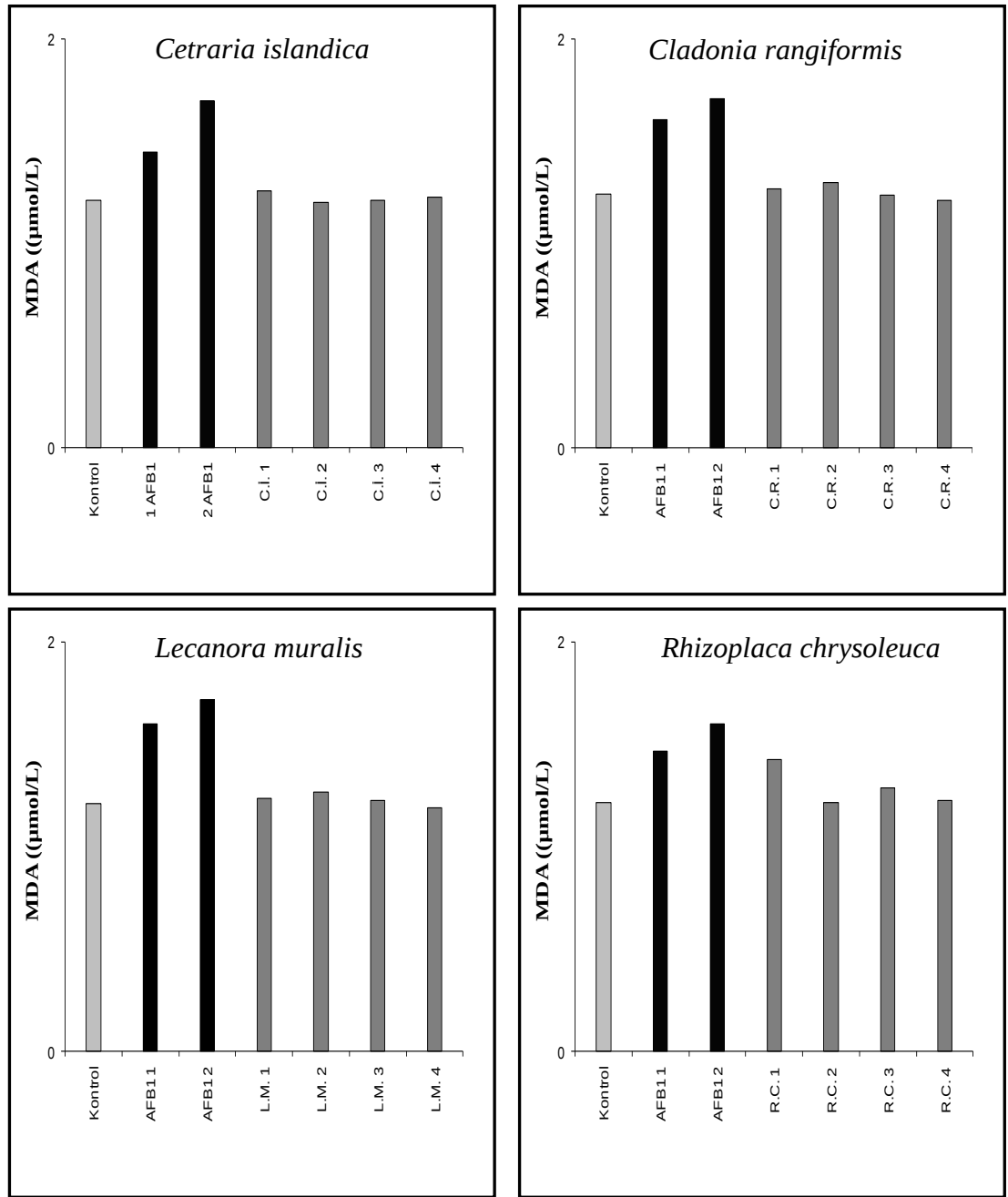
Şekil 4.12. SOD seviyesi üzerine AFB₁ ve *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiformis*, *Lecanora muralis* ve *Rhizoplaca chrysoleuca* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 = 5 µM AFB₁, AFB₁ 2 = 10 µM AFB₁, C.i. 1 = 5 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.i. 2 = 10 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.r. 1 = 5 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, C.r. 2 = 10 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, L.m. 1 = 5 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, L.m. 2 = 10 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, R.c. 1 = 5 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı, L.m. 2 = 10 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı



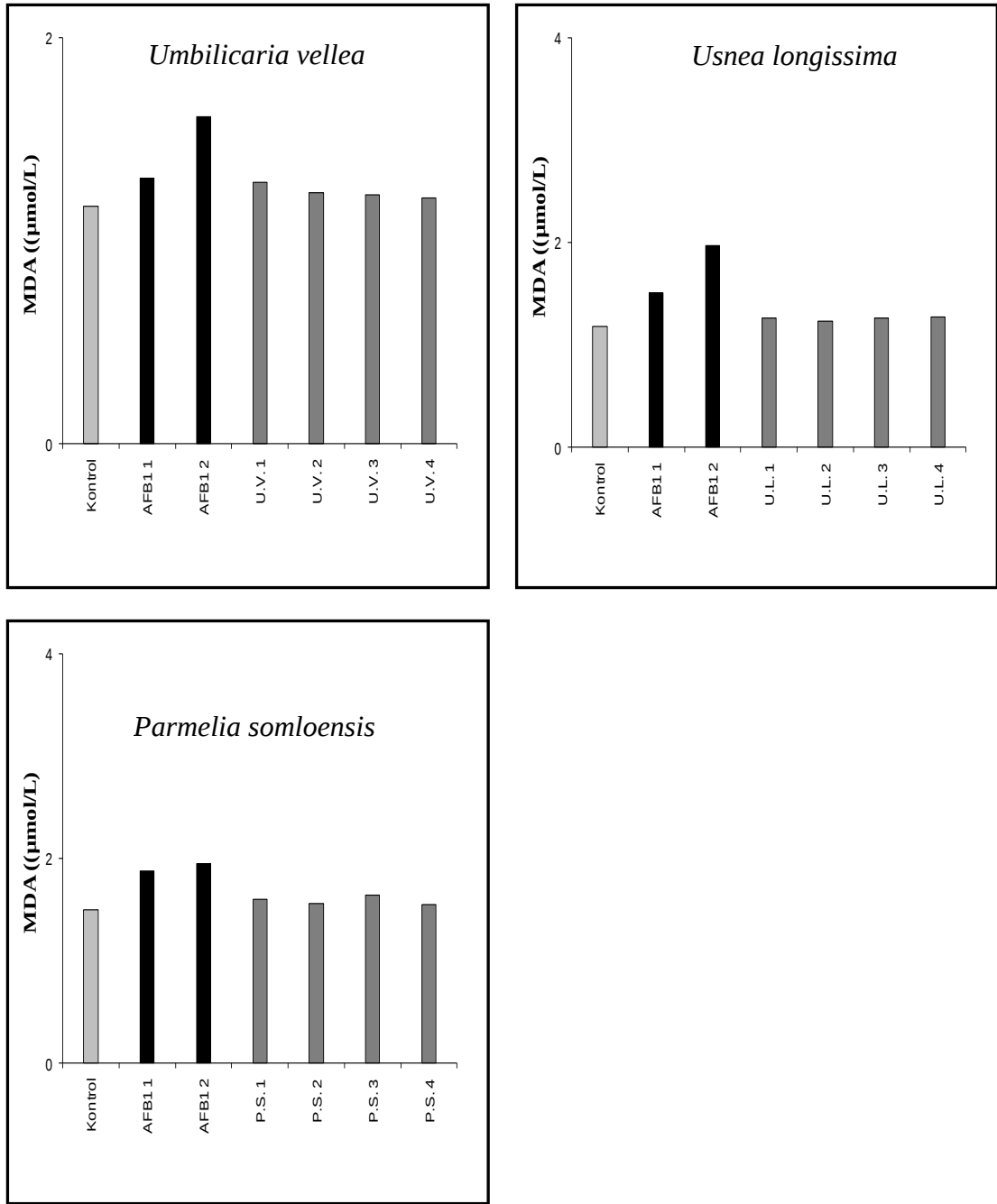
Şekil 4.13. SOD seviyesi üzerine AFB₁ ve *Parmelia somloensis*, *Umbilicaria vellea* ve *Usnea longissima* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 = 5 µM AFB₁, AFB₁ 2 = 10 µM AFB₁, P.s. 1 = 5 µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı, P.s. 2 = 10 µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı, U.v. 1 = 5 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.v. 2 = 10 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.l. 1 = 5 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı, U.l. 2 = 10 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı



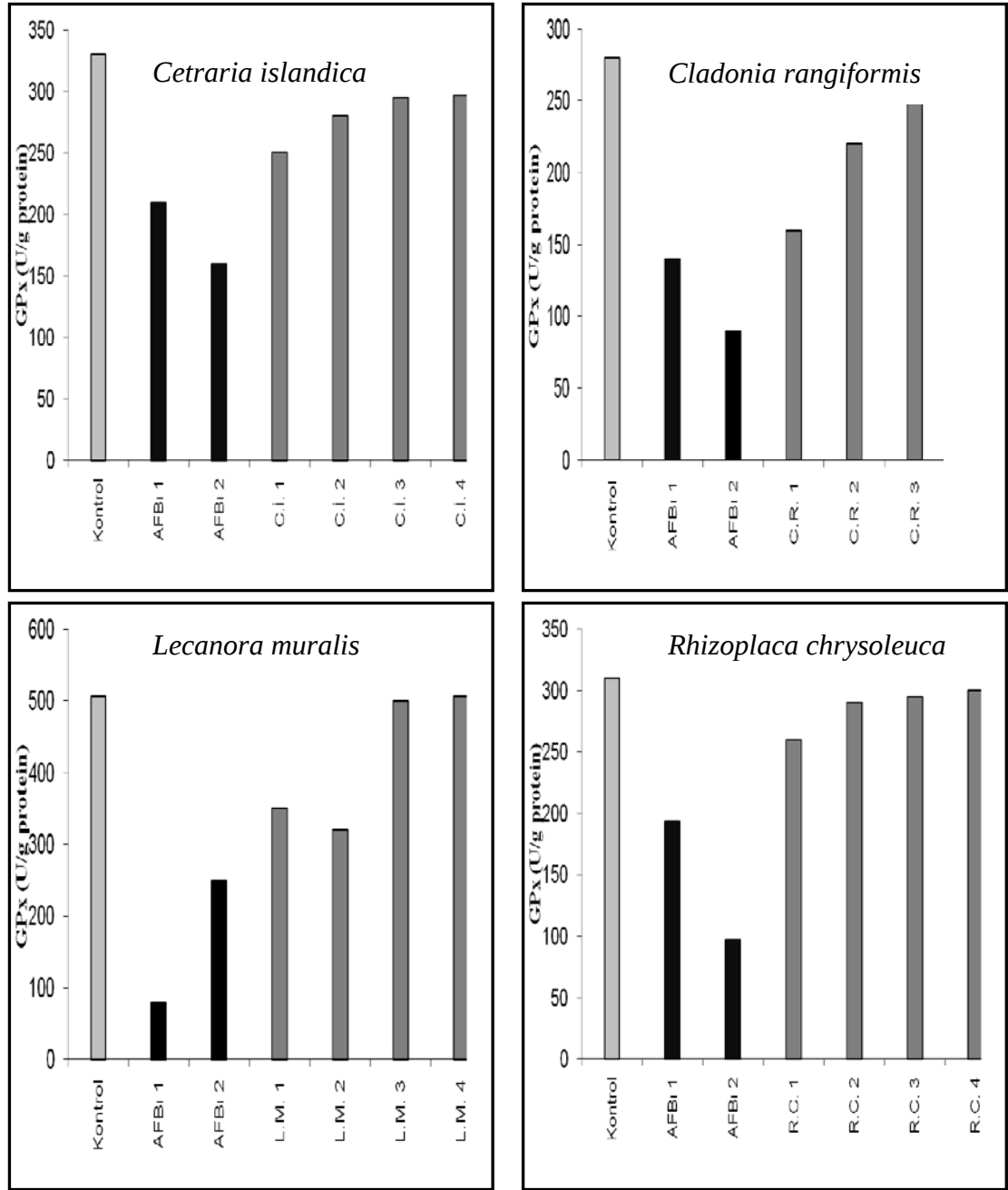
Şekil 4.14. MDA seviyesi üzerine AFB₁ ve *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiformis*, *Lecanora muralis* ve *Rhizoplaca chrysoleuca* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 = 5 µM AFB₁, AFB₁ 2 = 10 µM AFB₁, C.i. 1 = 5 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.i. 2 = 10 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.r. 1 = 5 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, C.r. 2 = 10 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, L.m. 1 = 5 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, L.m. 2 = 10 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, R.c. 1 = 5 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı, R.c. 2 = 10 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı,



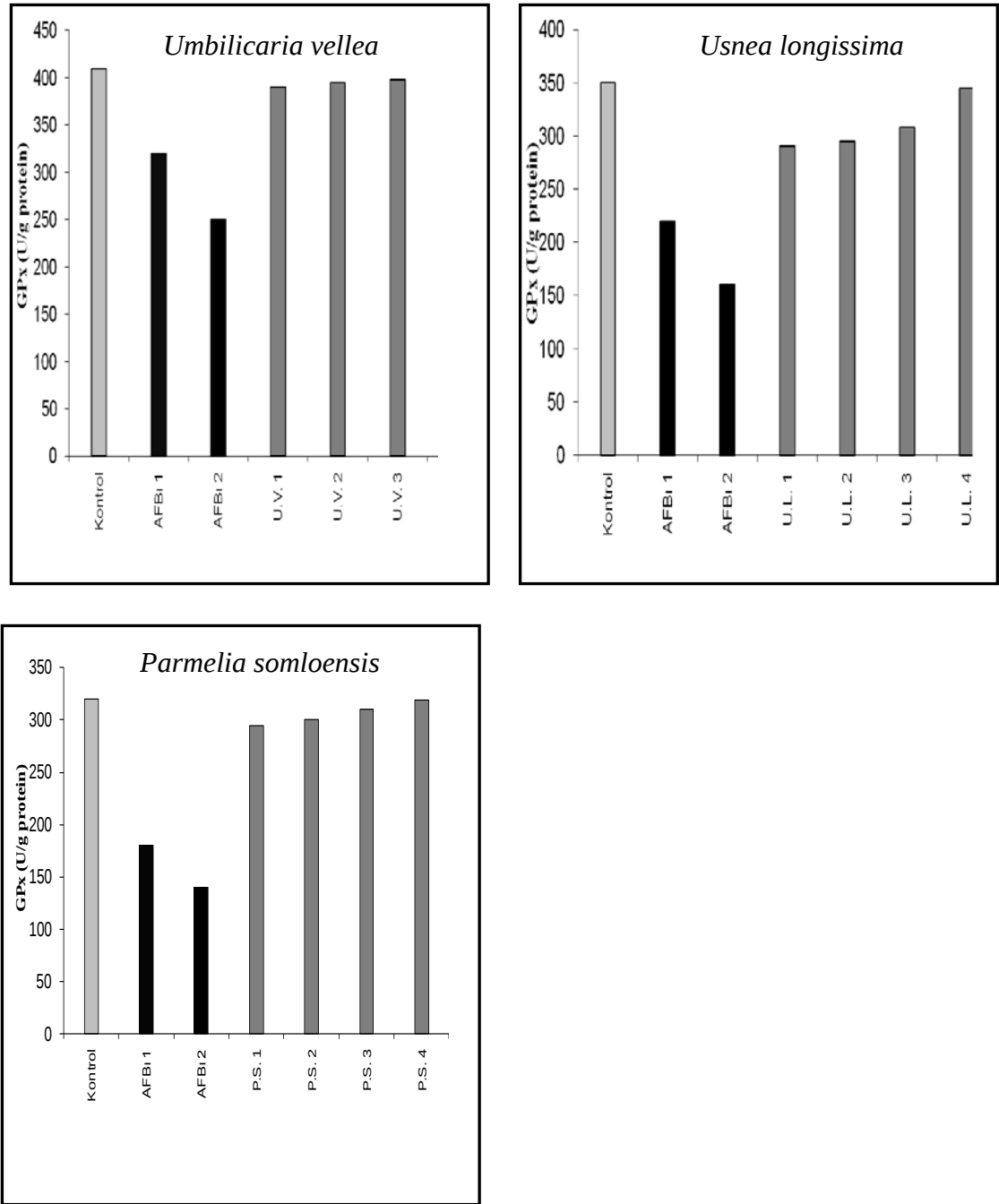
Şekil 4.15. MDA seviyesi üzerine AFB₁ ve *Parmelia somloensis*, *Umbilicaria vellea* ve *Usnea longissima* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 =5µM AFB₁, AFB₁ 2 =10 µM AFB₁, P.s. 1 =5µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı, P.s. 2 =10 µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı, U.v. 1=5 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.v. 2 =10 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.l. 1= 5 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı,, U.l. 2 = 10 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı



Şekil 4.16. GPx seviyesi üzerine AFB₁ ve *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiformis*, *Lecanora muralis* ve *Rhizoplaca chrysoleuca* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 = 5 µM AFB₁, AFB₁ 2 = 10 µM AFB₁, C.i. 1 = 5 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.i. 2 = 10 µg/ml *Cetraria islandica* Metanol Ekstraktı, C.r. 1 = 5 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, C.r. 2 = 10 µg/ml *Cladonia rangiformis* Metanol Ekstraktı, L.m. 1 = 5 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, L.m. 2 = 10 µg/ml *Lecanora muralis* Metanol Ekstraktı, R.c. 1 = 5 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı, R.c. 2 = 10 µg/ml *Rhizoplaca chrysoleuca* Metanol Ekstraktı,



Şekil 4.17. GPx seviyesi üzerine AFB₁ ve *Parmelia somloensis*, *Umbilicaria vellea* ve *Usnea longissima* türlerinin metanol ekstratlarının etkisi

* AFB₁ 1 =5µM AFB₁, AFB₁ 2 =10 µM AFB₁, P.s. 1 =5µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı, P.s. 2 =10 µg/ml *Parmelia somloensis* Metanol Ekstraktı, U.v. 1=5 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.v. 2 =10 µg/ml *Umbilicaria vellea* Metanol Ekstraktı, U.l. 1= 5 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı,, U.l. 2 = 10 µg/ml *Usnea longissima* Metanol Ekstraktı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çerçevesinde yaptığımız çalışmalarda, AFB₁'in insan periferik lenfositlerinde KKD'ni ve MN artırdığı görülmüştür. AFB₁ (5 µM, 10 µM) uygulanan lenfosit kültürlerinde KKD ve MN frekanslarını kontrol ile mukayese edildiğinde aralarındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 5µM AFB₁ verildiğinde KKD frekansı 7.37±1.90 ve 10 µM AFB₁ verildiğinde KKD frekansı 8.25±2.07 olarak tespit edilmiştir (p<0.001).

Daha önce yapılan benzer çalışmalarda aflatoksinlerin KA'ları ve KKD'ni artırdığı bilinmektedir. Leon-Cazares ve Aroche-alfonso (1977), insan lenfositleri ile *Aspergillus parasiticus* türü mantarın sporlarını birlikte 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakmış, yapılan çalışmaların sonucunda da aflatoksinlerin KA'lere neden olduğunu göstermiştir Thomson ve Evans (1979) ise Çin hamster ovaryum (CHO) hücreleri ve insan lenfositleri ile yaptıkları çalışmada AFB₁'in KKD artışından sorumlu olduğunu belirtmişlerdir. Deng ve arkadaşları (1988), AFB₁'in KKD oluşumunu ciddi oranda artırdığını tespit etmişlerdir. Andrew ve arkadaşlarının (1997), yaptığı çalışmada ise 1–10 µM AFB₁'in fare, rat ve insan lenfositlerinde KKD'ni artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızla paralellik gösteren diğer bir araştırmada da 1, 5, 10 µM AFB₁'in insan lenfosit hücrelerinde KKD'ni artırdığı ve sodyum selenite uygulaması ile AFB₁'in bu zararlı etkisinin azaldığı ortaya konulmuştur (Geyikoğlu ve Türkez 2006; Agar vd 2005; Alpsoy vd 2009).

KKD'nin oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, mutajenitenin artmasına bağlı olarak KKD artışının olduğu düşünülmektedir (İkbal vd 2003). AFB₁ gerek DNA'ya bağlanarak, gerekse salınımını uyardığı OH⁻ iyonlarının DNA hasarına neden olmasından dolayı mutajenik etkisi vardır. AFB₁'in mutajenik etkisi DNA'daki guanin bazının N-7 ile AFB₁'in 8. karbonu arasında kovalent bağ kurulmasına bağlı olarak, özellikle G-T şeklinde transversiyona neden olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. AFB₁ verilmesine bağlı olarak ratların karaciğerlerinde 8-oksodeoksiguanozin (8-oxodG) oluşumu artmakta bunun da KKD oluşumunu arttırdığı

düşünülmektedir. AFB₁'in KKD'ni artırmasının ikinci bir nedeni ise ROT oluşumunu artırmasıdır. AFB₁'in metabolik aktivasyonundan dolayı ROT'un miktarını ve oksidatif stresi artırdığı bildirilmektedir (Chan *et al.* 2003). ROT'lerinin artışı ise mutasyona neden olarak KKD'ni ve MN frekansını artırmaktadır (Lee *et al.* 1989; Weitberg 1987). Bu söz konusu mekanizma yardımı ile mikronukleus oluşumuna asentrik kromozom, kromatid fragment, anafazda köprülere ve geri kalmış kromozoma sebep olmakta bu da klastogen ve aneogen oluşumuna öncülük etmektedir.

AFB₁ (5 µM, 10µM) ile birlikte likenler (5µg/ml, 10 µg/ml)'in iki farklı konsantrasyonları uygulandığında, bütün liken ekstratlarının KKD sayısının azaldığı tespit edilmiştir. KKD'nin azaltılması üzerine kullanılan liken ve dozları dikkate alındığında, en etkili likenler indirgeyici aktiviteye sahip, güçlü bir antioksidan, süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girebildikleri için, onların temizlenmesini sağlayan *Cetraria islandica*, *Rhizoplaca chryssoleuca*, *Usnea longissima* ve *Umbilicaria vellea* olduğu görülmüştür. (p<0.001)

AFB₁'in ve bazı kimyasal maddelerin mutajenik etkisine karşı likenlerin antimutajenik etki gösterdiğine dair çeşitli çalışmalar vardır (Turkel vd 2003; Ogmundsdottir *et al.* 1998; Orange *et al* 2001; Olafsdottir 1999; Geyikoğlu ve Turkez 2006).

Likenlerdeki bu antimutajenik etkileri, yapılarında bulunan liken asitlerden ileri gelmektedir. Farklı liken türlerinden izole edilmiş protolikesterinik asit, pulvinik asit türevleri, depsid grubundan evernik, olivetorik asit, tridepsid grubundan giroforik asit, depsidon grubundan fisodik, lobarik, fumarprotosetrarik asitler ile dibenzofuran türevlerinden usnik asitin antimikrobiyal etkileri saptanmıştır. Bunlardan özellikle protolikesterinik asit, pulvinik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asitin en yüksek antimikrobiyal etki gösteren liken maddeleri olduğu belirlenmiştir (Vartia 1950; Dülger vd 1997; Dülger vd 1998; Ingólfssdottir 2002; Boustie and Grube 2005).

Likenlerden izole edilen depsidon, depsid bileşiklerinin antiinflamuar, antibakterial, antifungal ve antikanserojenik özelliklerinin olduğu daha önceki çalışmalarda ifade edilmiştir (Muller 2001; Piovana *et al* 2002; Russo *et al* 2006).

Özellikle çalışmamızda iyi antimutagenik aktiviteye sahip olan *Usnea longissima*'da elde edilen sekonder bileşiklerden usnik asit, diffraktaik asit, evernik asit, salazinik asit, bartatik asit, 4-Odimetibarbatik asit, squamatik asit, filodik asit, likensterinik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit, atranorin ve fatty asitin değişik eksema, antiviral antitümör, antiprotozoa, antibakterial, antifungal, antiinflamuar, analzetik gibi hastalıklara karşı etkili olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Okuyama 1995; Ingolfssdottir *et al.*1998). Bunlardan özellikle usnik asitin, likensterinik asitin, depsid ve depsidonun antibiotik etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Yasuhiko 1954).

Cetraria sp.'den elde edilen fatty asitin, *Pallifera varia*'nın larval gelişimini engellediği bu türden elde edilen usnik asitin ise *Glyptotermes dilatatus* karşı antiterminite aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir (Kathirgamanthar *et al.*2005).

Cetraria islandica'dan elde edilen su ekstratlarının *Drosophila melanogaster*' yavru birey sayısı üzerine etkisi araştırılmış ve buna bağlı olarak yavru birey sayısını artırdığı liken ekstratlarının teratogenik etkilerinin olabileceği düşünülmüştür (Altun *vd.* 2009).

Cladonia rangiformis'ten elde edilen metanol ekstratlarının antiinflamuar etkisinin olduğu tespit edilmiş bunun etkinin yapısında bulunan fumarprotosetrarik asit, norrangiformik asit, atranorinik asit, atroronik asit ve usnik asitten kaynaklanabileceğine değinilmiştir.(Süleyman *vd.*2002)

Son çalışmalarda yine likenlerden izole edilen depsid ve depsido'nun UV.(Ultraviyole ışınların) sebep olduğu deri kanserine karşı koruduğu gözlenmiştir (Rancan *et al.* 2007). UV.A ve UV.B nitrojen türevlerini ve ROT sistemini üretmesine sebep olduğu bilinmektedir. Bunlar biyolojik sistemlerde gen mutasyonlarına; DNA'da zararlara dolayısıyla kansere sebep olmaktadır. Rosso *et al.* (2008) likenlerden izole ettiği

depsid ve depsidonun nitroksil verici angeli tuzunun ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) sebep olduğu tek zincir DNA kırıklarını azalttığını gözlemlemiş, bu bileşiklerden depsidonun major etkisinin olmamasının sebebini ise serbest oksijen radikalleri ile ilişkilendirmiştir. Yine aynı çalışmada liken konsantrasyonunun artması ile ROT aktivitesinde artış gözlenmiş, ROT aktivitesinin artışı likenlerin apoptozise yönlendirici etkisiyle açıklamıştır.

Diğer benzer bir çalışma da likenlerden izole edilen epigallokatektin gallet, quercetin, gallik asit curcurin, eugenol bileşiklerinin anti yaşlanma ve antikanser özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Fusisava *et al.* 2002; Loo 2003).

Zeytinoğlu ve ark (2008) *Cetraria aculeata*'dan elde edilen aseton ekstrasının antimutagenik özelliklerini S typhimurium TA98 ve TA100 testi ile araştırmışlar bu sistemlerde aseton ekstrasının antigenotoksik etkisinin olduğunu fakat memeli sistemlerinden olan MN testinde ise genotoksik etkisinin olmadığını antimutagenik özelliğinin ise ekstraktta bulunan protolikesterinik asit, usnik asit likensturinik asit ve polisakkarit Ci 3 den kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir (Turkel vd 2003; Ogmundsdottir *et al.* 1998; Orange *et al.* 2001; Olafsdottir 1999).

Lin *et al.*(2003) likenlerden elde edilen polisakkarid CFP-2 nin HL 60 ve K562 hücrelerinin miktarını değiştirerek azalttığı yani apoptozis ve telomerez aktivitesini değiştirerek antikanser özelliği sahip olduğunu bildirilmişlerdir (Lin *et al.* 2003).

Yine likenlerle ilgili diğer bir çalışmada *Cetraria islandica*'dan elde edilen protolikesterinik asidin kanserde malignant hücre oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ogmundsdottir *et al.*1998).

Peltigera canina'nın metanol ekstratlarından elde edilen ve yapısında galaktoz, mannoz, glukoz, fukoz, arabinoz monosakkaritleri bulunan Pc-1, Pc-2,Pc-3,Pc-4 polisakkaritlerinin farelerde TNF α sekresyonunu artırarak(sitokininler) immün sistemi güçlendirdiği ve buna bağlı olarakta antikanser tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Omarsdottir *et al.*2005).

Geyikoğlu ve Türkez (2007) bismutsitrat karşı *Pseudevernia furfuraceae*, *Dermatocarpon intestiniforme*, *Ramalina capitata*, *Parmelia pulla* türlerinden elde edilen ekstraktların KKD testi ile antigenotoksik etkinin olduğu belirlemişler ve antigenotoksik etkisinin bu likenlerin içeriğinde bulunan antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşiklerde kaynaklandığını ve antimutagenik özelliğinin temelinde de bu sistemin etkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

Çelikler ve ark. (2009) alg ekstraktlarının invitro insan lenfosit kültürlerinde antigenotoksik etkisinin olduğunu bununda ROT sistemi ile alakasının olabileceğini belirtmişler ve bu mekanizmanın temelinde alg içeriğinde bulunan polifenol, klorofil, vitamin ve proteinden kaynaklanabileceğini ile açıklamışlardır.

Genel anlamda biyolojik sistemlerde antimutagenite özelliği aynı zamanda antikanser anlamına gelebilir. Bundan hareketle bazı araştırmacılar liken ekstraktlarından izole edilen protolikeesterinik asiti, lobarik asit, usnik asitin tümör oluşumu üzerine etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Cordenelli *et al.* 1997; Lin *et al.* 2003; Bucor *et al.* 2004).

Cladonia rangiformis, *Cetraria islandica*, *Lecanora muralis*'te 5µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml ve 10µg/ml'lık dozları KKD ve MN frekansını düşürürken; *Parmelia somloensis*'te 5µM AFB₁ ile birlikte verilen 5µg/ml ve 10µg/ml'lık dozu KKD miktarında çok fazla bir değişikliğe sebep olmamış, bu değer istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Artan liken konsantrasyonu ile bunun sitotoksik etki yapabileceği düşünülmektedir.

Benzer çalışma *C.rangiformis*'den elde edilen stistik asitin ve ekstralarının normal hücrelere karşı sitotoksik etkisinin olduğu ifade edilmiştir (Perry *et al.* 1999).

Yine likenlerden izole edilen vulpunik asitin *Spodoptera ornithogelle* türlerinde larval peryotta ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (Slansky 1979).

Yaptığımız çalışmalarda AFB₁'in SOD aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubunda ki SOD aktivitesi, sadece AFB₁ verilen grupla karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$).

Organizmada metabolik ve fizyolojik olaylar sonucu ROT üretilmekte ve zararlı oksidatif reaksiyonlar oluşabilmektedir (Erel 2004). Günümüzde çok sayıda araştırmacı serbest radikallerin DNA, proteinler, lipitler ve hücrenin diğer bileşenleri üzerinde sebep olduğu oksidatif hasarı araştırmaktadır (Çakatay ve Kayalı 2004). Serbest radikallerin nukleusta ve DNA'daki etkileri genotoksik ve mutajeniktir. Serbest radikaller pürin ve pirimidin modifikasyonuna veya DNA iplikleri ve kromozom kırılmalarına, onkojen aktivasyonuna neden oldukları için karsinogenezi önemli rol oynarlar (Seven ve Candan 1995; Barrington *et al.* 1996). Aflatoksinlerde ROT'lerinin seviyesinde artmaya neden oldukları bildirilmiştir (Lee *et al.* 2005). AFB₁ özellikle serbest radikallerden DNA, protein ve lipidlerle kolayca reaksiyona girerek DNA'nın yapısında mutasyonlara, proteinlerin yapısına bağlanarak proteinlerde yapı değişikliklerine ve dolayısıyla da proteinlerin oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olan $\cdot\text{OH}$ radikalinin salınımına neden olurlar (Bedard and Massey 2006).

ROT'lerinin azaltılmasını veya başka moleküllere çevrilmesini antioksidan sistemler sağlamaktadırlar. Bu antioksidan sistemlerin enzimatik olanlarından en önemlilerinden bir tanesi süperoksit radikallerini O₂ veya daha az reaktif olan H₂O₂'e dönüştüren SOD enzimidir (Mc Cord and Fridovich 1969). Verma ve Nair'in (2001), yapmış olduğu çalışmada total aflatoksin kullanımının (25 veya 50 mg/aflatoksin/hayvan/gün) DNA, RNA ve protein miktarını ve SOD enzim aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Ratların karaciğeri üzerine yapılan çalışmada da, AFB₁ verilen ratlarda SOD aktivitesi kontrol grubunda AFB₁ verilen gruba göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Preetha *et al.* 2006). Ross PM3 ırkı piliçlere de aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) yem verildiğinde 15, 30 ve 45 günlük kan parametrelerinde SOD aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (Eraslan vd 2005). Çalışmamızın bulguları yukarıda belirtilen literatürlerle paralellik göstermektedir. Oksidatif stresin SOD aktivitesini düşürmesinin sebeplerinden birincisi, ROT'lerinin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi

yapmaları, ikinciside, ROT'lerinin proteinlere bağlanarak proteinlerde yapısal değişikliklere ve buna bağlı olarakta proteinlerin oksidasyonuna neden olmalarıdır. Buna ilaveten lipid peroksidasyonunun artması ve buna bağlı olarak ortaya çıkan aldehitler SOD aktivitesi üzerine azaltıcı etkiye sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Venkataraman *et al.* 2004).

Diğer bir antioksidan enzim olan GPx ise hidroperoksitlerin ortadan kaldırılmasında etkilidir (Armstrong 1998). Yaptığımız çalışmada AFB₁'in GPx aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda GPx aktivitesi AFB₁ grubuna göre daha düşük ölçülmüş, aradaki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Daha önce yapılan benzer bir çalışmada ratlara AFB₁ verilen grupta karaciğerde ki GPx aktivitesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Preetha *et al.* 2006). Total aflatoksin kullanımı (25 veya 50 mg/aflatoksin/hayvan/gün) ile DNA, RNA, protein miktarında ve enzim aktivitesinde önemli derecede azalma meydana geldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Verma and Nair 2001). Ross PM3 ırkı piliçlere aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) yem verilmiş, 15, 30 ve 45. günlerinde kan alınarak GPx seviyeleri ölçülmüş, GPx aktivitesinde azalma görülmüştür (Eraslan vd 2005). AFB₁'in neden olduğu oksidatif stresin GPx aktivitesini düşürmesinin sebeplerinden birincisi AFB₁'in neden olduğu ROT'lerinin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yapmalarıdır. İkinci bir sebepte, ROT'lerinin proteinlere bağlanarak proteinlerde yapısal değişikliklere ve buna bağlı olarakta proteinlerin oksidasyonuna neden olmalarıdır (Janssen *et al.* 1993; Preetha *et al.* 2006). GPx aktivitesinin azalmasının bir diğer sebebi de GPx aktivitesinin GSH miktarına bağlı olmasıdır. Oksidatif stres GR aktivitesinin azalmasına neden olarak GSH miktarını azaltmakta (Preetha *et al.* 2006), buna bağlı olarakta GPx aktivitesi azalmaktadır. Özetle GPx aktivitesinin azalması GSH'nin azalmasına, GPx sentezinin azalmasına, enzim bozulmasının artmasına ve enzimin inaktivasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir (Janssen *et al.* 1993; Krishnamoorthy *et al.* 2007).

Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan MDA lipid peroksidasyonunu gösteren parametrelerden birisidir (Seven ve Candan 1995). AFB₁ lipid peroksidasyonunun

dolayısı ile de onun bir ürünü olan MDA miktarının artmasına neden olur (Shen *et al.* 1994). Yaptığımız çalışmada kontrol grubunda MDA miktarı düşük iken AFB₁ ilave edilen grupta daha yüksek olarak ölçülmüştür. Aradaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Ratların karaciğeri üzerine yapılan benzer bir çalışmada, AFB₁ (1 mg/kg) verilen grupta lipid peroksidasyonunun arttığı buna bağlı olarak MDA miktarı kontrol grubunda düşük iken, AFB₁ grubunda ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Preetha *et al.* 2006). Ross PM3 ırkı piliçlere aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) yem verilmiş 15, 30 ve 45. günlerinde kan alınarak MDA miktarı ölçülmüş, MDA miktarı kontrol grubuna göre artma göstermiştir (Eraslan vd 2005). PCB (Aroclor 1254) ile yapılan çalışmada ise PCB'nin H₂O₂, OH⁻ iyonu miktarı ile lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı olarak MDA miktarını artırdığı bildirilmiştir (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007). Ayrıca arsenik'in neden olduğu oksidatif stresden dolayı da MDA miktarının arttığı gösterilmiştir (Chang *et al.* 2007). Aflatoksinlerin MDA seviyesini artırmalarının nedeni çeşitli araştırmacılar tarafından ROT'lerinin artışına ve bunun da lipid peroksidasyonunu artırmasına bağlanmıştır (Verma and Nair 2001; Lee *et al.* 2005; Bedard and Massey 2006; Alpsoy vd 2009).

AFB₁ ile beraber likenlerin metanol ekstratları verildiği kültürlerde genel anlamda SOD GPx aktivitesi artmış, MAD aktivitesi ise azalmıştır. Bu değerler istatistik açıdan önemli bulunmuştur. ($p<0.001$).

Birçok liken türünün antioksidant özelliği bilinmektedir. Likenlerin bu antioksidant özelliği yapılarında bulunan flavonoidlerden, epigallokatektin, gallat, quercetin, gallik asit, kurkumin, eugenol, olarak fatty asit, lakton, antrhraquinon, depsid, depsidon, tridepsidon gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Loo 2003, Fujisawa *et al.* 2002; Atsumi *et al.* 2005).

Cetraria islandica'dan elde edilen protolikensterinik, α -metilen γ -lakton fumarprotosetrik asit, β -arsinol ve depsidon asitin ve *Usnea longissima*' dan elde edilen diffraktaik asit ve usnik asitin güçlü antioksidant özelliğinin olduğu tespit edilmiştir

(Oggmunddottir *et al.* 1998; Starner *et al.*1998; Snachez-Mareno *et al.*1999; Malencic *et al.*2002).

Cetraria islandica'dan ile yapılan başk a b i r araştırmada ise bu bitkiden izole edilen aliphatik α -metilen α - lakton HIV-IRT'nın(Human immunodefect virus I revers transtriptase) DNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği ifade edilmiştir (Ponggusupurp *et al.*1995).

Ratlarda *Usnea longisima*'dan elde edilen su ekstraktlarının indomethasinin sebep olduğu ulsere karşı antiulser aktivitesinin olduğunu ve bununda SOD, CAT, GST aktivitesi üzerine olan etkisiyle ilişkilendirmişlerdir (Odabasoglu vd.2006).

Pseudevernia furfuraceae ve *Dermatocarpon intestiniforme* elde edilen fenolik bileşiklerin antioksidant aktivitesinin olduğunu ve dolayısıyla SCE ile yapılan antimutagenik aktivitesinin bundan kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir (Geyikoğu ve Tırkez 2007).

Araştırmada kullandığımız bazı likenlerimiz; AFB₁'in KKD ve MN'yi yükseltici etkisini inhibe edip KKD ve MN frekanslarını azalttığı görölürken, biyokimsal analizlerde aynı etkiyi göstermemiştir. Bu sonuçlar çalışmada kullanılan likenlerimizin antigenotoksik etkisinin olduğu fakat bu etkisinin antioksidant özelliğinin kaynaklanmadığını göstermektedir. Örneğin *Umbilicaria vellea* AFB₁'in KKD ve MN'yi yükseltici etkisine karşı çok iyi sonuç verirken biyokimyasal analizlerde aynı etkiyi göstermediğini tespit edilmiştir.

Bunun tam aksine yine bazı likenlerimiz biyokimyasal analizlerde çok iyi etki gösterirken, MN ve KKD frekanslarında anlamlı bir azalma görölmemektir. Örneğin *Lecanora muralis*'in MN ve KDD frekansları diğer likenlere göre daha düşük, yani AFB₁'in MN ve KKD yükseltici etkisine karşı daha düşük koruyuculuğu olmasına rağmen yapılan biyokimyasal analizlerde özellikle GPX ve MDA değerleri kontrolle aynı ya da çok yakındır. Bu bulgular likenin antigenotoksik etkisinin az olmasına karşı

antioksidant aktivitesinin yüksek olduğunu gösterir ve aynı zamanda likenlerin antimutajenite temelinde antioksidan özelliğinin olmadığı anlamına gelmektedir.

Her ne kadar bulgularımızda ifade edilmemiş olsa da bazen biyolojik sistemlerde bitki ekstraktların konsantrasyonlarını artmasına bağlı olarak ROT aktivitesi almıştır. ROT artışın sebebinin apoptozise öncülük eden kaspazların artması anlamına geldiğini ifade edilmiştir. Biyolojik sistemlerde yeterince ROT olması apoptozise öncülük eden sitoplazmik protein kinaz, MAPK kaspaz enzimlerinin aktivitesini artırır. ROT aktivitesinin artması kısacası bu enzim aktivitelerinin artması anlamına gelmektedir. Ayrıca mitokondrial zarar ROT sisteminin asıl kaynağıdır. Aşırı kaspaz ve ROT üretimi mitokondrial zarara sebep olmaktadır. Membran potansiyel kaybı ve cytochrome C serbest bırakılması apoptozise içerisine alan bir olaydır. Dolayısıyla liken konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak ROT aktivitesinin artması veya değişmemesinin sebebi AFB₁ in mutagenik etkisinin altında ROT olmaması ve veya likenlerin kanseri önleyici mekanizması olan apoptozisi yönlendirici sebebinin olduğu düşünülmektedir.

5.1. Öneriler

AFB₁'in mutajenik ve kanserojenik etkisi yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. AFB₁'in bu mutajenik ve kanserojenik etkisine karşı, antagonistik etkisi olan birçok madde çalışılmış ve bunların etkileri ortaya konulmuştur. Ancak yapılan çalışmaların tamamı kromozomlar üzerine olan antimutajenik, antigenotoksik etkileri ile biyokimyasal parametreler üzerine olan etkisi ayrı ayrı çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda her iki parametre üzerine AFB₁'in etkisi ve liken metanol ekstratlarının antagonistik etkisi çalışılması yönünden önemlidir.

Liken ekstraktlarının AFB₁'in neden genotoksik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine antagonistik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda antigenotoksite'den sorumlu olan bitki ekstraktlarının kimyasal bileşenleri aydınlatılarak, etken maddenin izole edilip aktivitelerinin hangi derecede etkili olduğu araştırılması yapılabilir. Ekstratların antimutajenite aktiviteleri serbest radikalleri

toplayabilme özelliğinden veya multifaktoriyel kaynaklı olabilir. Bu sebeple antimutagenite etki mekanizması ayrıntılı olarak çalışılabilir. Bundan sonraki çalışmaların bu noktaya odaklanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdullaev, L. Riverón-Negrete, H. Caballero-Ortega, J. Manuel Hernández, I. Pérez-López, R. Pereda-Miranda and J.J. Espinosa-Aguirre, Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.), *Toxicol. In Vitro* **17** (2003), pp. 731–736.
- Acar A, Durakbası HG, Paydak F. Alüminyum sülfatın insan periferik kan lenfosit kültürlerinde mikronukleus uyarımı üzerine etkileri. *S Ü Tıp Fak Derg* 1995;11:139-44.
- Ahmad, MS., Sheeba, Afzal, M., 2004. Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions*, 149, 107–15.
- Ahmad, S., Hoda, A. and Afzal, M., 2002. Additive action of vitamins C and E against hydrocortisone-induced genotoxicity in human lymphocyte chromosomes. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72, 204–209.
- Ahmadjian, V. (1993) *The lichen symbiosis*. Wiley, NewYork, pp. 1- 6.
- Akbaş, E., Çelik, A., Derici, E., Söylemez, F., 2001. The investigation of cigarette smoking on the lymphocyte life time and genotoxic effects. *Turkish Journal of Geriatrics*, 4, 15-18.
- Akkuş, İ., 1996. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Mimoza Yayınları.
- Alarcon, C., Nieto, A., Martin, M.J., Cabre, F., Herrieras, J., Motilva, V., 2002. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rats: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm. Res.* 51, 51–57.
- Algur ÖF., 1992. Temel Biyoteknoloji Ders Notları. Atatürk Üniversitesi, 185, Erzurum.
- Allen, JW., Latt, SA., 1976. in vivo BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma*, 58(4), 325-340.
- Alpsoy, L., The protective role of selenium against the genotoxicity induced by aflatoxin B1 in root cells of crop plants, Agar, G. Alpsoy, L. and Yildirim, N., 01/04/2005, *Fresen. Environ. Bull.*
- Alpsoy, L., The Antioxidant Effects of Vitamin A, C and E on Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress in Human Lymphocytes, Alpsoy, L., Yıldırım, A. and Agar G., 01/03/2009, 2, *Toxicology and Industrial Health*
- Alpsoy, L., 2010, Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities, *African Journal of Biotechnology*, 9, 2474-2481.
- Altun, D., 2007. *Usnea longissima* Ach. Licheninin *Drosophila Melanogaster*' İnde Çeşitli Gelişim Parametreleri Ve Ömür Uzunluğu Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ERZURUM.
- Andrew S., Wilson, DP., Williams, CD., Davis, MD., Tingle, B., Kevin Park, 1997 Bioactivation and inactivation of aflatoxin B by human, mouse and rat liver preparations: Effect on SCE in human mononuclear leucocytes. *Mutation Research*, 373, 257–264.
- Arda M., 1980. Mikoloji (Genel ve Özel). Ankara Üniversitesi Basımevi, 260–269.
- Armstrong, DA., 1998. *Methods in molecular biology*. Volume 108, Toronto, Humana Press.

- Aruoma, O., Kauai, H., Halloween, B., 1991. Oxygen free radicals and human disease. *Journal of the Royal Society of Health*, 111(5), 172–177.
- Asada, K., 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 50, 601–639.
- Asahina, Y., “Lichenologische Notizen (§205)”, *J Jap Bot*, 42: 289– 294 (1967).
- Aslan A. and Öztürk A. Oltu(Erzurum) Yöresine Ait Liken Florası Üzerine Çalışmalar. *Tr. J. of Botany* 1994; 18: 103-106.
- Aslan A. Erzurum-Kars-Artvinarasında yer alan bölge likenleri üzerine taksonomik incelemeler. *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*.Bursa 1995.
- Aslan A. Lichens from the Regions of Artvin, Erzurum, and Kars(Turkey). *Israel Journal of Plant Sciences* 2000; 48: 143-155.
- Atsumi, T., Fujisawa, S., Tonosaki, K., 2005. Relationship between intracellular ROS production and membrane mobility in curcumin- and tetrahydrocurcumin-treated human gingival fibroblasts and human submandibular gland carcinoma cells. *Oral Diseases* 11 (4), 236–242
- Avani, G. and Rao, MV., 2007. Genotoxic effects in human lymphocytes exposed to arsenic and vitamin A. *Toxicology in vitro*, 21, 626-631.
- Baccouch, S., Chaoui, A., El Ferjani, E., 1998. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 36 (9), 689–694.
- Badr, FM., El-Habit, OH., Hamdy, M. and Hassan, GA., 1998. The mutagenic versus protective role of vitamin A on the induction of chromosomal aberration in human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 414, 157-63.
- Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Vignesh, C., Aruldhha, MM. and Arunakaran, J., 2006. Role of a-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 2040–2046.
- Baron, G., 1999. *Understanding Lichens*. Richmond Publishing Slough, England.
- Boustie, J., and Grube, M., 2005. Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273–287.
- Barondeau, DP., Kassmann, CJ., Bruns, CK., Tainer, JA., Getzoff, ED., 2004. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*, 43, 8038–8047.
- Barrington, JW., Lindsay, P., James, D., Smith, S. and Roberts, A., 1996. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 103, 130-132.
- Basiviredy, J., Jacob, M., Ramamoorthy, P., Pulimood, A.B., Balasubramanian, K.A., 2003. Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. *Biochem. Pharmacol.* 65, 683–695.
- Basu TK, Temple NJ, Garg ML, 1999. *Antioxidants in Human Health and Disease*. New York, CABI Publishing, 2. Bölüm, 15–17.
- Batt, TR., Hsueh, JL., Chen, HH. and Huang, CC., 1980. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in V79 cells induced by aflatoxin B1, B2, G1 and G2 with or without metabolic activation. *Carcinogenesis*, 1(9), 759-76.

- Baysal, V., Sahin, F., Erel, A., Oruk, S., Menevşe, S., 2003. The effect of PUVA treatment on sister chromatid exchange (SCE) values in psoriasis vulgaris patients. *The Journal of Dermatological Treatment*, 14, 22-5.
- Baytop, T., 1999. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. Istanbul University, Istanbul, p. 233.
- Bayır, Y., Odabasoglu, F., Cakir, A., Aslan, A., Suleyman, H., Halici, M. and Kazaz, C. (2006) The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 13, 584-590.
- Bedard, L.L. and Massey T.M., 2006. Aflatoxin B(1)-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, 164, 584-22.
- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A. and Makhija, U. (2005) Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytotherapy Research*. 19, 58–64.
- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R.M., 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions*, 31, 1441–1444.
- Betina V., 1989. *Mycotoxins, chemical, biological and environmental aspects*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, 437.
- Bezivin C, Tomasi S, Lohezic-Le Devehat F, Boustie C. 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 10: 499–503
- Biewenga, G., de Jong, J. and Bast, A., 1994. Lipoic acid favors thiolsulfinate formation after hypochlorous acid scavenging: a study with lipoic acid derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 114–20.
- Biswas, K., “Common medicinal plants of Darjeeling and the Sikkim-Himalayas”, pp 90 (1956).
- Blackwell, W.H. (1990) *Poisonous and Medicinal Plants*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, p. 103.
- Boehme, D.S., Hatchkiss, J.A. and Handerson, R.F., 1992. GSH and GSH dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone. *Experimental and Molecular Pathology*, 56, 37–48.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brigelius-Flohe, R., and Traber, M.G., Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13, 1145 -1155.
- Bucar F, Schneider I, Ögmundsdottir H, Ingolfssdottir K. 2004. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine* 11: 602–606
- Bukan, N., 1999. Glibenklamidin streptozotosin-diabetik ratlarda kalp dokusu süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerine etkisi. *Uzmanlık Tezi*. Ankara Gazi Üniversitesi.
- Bullerman, L.B., 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *Journal of Food Protection*, 42 (1): 65–86.
- Bullerman, L.B., 1986. *Mycotoxins and Food safety: food technology. a scientific status summary by the institute of food technologists*. Expert Panel on Food Safety and Nutrition, 59 -66.

- Carderelli M, Serino G, Campanella L et al. 1997. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell Mol Life Sci* 53: 667–672.
- Carrano, AV., Thompson, LH., Lindi, PA. and Minkler, JL., 1978. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271, 551–553
- Chan, HT, Chan, Ho JW., 2003. Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in hepatoma cells. *Toxicology*. 30, 211–217
- Chao, JC., Huang, CH., Wu, SJ., Yang, SC., Chang, NC., Shieh, MJ. and Lo, PN., 2002. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 13, 427–434.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, MC. and Mecocci C., 2005. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 39, 841–852.
- Chlopkiwicz, B., Marczevska, J., Koziorowska, J., 1991. An evaluation of antimutagenic properties of vitamin E. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 48, 33-4.
- Chu, FS., 1977. Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 83–142.
- Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, PL., Sava, G., 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* ,89,137–146.
- Cook, N.C, Saman, S., “Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources”, *J Nutr Biochem*, 7: 66- 76 (1996).
- Coulombe Jr, AR., 1993 Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 880–91.
- Cruz AD, McArthur AG, Silva CC, Curado MP, Glickman BW. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium–137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat Res* 1994; 313:57–68.
- Çora T, Demirel S, Acar A, Erkul İ. Yenidoğan periferel kan lenfosit kültürlerinde fototerapinin uyardığı mikronukleuslar. *S Ü Týp Fak Derg* 1992;8:345-51.
- De Ferrari, M., Artuso, M., Bonassi, S., Bonatti, S., 1991. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and SCE analysis in peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*, 260, 105-113.
- Demirel S, Zamani G., Genel Tıp Derg 2002;12(3):123-12
- Denecker, G., Vercammen, D., Steemans, M., Vanden Berghe, T., Brouckaert, G., Van Loo, G., Zhivotovsky, B., Fiers, W., Grooten, J., Declercq, W., Vandenabeele, P., 2001. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 8 (8), 829–8240.
- Deng, DJ., Hu, GG., Luo, XM., 1988. Effect of beta-carotene on sister chromatid exchanges induced by MNNG and aflatoxin B1 in V79 cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 10(2), 89–91.
- Denizel, T., 1989. New perspective in aflatoxin toxicology and dry figs dilemma. *Uluslararası kuru incir ve aflatoxin sempozyumu*. 4–8 Nisan 1989-İzmir.
- Dilsizoğlu, A., Kavuncuoğlu, Z., Oba, D., 2004. Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. *Tübitak Bilim ve Teknik*, 439, 86–89.
- Djahanguiri, B., 1969. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 4, 265–267.
- Dobson FS. *Lichens: An Illustrated Guide to British and Irish Species*, by Fifth Edition Richmond Publishing, 2005.

- Duh, P.D., Tu, Y.Y., & Yen, G.C. (1999). Antioxidant activity of aqueous extract of harn jyr(*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Science and Technology Research*, 32, 269–277.
- Dulger, B., Güçün, F., Aslan, A., 1998. *Cetraria islandica* (L) Ach. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turkish Journal of Biology* 22, 11–118
- Eastmond DA, Tucker JD. Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 1989;13:34-43.
- El-Missiry, M.A., El-Sayed, I.H., Othman, A.I., 2001. Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against
- El-Zawahri, MM., Morad, MM., Khishin, AF., 1990. Mutagenic effect of aflatoxin G1 in comparison with B1. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10(1-2), 45-51.
- Emmerich, R., Giez, I., Lange, O.L. and Proksch, P. (1993) Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphageous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry*, 33, 1938.
- Eraslan, G., Akdoğan, M., Yarsan, E., Şahindokuyucu, F., Eşsiz, D., Altıntaş, L., 2005. The Effects of Aflatoxins on Oxidative Stress in Broiler Chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 701–707.
- Erdemli, EA., 2006. Hücre hasarı ve ölümünde rol alan mekanizmalar. *Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi*. <http://web.inonu.edu.tr/~histoloji/Kongre/sunu/ppt>. (29 Haziran 2008). Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986;161:193-8.
- Erdem, H, Özen, N., 1990. Aflatoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Açısından Önemi, O.M.Ü. Ziraat fakültesi Dergisi, Cilt:5, Sayı:1-2, Samsun
- Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985;43:233-46.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., 2002. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 177 (1), 39–54.
- Gadhia, P., Gadhia, M and Zankl, H., 1991. Adriamycin-induced sister chromatid exchange and chromosomal aberrations in Down's syndrome lymphocytes. *Mutagenesis*. 6, 31–33.
- Gantt, R., et all. 1978. Fluorescent light-induced DNA crosslinkage and chromatid breaks in mouse cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75, 3809-12.
- Garret, NE, Stack, HF and Waters, MD., 1986. Evaluation of the genetic activity profile of 65 pesticides. *Mutation Research*, 168, 301-325.
- Garty, J., 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2 (4), 309–371.
- Geyikoğlu, F., Türkez, H., 2006. Protective effect of sodium selenite against the genotoxicity of aflatoxin B1 in human whole blood cultures. *Brazilian Archives of Biology And Technology*, 49, 393–398.
- Geyikoğlu, F., Türkez, H., 2007. *Toxicology and Industrial Health*. 23, 487-492.
- Ghosh, R. and Ghosh, PK., 1987. The effect of tobacco smoking on the frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocyte chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 21, 15–9.

- Gilbert, O., 2000. The lichens of disused World War 2 airfields, *Lichenologist*, 32, 585-600.
- Gözükara, EM., 1997. *Biyokimya*. İstanbul, Evin Matbaası.
- Groopman, JD. and Kensler, TW., 1988. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *CRC Critical Review in Toxicology*, 19(2), 113-145.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kufrevioglu, O.I., Aslan, A., 2002. Determinations of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *J. Ethnopharm.* 79, 325–329.
- Gutteridge, JMC., Halliwell, B., 1994. *Antioxidants in nutrition, health and disease*. New York. Oxford University Pres.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet*, 23, 1396-1398.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4), 569–605.
- Halliwell, B. and Gutteridge, JMC., 1996. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. 2nd Edition Clarendon Pres.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition, Oxford Science Publications, 22–24.
- Harmala, P., Hiltunen, R., Caldentey, KM., Laakso, T., Kauppinen, V., 1992. Isolation and in vitro cultivation of lichen alga and their antimicrobial properties. *Fitoterapia* 63 (3). 3217-3225.
- Hartman PE, Shankel DM., *Antimutagens and Anticarsinogens a Survey of Putavite Interceptör Molecules, Enviromental and Molecular Mutagenesis*, 15, 145-182.
- Hastings CE. JR., Llewellyn GC., 1987. Reduced aflatoxicosis in livers of hamsters fed a manganese sulfate supplement. *Nutrition and Cancer*, 10, 67-77.
- Heddle JA, Countryman RI. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976;41:321-32.
- Hidalgo, M.E., Quilhot, F.W., Lissi, E., 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry* 37,1585–1587.
- Hoogenboom LA., Tulliez J., Gautier JP., Coker RD., Melcion JP., Nagler MJ., Polman TH., Delort-Laval J., 2001. Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. *Food Additives and Contaminants*, 18(1), 47–58.
- Hsieh, DPH., Wong, ZA., Wong, JJ., Michos, C., and Ruebner, BH., 1977, *Comparative Metabolism of Aflatoxin: Mycotoxins in Human and Animal Health*. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (Eds.), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois, 37-50.
- Huang, CC., Hsueh, JL., Chen, HH. and Batt, TR., 1982. Retinol (vitamin A) inhibits sister chromatid exchanges and cell cycle delay induced by cyclophosphamide and aflatoxin B1 in Chinese hamster V79 cells. *Carcinogenesis*, 3, 1-5.
- Hubel, CA., Roberts, JM., Taylor, RN., Musci, TJ., Rogers, GM. and McLaughlin, MK., 1989. Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161, 1025-1034.
- Huneck, S., Yoshimura, I., “Identification of lichen substances”, Springer, Berlin Heidelberg, pp 304– 349(1996).
- Huneck, S., 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86, 559–570.
- Huneck S., *Biomedical and Life Sciences* December 03, 1999

- Huneck S. 2001. New results on the chemistry of lichen substances. In Progress in the Chemistry and Organic Natural Products 81, Falk H, Kirby GW, Moore RE (eds). Springer-Verlag: Springer, New York, 1–276.
- Houghton, P.J. and Manby, J. (1985) Medicinal plants of the Mapuche. Journal of Ethnopharmacology, 13, 89-103.
- İlçim A, Dıġrak M, Baġcı E. Bazı bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Tr. J. Of. Biology 1998; 22: 119-125.
- IARC, 1985. Aflatoxin, IARC Monographs (Suppl. 7), 83–87.
- IARC, 1987. Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 440 pp.
- IARC, 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 571 pp.
- IARC, 2002. Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 82. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Ingólfssdóttir, K., Bloomfield, S.F. and Hylands, P.J. (1985) *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 28, 289.
- Ingolfssdottir K, Hjalmarsdottir MA, Guojonsdottir GA, Brynjolfssdottir A, Sigurdsson A, Steingrimsson O. 1997. *In vitro* susceptibility of Helicobacter pylori to protolichesterinic acid from Cetraria islandica. Antimicrob Agents Chemother 41: 215–217.
- Ingolfssdottir, K., chung, G.A.C., Skulason, V.G., Gissurarson, S.R., Vilhemsdottir, M., 1998. Antimicrobial activity of lichen metabolites *in vitro*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 6, 141–144.
- Ingolfssdottir K, Lee SK, Bhat KPL et al. 2000. Evaluation of selected lichens from Iceland for cancer chemopreventive and cytotoxic activity. Pharm Biol 38: 313–317
- Ingólfssdottir, K. (2002) Molecules of interest: usnic acid. Phytochemistry, 64, 729-736
- İkbal M, Ezirmik N, Tos T, Pirim I. 2003. Association of sister chromatid exchange frequencies in patients with ankylosing spondylitis with and without HLA-B27. Annals of the Rheumatic Diseases. 62, 775-777.
- Ito, Y., Peterson, SW., Wicklow, DT. and Goto, T., 2001, Aspergillus pseudotamarii, a new aflatoxin producing species in Aspergillus section flavi, Mycological Research, 105(2), 233-239.
- Jagetia GC, Jacob PS. The influence of vinblastine treatment on the formation of radiation-induced micronuclei in Mouse bone marrow. Hereditas 1994;120:51-9.
- Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. Mutat Res 2001;491:9-16.
- Janssen, YM., Van Houten, B., Borm, PJ., Mossman, BT., 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. Laboratory. Investigation, 69, 261–274.
- Jin, S. and Levine, AJ., 2001. The p53 functional circuit. Journal of Cell Science, 114, 4139-4140.

- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N., ve Tiftik AM., 1998. Biyokimya Kitabı.1.Baskı, Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi Ünitesi. Konya.
- Karagül, H., Fidancı, UR., Altıntaş , A. ve Sel, T., 2000. Klinik Biyokimya. 1. Baskı, Meteksan, Ankara.
- Kashif, SM., Zaidi, R. and Banu, N., 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta.*, 340, 229–233.
- Kasprzak, KS., 2002. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*,32(10), 958-967.
- Kathirgamanathar, S., Williams, D.E., Andersen, R.J., Bombuwela,K., De Silva, D. and Karunaratne, V. (2005) Betaorcinoldepsidones from the lichen *Usnea sp.* from Sri Lanka. *Natural Product Research*, 19(7), 695-701.
- Kaya S., Pirinççi İ., Traş B., Bilgili A., Baydan E., Akar F., Doğan A. 1998. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*:35, 341-375.
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43–50
- Krishnaja, AP. and Sharma, NK., 2003. Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement*, 1, 99–112.
- Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., Vignesh, RC., Arulldhas, MM., Arunakaran, J., 2007. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reproductive Toxicology* 23, 239–245.
- Kristmundsdottir T, Aradottir HAE, Ingolfssdottir K, Ögmundsdottir HM. 2002. Solubilization of the lichen metabolite β -usnic acid for testing in tissue culture. *J Pharm Pharmacol* 54: 1447–1452.
- Landis “Common medicinal plants of Darjeeling and the Sikkim-Himalayas”, pp 90 (1956). Landis, GN. and Tower, J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 365–379.
- Latt SA and Schreck RR., 1980. Sister chromatid exchange analysis. *American Journal of Human Genetics*. 32(3):297-313. Review.
- Lawrey JD. Lichen Secondary Compounds: Evidence for a Correspondence Between Antitherbivore and Antimicrobial Function. *Bryologist*, 1989; 92: 326-331.
- Lee, JK., Choi, EH., Lee, KG., Chun, HS., 2005. Alleviation of aflatoxin B1 -induced oxidative stress in HepG2 cells by volatile extract from *Allii Fistulosi Bulbus*. *Life Sciences*, 77, 2896–2910.
- Li, D., Cao, Y., He, L. et al., 1993. Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*,14(2), 169-173.
- Lim, H., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., 2006. Effects of anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (5), 1046–1049.
- Lin X, Cai YJ, Li ZX, Chen Q, Liu ZL, Wang R. 2003. Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of cfp-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*. *Biochim Biophys Acta* 1622: 99–108
- Lin, Y.J., Seroude, L. and Benzer, S. (1998) Extended lifespan and stres resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science*, 282, 943-946.

- Loo, G., 2003. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14 (2), 64–73.
- Luberda, Z., 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*, 5(1), 5-17.
- Luna, C.M., Gonzalez, C.A., Trippi, V.S., 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35, 11–15.
- Lunec, J., Hollaway, K.A., Cooke, M.S., 2002. Urinary 8-Oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(7), 875-885.
- Malencic, D.J., Gasic, O., Popovic, M., & Boza, P. (2000). Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. *Phytotherapy Research*, 14, 546–548.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 577–586. 555.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and De Castro, I.N., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595–603.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990;239:29-80.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal Biological and Chemistry*, 244, 60409–60455.
- McLean, M., Dutton, M.F., 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology Therapeutics*, 65, 163–192.
- Mitsuda, H., Yuasumoto, K., Iwami, K., 1996. Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 19, 210–214.
- Morley, N., Clifford, T., Salter, L., Campbell, S., Gould, D., Curnow, A., 2005. The green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 21 (1), 15–22.
- Moore LE, Warner ML, Smith AH, Kalman D, Smith MT. Use of fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Envir Mol Mutagen* 1996;27:176-84.
- Müller, K., 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (1–2), 9–16.
- Muthuvel, R., Venkataraman, P. Krishnamoorthy, G., Gunadharini, D.N., Kanagaraj, P., Jone Stanley, A., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M. and Arunakaran, J., 2006. Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats. *Clinica Chimica Acta*, 365, 297 – 303.
- Halici et al. / *Phytomedicine* 12 (2005) 656–662 661 oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Ann. Clin. Biochem.* 38, 694–700.
- Lauterwein M., M Oethinger, K Belsner, T Peters and R Marre *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov 1995, 2541-2543, Vol 39, No. 11

- Lee, S., Simon, MD., 1999. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med*, 106, 37-42.
- Nash, I., Thomas, H., 1996. *Lichen Biology*. Cambridge University Press 304p, UK.
- Nixon JE, Hendrick JD, Pawlowski NE, Loveland PW, Sinnhuber RO., 1981. Carcinogenicity of aflatoxin in Fisher 344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 66, 1159-1163.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H. and Haramaki, N., 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *American Heart Journal*, 135, 115.
- Nordberg, J., Arner, ESJ., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31(11), 1287-1312.
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Halici M., Bayir, Y., "Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Three Lichen Species", *Phytother Res*, 18: 938– 941 (2004).
- Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y, Halici M., Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 2005; 76 (2): 216-219.
- Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 59–65.
- Ogmundsdottir, H.M., Zoega, G.M., Gissurarson, S.R., Ingolfsson, K., 1998. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50, 107–115.
- Olafsdottir ES, Ingolfsson K, Barsett H, Paulsen BS, Jurcic K, Wagner H. 1999. Immunomodulating polysaccharides from aqueous extracts of *Cetraria islandica* (Iceland Moss). *Phytomedicine* 6: 33–39.
- Orange A, James PW, White FJ. 2001. *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. British Lichen Society: London.
- Ottino, P. and Duncan, JR., 1997. Effect of α -tocopherol succinate on radical and lipid peroxidation levels in BL and melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 1145-1151.
- Ouariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherif, A., Ghorbal, M.H., 1997. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry* 4 (7), 343–1350.
- Ozer H, Sahin F, Kilic H, Gulluce M., 2005, Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. subsp *angustifolius* (Bieb.) Arcangeli from Turkey, *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 42-44.
- Özkaya, Ş. ve Temiz, A., 2003. Aflatoksinler : kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Mikrobiyoloji Dergisi*. 1, 1–21
- Öztürk, A., Aslan, A., 1991. Likenlerin ekonomik özellikleri ve Kuzeydoğu Anadolu'dan bazı liken türleri. *Yüzüncü Yıl Univ, Fen-Edeb. Fak, Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (2), 27–42
- Öztürk, A., 1995. Meme kanserli olguların lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi sıklığı. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antalya.
- Papas, A M., "Diet and antioxidant status", *Food Chem Toxicol*, 37: 999- 1007 (1999).

- Parcell, S., 2002. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Alternative Medicine Review*, 7, 22-44.
- Parkin, DM., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2001. Estimating the world cancer burden: globocan 2000. *International Journal of Cancer*, 94, 153–156.
- Pengsuparp, T., Cai, L., Constant, H., Fong, H.H.S., Lin, L.Z., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ingolfssdottir, K., Wagner, H., Hughes, S.H., 1995. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Natural Products (Lloydia)* 58, 1024–1031.
- Perry, P. and Evans, H.J., 1975. Cytological Detection Of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange, *Nature*, 258, 121-125).
- Perry NB, Benn MH, Brennan NJ et al. 1999. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist* 31: 627–636.
- Pietta, P, Simonetti, P, Mauri, P., “Antioxidant activity of selected medicinal plants”, *J Agric Food Chem*, 46:4487– 4490 (1998).
- Pohland, AE., 1993. Mycotoxins in Review. *Food Additives and Contaminants*, 10, 17-28.
- Porter, NA., Caldwell, SE., Mills, KA., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277–290.
- Preetha, S.P., Kanniappan, M., Selvakumar, E., Nagaraj, M., Varalakshmi, P., 2006. Lupeol ameliorates aflatoxin B1 -induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143, 333–339
- Purvis, O. W., Coppins, B. J., Hawksworth, D. L., James, P. W., Moore, D. M., 1992: *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland*. Natural History Museum Publications in association with The British Lichen Society, London, 710 pp.
- Valentão P., E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, and M. L. Bastos CEQUP/Serviço de Farmacognosia and CEQUP/Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (7), pp 3476–3479
- Rao, MV., Chinoy, NJ., Suthar, MB. and Rajvanshi, MI., 2001. Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity In human blood cultures. *Toxicology in vitro*, 15, 649–654.
- Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernandez, E., Hidalgo, M.E., Quilhot, W., Rubio, C., Boehm, F., Piazena, H., Oltmanns, U., 2002. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 68 (2–3), 133–139.
- Ricci, J.E., Gottlieb, R.A., Green, D.R., 2003. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 60 (1), 65–75.
- Richard F, Muleris M, Dutrillaux B. The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutat Res* 1994;316:1-7.
- Richardson, DHS., 1975. *The Vanishing Lichens*. David and Charles Newton Abbot.
- Richardson DHS. 1988. Medicinal and other economic aspects of lichens. In *CRC Handbook of Lichenology Vol.3*, Galun M (ed.). CRC Press: Boca Raton, 93–108
- Richardson, DHS., 1992. *Lichens as Pollution Monitors*. Richmond Publishing.
- Rosin MP, Gilbert AM. Modulation of genotoxic effects in humans: Mutation and the environment. Part E. New York: Wiley-Liss 1990 ; 51-9.

- Russo, A., Bonina, F., Acquaviva, R., Campisi, A., Galvano, F., Ragusa, N., Vanella, A., 2002. Red orange extract: effect on DNA cleavage. *Journal of Food Sciences* 67 (8), 2814–2818.
- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Acquaviva, R., 2006 b. Genistin inhibits UV
- Sachan, DS. and Yatim, AM., 1992. Suppression of aflatoxin B1-induced lipid abnormalities and macromolecule-adduct formation by L-carnitine. *Journal Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 11, 205-10.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity an inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407– 412.
- Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975;31:9-15.
- Scott, PM., 1978. Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. *Journal of Food Protection*, 41(5), 385-398.
- Seven, A. ve Candan, G., 1995. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim*, 8, 3906-3911.
- Sharby, TF., 1977. Küfler ve Mikotoksinler. Çev: İstanbulluoğlu, E. *Veteriner Hek. Der.*
- Shen, HM., Shi, CY., Lee, HP. and Ong, CN., 1994. Aflatoxin B1 induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127, 145-150.
- Siddique, YH., Afzal, M., 2005. Protective role of allicin and L-ascorbic acid against the genotoxic damage induced by chlormadinone acetate in cultured human lymphocytes. *Indian Journal Experimental Biology*, 43, 769-772.
- Siddique, YH., Beg, T. and Afzal, M., 2005. Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megestrol acetate-induced genotoxicity in mice. *Human and Experimental Toxicology*, 24, 121-127.
- Simizu, S., Takada, M., Umezawa, K., Imoto, M., 1998. Requirement of caspase-3-(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (41), 5033–5060.
- Sivikova, K., Piesova, E., Dianovski, J., 2001. The protection of vitamin E and selenium against carbon tetrachloride-induced genotoxicity in ovine peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*, 494, 135–142.
- Slansky, F.J.R. (1979) Effects of the lichen chemicals atranorin and vulpinic acid upon feeding and growth of larvae of the yellow striped armyworm, *Spodoptera ornithogalli*. *Environmental Entomology*, 8, 865- 868
- Smith, JE. and Moss, MO., 1985. Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance, Printed in Great Britain, Sons Limited, 143.
- Stahl, W. And Sies, H., 2002. Introduction: reactive oxygen species. *Research Monographs*, 1-2.
- Stajner, D., Milic, N., Mimica-Dukic, N., Lazic, B., & Igic, R. (1998). Antioxidant abilities of cultivated and wild species of garlic. *Phytother Research*, 12, 513–514.
- Stepanenko, L.S., Krivoshekova, O.E., Dimitrenok, P.S., Maximov, O.B., 1997. Quinones of *Cetraria islandica*. *Phytochemistry*, 565 46, 568.
- Stich HF, Rosin MP. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention. *Cancer Lett* 1984;22:241-53.

- Stich HF, Stich W, Parida BB. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Lett* 1982;17:125-34.
- Stoloff, L., 1977. Aflatoxins – an overview : mycotoxins in human and animal health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (eds), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. 7-29.
- Suleyman, H., Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Karagoz, Y., Gocer, F., Halici, M., Bayir, Y., 2003. Antiinflammatory and antiulcer effects of aqueous extract of *Lobaria pulmonaria*. *Phytomedicine* 10, 552–557.
- Sun Y, Larry WO, Ying LA. simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34/3: 497-500.
- Taylor JH, Woods PS, Hughes ML., 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 43, 122.
- Thannickal VJ and Fanburg BL., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology*, 279, 1005-1028.
- Thogersen, P.J. and Høiland, K. (1976) Chemical investigation of *Usnea longissima* in Norway. *Norwegian Journal of Botany*. 23, 115-116.
- Thomson, VE. and Evans, HJ., 1979. Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes and Chinese hamster cells exposed to aflatoxin B1 and n-methyl-n-nitrosourea. *Mutation Research*, 67, 47-53.
- Tilford GL. 1997. *Edible and Medicinal Plants of the West*. Mountain Press: Missoula
- Turna, G., 2008. Ehrlich asit solid tümör modeli oluşturulmuş farelerde thymus sipyleus ve taurinin karaciğer MDA, glutatyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi.
- Ueno, Y., 1985, The toxicology of mycotoxins. *Critical Review in Toxicology*, 14(2), 99-132.
- Uysal, H., Altun, D., Aşkın, H., & Aslan, A. (2009). The Effects of Water Extract of *Usnealongissima* Ach. on Some Development Stages in *Drosophila melanogaster*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(4), 450- 455.
- Valko, M., Rhodes, CJ., Moncola, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidativestress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40
- Vandana, S., Ram, S., Ilavazhagan, M., Kumar, GD., Banerjee, PK., 2006. Comparative cytoprotective activity of vitamin C, E and beta-carotene against chromium induced oxidative stres in murine macrophages. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60, 71–76.
- Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 1990;244:95-103.
- Vartia, K.O., 1973. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian, V., Hale, M.E. (Eds.), *The lichens*. Academic Press, New York, p. 547.
- Vartia, KO., 1950. Antibiotics in lichens. I. *Ann-Med Ex Biol Fenn*, 27, 46-54
- Vavilin, D.V., Ducruet, J.-M., Matorin, D.N., Venediktov, P.S., Rubin, A.B., 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *J. Photochem. Photobio. B* 42 (3), 233–239.

- Verma, R.J. and Nair, A., 2001. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian Journal Andrology*, 3, 217-221.
- Verma, R.S., Anugya, M., Srivastava, N., 2007. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 191-196.
- Von Ledebur MM, Schmid W. 1973 The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res*;19:109-17.
- Wang, J. and Groopman, J.D., 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*, 424, 167-181
- Wang JS, Shen XN, He X, Zhu YR, Zhang BC, Wang JB, Qian GS, Kuang SY, Zarba A, Egner PA, Jacobson LP, Munoz A, Helzlsouer KJ, Groopman JD, Kensler TW *Journal of the National Cancer Institute*, 91, 347-354, FEB 17 1999.
- Warner, H.R. (2005) Longevity genes; from primitive organisms to humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 235-242.
- WEITBERG, A.B., 1987. Antioxidants Inhibits the Effects of Vitamin C on Oxygen Radical-Induced Sister-Chromatid Exchanges. *Mutat. Res.*, 191(1):53-6.
- Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A. Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol* 2001;77:631-6.
- William, B., 2004. SANDERS Bacteria, algae, and phycobionts: maintaining useful concepts and terminology *The Lichenologist*, 36 (5), 269-275.
- Wilson, B.J., 1978, Hazards of Mycotoxins to Public Health, *Journal of Food Protection*, 41(5), 375-384.
- Woods, J.R., Cavanaugh, J.L., Narkus, E.P., Plessinger, M.A. and Miller, R.K., 2002. The effect of labor on maternal and fetal vitamins C and E. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(5), 1179-1185.
- Woods, J.R., Plessinger, M.A., and Miller R.K., 2001. Vitamins C and E: missing links in preventing premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185, 5-10.
- Wyllie, T. ve Morehouse, L., 1977. *Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins*. Marcel Dekker. USA.
- Yazıcı, K., Aslan, A., 2006. Distribution of epiphytic lichens and air pollution in the city of Trabzon, Türkiye. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77, 838-845.
- Yoshida K, Yamazaki H, Ozeki S, Inoue T, Yoshioka Y, Yoneda M, et al. Mitochondrial genotype and radiation-induced micronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro. *Oncol Rep* 2001;3:615-9.
- Yücel, A., 1999. Medical mycology: yesterday and today. *Cerrahpasa Journal Medical*, 30 (2), 191-198.
- Zakharov AF, Baranovskaya LI, Ibraimov AI, Benjusch VA, Demintseva VS, Oblapenko NG. 1974. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes 5-bromodeoxyuridine and 5-bromodeoxycytidine-revealed differentiation in human chromosomes. *Chromosoma*. 29;44(4):343-59.
- Zeytinoglu H, Incesu Z, Tuylu BA, Turk A, Barutca B. 2004. The antimutagenic and antimutagenic properties of the extract of the lichen *Cetraria aculeata*. *Toxicol Appl Pharmacol* 197:641.

Zijno A, Marcon F, Leopardý P, Salvatore G, Carere A, Crebelli R. An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Fd Chem Toxic* 1994; 32:159-63.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum’da doğdu. İlköğrenimini, orta öğrenimini ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2003 yılında kayıt yaptırdığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı.