

TC.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ECZACILIK FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI LİKEN TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN SU, ETANOL VE  
ASETON EKSTRAKTLARININ ANTIOKSİDANT  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Selma MUTLU**

**Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi  
Erzurum 2008**

İÇİNDEKİLER .....	I
TEŞEKKÜR .....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	IV
TABLolar LİSTESİ .....	VI
KISALTMALAR .....	VIII
ÖZET .....	XI
SUMMARY .....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Antioksidantlar .....	4
2.1.1. Serbest radikaller .....	4
2.1.1.1. Serbest radikal çeşitleri .....	5
2.1.2. Serbest radikal kaynakları .....	12
2.1.3. Serbest radikallerin etkileri .....	17
2.1.4. Antioksidant savunma sistemleri .....	21
2.1.4.1. Endojen (Doğal) antioksidantlar .....	22
2.1.4.1.1. Primer antioksidantlar (Enzimler) .....	22
2.1.4.1.2. Sekonder antioksidantlar .....	28
2.1.4.2. Ekzojen antioksidantlar .....	31
2.1.4.3. Gıda antioksidantları .....	32
2.1.5. Antioksidant etki tipleri .....	32
2.2. Likenler .....	33
2.2.1. <i>Flavocetraria cucullata</i> (Bellardi) Kärnefelt & Thell .....	40
2.2.2. <i>Evernia divaricata</i> ( L. ) Ach. ....	41
2.2.3. <i>Physcia aipolia</i> ( Ehrh. ex Humb. ) Fűrnr. ....	42
2.2.4. <i>Ramalina polymorpha</i> (Lilj.) Ach. ....	43
2.2.5. <i>Usnea filipendula</i> Aggr. ....	44
3. MATERYAL ve METOD .....	45
3.1. Deneylerde kullanılan kimyasallar .....	45
3.2. Deneylerde kullanılan cihazlar .....	45
3.3. Deneylerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları .....	46
3.4. Deney bitkileri .....	47

3.5. Bitki ekstralarının hazırlanması .....	47
3.6. Bitki ekstralarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi .....	48
3.7. Bitki ekstralarında toplam fenolik bileşiklerin miktarlarının belirlenmesi .....	49
3.8. Bitki ekstralarında indirgeme kuvvetinin belirlenmesi .....	50
3.9. İstatistiksel analizler .....	50
4. BULGULAR .....	51
4.1. <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın antioksidan özellikleri .....	51
4.2. <i>Evernia divaricata</i> 'nın antioksidan özellikleri .....	57
4.3. <i>Phycia aipolia</i> 'nın antioksidan özellikleri .....	63
4.4. <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın antioksidan özellikleri .....	69
4.5. <i>Usnea filipendula</i> 'nın antioksidan özellikleri .....	75
5. TARTIŞMA .....	81
6. KAYNAKLAR .....	94

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve hazırlanmasında, rehberlik eden ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU'na ve Araştırma Grubumuzdan Arş. Gör. Mesut B.HALICI, Okt. Yasin BAYIR ve Fadime ATALAY'a,

Çalışmalarımın başından sonuna kadar her türlü desteği sağlayan ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında çok büyük emekleri olan, sayın Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR'a, bir çok zorluklara katlanarak dağ, bayır topladığı likenlerle çalışmama hüviyet kazandıran sayın Yrd. Doç. Dr. Ali ASLAN'a,

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde gerçekleştirilen bu çalışmanın ortaya çıkmasında desteklerini esirgemeyen Fakültemiz Dekanı sayın Prof. Dr. Yunus KARA, Temel Bilimler Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU ve nezdinde tüm Eczacılık Fakültesi personeline,

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme de sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>Sayfa No :</b>
<b>Şekil 1.</b> Glutasyon'un molekül yapısı .....	28
<b>Şekil 2.</b> Likenlerin simbiyont yapıları .....	35
<b>Şekil 3.</b> <i>Flavocetraria cucullata</i> (Bellardi) Kärnefelt & Thell doğal ortamdan çekilmiş resim .....	40
<b>Şekil 4.</b> <i>Evernia divaricata</i> ( L. ) Ach. doğal ortamdan çekilmiş resim .....	41
<b>Şekil 5.</b> <i>Physcia aipolia</i> ( Ehrh. ex Humb. ) Fürnr. doğal ortamdan çekilmiş resim .....	42
<b>Şekil 6.</b> <i>Ramalina polymorpha</i> (Lilj.) Ach. Doğal ortamdan çekilmiş resim .....	43
<b>Şekil 7.</b> <i>Usnea filipendula</i> Aggr.'nın doğal ortamında çekilmiş resmi .....	44
<b>Şekil 8.</b> Toplam fenolik bileşik miktarını belirlemede kullanılan gallik asit standart grafiği .....	49
<b>Şekil 9.</b> <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın su ekstresi (FCSE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	52
<b>Şekil 10.</b> <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın etanol ekstresi (FCEE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	54
<b>Şekil 11.</b> <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın aseton ekstresi (FCAE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	56
<b>Şekil 12.</b> <i>Evernia divaricata</i> 'nın su ekstresi (EDSE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	58
<b>Şekil 13.</b> <i>Evernia divaricata</i> 'nın etanol ekstresi (EDEE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	60
<b>Şekil 14.</b> <i>Evernia divaricata</i> 'nın aseton ekstresi (EDAE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	62
<b>Şekil 15.</b> <i>Physcia aipolia</i> 'nın su ekstresi (PASE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	64
<b>Şekil 16.</b> <i>Physcia aipolia</i> 'nın etanol ekstresi (PAEE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	66
<b>Şekil 17.</b> <i>Physcia aipolia</i> 'nın aseton ekstresi (PAAE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	68

<b>Şekil 18.</b> <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın su ekstresi (RPSE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	70
<b>Şekil 19.</b> <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın etanol ekstresi (RPEE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	72
<b>Şekil 20.</b> <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın aseton ekstresi (RPAE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	74
<b>Şekil 21.</b> <i>Usnea filipendula</i> 'nın su ekstresi (UFSE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	76
<b>Şekil 22.</b> <i>Usnea filipendula</i> 'nın etanol ekstresi (UFEE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	78
<b>Şekil 23.</b> <i>Usnea filipendula</i> 'nın aseton ekstresi (UFAE)'nin, trolox'un ve askorbik asitin antioksidan aktiviteleri .....	80

<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>Sayfa No :</b>
<b>Tablo 1.</b> Liken örneklerinden elde edilen ekstrelerin % verimi .....	48
<b>Tablo 2.</b> <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın su ekstresi (FCSE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması ...	52
<b>Tablo 3.</b> <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın etanol ekstresi (FCEE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması .....	54
<b>Tablo 4.</b> <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın aseton ekstresi (FCAE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması ...	56
<b>Tablo 5.</b> <i>Evernia divaricata</i> 'nın su ekstresi (EDSE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması	58
<b>Tablo 6.</b> <i>Evernia divaricata</i> 'nın etanol ekstresi (EDEE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması	60
<b>Tablo 7.</b> <i>Evernia divaricata</i> 'nın aseton ekstresi (EDA E)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması ...	62
<b>Tablo 8.</b> <i>Physcia aipolia</i> 'nın su ekstresi (PASE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması ...	64
<b>Tablo 9.</b> <i>Physcia aipolia</i> 'nın etanol ekstresi (PAEE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması	66
<b>Tablo 10.</b> <i>Physcia aipolia</i> 'nın aseton ekstresi (PAAE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması ...	68
<b>Tablo 11.</b> <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın su ekstresi (RPSE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması	70
<b>Tablo 12.</b> <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın etanol ekstresi (RPEE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması ...	72
<b>Tablo 13.</b> <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın aseton ekstresi (RPAE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması .....	74
<b>Tablo 14.</b> <i>Usnea filipendula</i> 'nın su ekstresi (UFSE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması ...	76
<b>Tablo 15.</b> <i>Usnea filipendula</i> 'nın etanol ekstresi (UFEE)'nin total antioksidan	78

aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması

**Tablo 16.** *Usnea filipendula*'nın aseton ekstresi (UFAE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması



## KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
CCl <sub>4</sub>	: Karbontetraklorür
· CCl <sub>3</sub>	: Triklorometil
Cu-Zn SOD	: Bakır-Çinko süperoksit dizmutaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDSE	: <i>Evernia divaricata</i> 'nın su ekstresi
EDEE	: <i>Evernia divaricata</i> 'nın etanol ekstresi
EDAE	: <i>Evernia divaricata</i> 'nın aseton ekstresi
FCSE	: <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın su ekstresi
FCEE	: <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın etanol ekstresi
FCAE	: <i>Flavocetraria cucullata</i> 'nın aseton ekstresi
ETS	:Elektron taşıma sistemi
Fe-SOD	: Demir süperoksit dizmutaz
GAE	: Gallik Asit eşdeğeri
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon (yükseltgenmiş glutasyon)
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş glutasyon)
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit

HNE	: 4-hidroksinonenal
HO <sup>·</sup>	: Hidroksil Radikali
HOCl	: Hidroklorik asit
HO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Peroksil
İG	: İndirgeme gücü
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
Mn-SOD	: Mangan süperoksit dizmutaz
MPx	: Miyeloperoksidaz
NAD <sup>+</sup>	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
ONOO <sup>-</sup>	: Peroksinitrit
NO <sup>·</sup>	: Nitrik oksit
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: nitrojen dioksit
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	: Süperoksit radikali
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	: Singlet oksijen
PASE	: <i>Phyiscia aipolia</i> 'nın su ekstresi
PAEE	: <i>Phyiscia aipolia</i> 'nın etanol ekstresi
PAAE	: <i>Phyiscia aipolia</i> 'nın aseton ekstresi
PCO	: Karboniller
PLGPx	: Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz
PUFA	: Polidoymamış yağ asiti
R <sup>·</sup>	: Karbon merkezli radikaller
RO <sup>·</sup>	: Alkoksil radikalleri
ROO <sup>·</sup>	: Peroksil radikalleri

ROS	: Reaktif Oksijen türleri
RPSE	: <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın su ekstresi
RPEE	: <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın etanol ekstresi
RPAE	: <i>Ramalina polymorpha</i> 'nın aseton ekstresi
RS·	: Tiyol radikalleri
RSO·	: Sülfenil radikali
RSO <sub>2</sub> ·	: Tiyol peroksil radikali
-SH	: Sistein tiyol grubu
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAA	: Total antioksidan aktivite
TNF	: Tümör nekroz faktör
TFB	: Toplam fenolik bileşikler
UFSE	: <i>Usnea filipendula</i> 'nın su ekstresi
UFEE	: <i>Usnea filipendula</i> 'nın etanol ekstresi
UFAE	: <i>Usnea filipendula</i> 'nın aseton ekstresi
XD	:Ksantin dehidrogenaz
XO	:Ksantin oksidaz
WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı

## ÖZET

Bu araştırmada ülkemizde yayılış gösteren likenlerden *Evernia divaricata*, *Flavocetraria cucullata*, *Physcia aipolia*, *Ramalina polymorpha* ve *Usnea filipendula* isimli türler antioksidan aktivite, fenolik bileşik miktarları ve indirgeme yetenekleri yönünden araştırıldı. Liken rneklerinin her bir türü için su, etanol ve aseton ekstreleri literatüre uygun yöntemler kullanılarak elde edildi ve her ekstre ayrı ayrı deneylere alınarak değerlendirildi.

Araştırmamızda *Evernia divaricata*'nın her üç ekstrelerinde güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu belirlendi. Doza bağlı olarak sırasıyla su ekstresi %79.7, 92.7 ve 93.8; etanol ekstresi %88.3, 95.0 ve 97.0; aseton ekstresi 93.5, 95.5 ve 97.9 oranında lipit peroksidasyonunu engelledi. Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere bu tür yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahiptir ve bu likenden elde edilen ekstreler içerisinde antioksidan aktivite su<etanol<aseton şeklinde sıralanabilir. Fenolik bileşik miktarları su, etanol ve aseton ekstrelerinde sırası ile  $34.3 \pm 0.8$ ,  $49.6 \pm 0.7$  ve  $63.7 \pm 1.2$  olarak tespit edildi. Fenolik bileşik miktarları arasındaki ilişkide antioksidant aktivitede olduğu gibi su<etanol<aseton ekstreleri şeklinde sıralanmaktadır. Diğer yandan indirgeme gücü su, etanol ve aseton ekstreleri için sırasıyla  $0.291 \pm 0.003$ ,  $0.170 \pm 0.002$  ve  $0.185 \pm 0.002$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar bize antioksidan aktivitenin yüksek olduğu ekstrelerde fenolik bileşiklerin miktarında daha fazla olduğunu göstermektedir. İndirgeme gücü ile ilgili bulgularımız içerisinde en dikkat çekici olanı da, su ekstresindeki sonuçlarda görülebilir. Nispeten daha düşük antioksidan aktivitenin tespit edildiği su ekstresinde belirlenen indirgeme gücü diğer ekstrelerden daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak bu araştırmada deney materyali olarak kullanılan liken türlerinin tümünün antioksidan potansiyele sahip olduğu ve biyolojik aktivite çalışmalarında öncelikli olarak değerlendirilebilecekleri kanaatine varıldı.

## SUMMARY

### DETERMINING THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF WATER, ETHANOL AND ACETONE EXTRACTS OF SOME LICHENS SPECIES.

In this study, of the lichens showing invasion in our country, the types such as *Evernia divaricata*, *Flavocetraria cucullata*, *Physcia aipolia*, *Ramalina polymorpha* and *Usnea filipendula* were investigated as regards antioxidant activity, the amount of phenolic compounds and reduction skills. Water, acetone and ethanol extracts were taken for each lichen by using suitable methods for literature, and each of extracts were taken to the experiment and assessed.

It is determined that all extracts of *Evernia divaricata* have potent antioxidant effect. Water extract %79.7, 92.7 and 93.8; ethanol extract %88.3, 95.0 and 97.0; acetone extract 93.5, 95.5 and 97.9 inhibited the peroxidation of lipids respectively. As it seems from these results these species have potent antioxidant activity and antioxidant activity of extracts obtained from this lichen can be ordered as water < ethanol < acetone. Amount of phenolic contents is determined as  $34.3 \pm 0.8$ ,  $49.6 \pm 0.7$  and  $63.7 \pm 1.2$  in water, ethanol and acetone extracts respectively. The relation between the amount of phenolic compound is like the antioxidant activity which is ordered as water < ethanol < acetone. On the other hand, reducing power is determined as  $0.291 \pm 0.003$ ,  $0.170 \pm 0.002$  and  $0.185 \pm 0.002$  in water, ethanol and acetone extracts respectively. These results suggest that phenolic compounds were more in the extracts which shows potent antioxidant activity. Water extract shows the most interesting results in the reducing power findings. The reducing power was determined more than the others in water extract which shows less antioxidant activity.

Finally, it is convinced that all the lichen species used in this study have antioxidant potent and all that can be tested in biologic activity studies with priority.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitki, sebze ve meyve tüketiminin pek çok hastalığın yanı sıra kanser ve kardiovasküler hastalıklara da yakalanma riskini azalttığı kaydedilmiştir<sup>1</sup>. Bu özelliğin bitki, sebze ve meyvelerde bulunan antioksidan maddelerden kaynaklandığına yaygın olarak inanılmaktadır. Antioksidan maddeler, besinlerin korunmasını artırırken depolanmış besinlerin bozulma süresini de uzatır. Bu yüzden çok sayıda antioksidan madde besin endüstrisinde kullanılmaktadır<sup>2</sup>.

Antioksidanlar “serbest radikaller” olarak isimlendirilen maddelere karşı etki gösterir. Bu maddeler bir elektrona ihtiyaç duyarlar ve bu yüzden de yüksek derecede reaktiftirler. Serbest radikaller, organizmalarda hücre membranındaki lipitler gibi önemli yapılardan ve organellerden elektron çalabilirler<sup>3,4</sup> ve böylece elektronunu kaybetmiş component serbest radikal olarak davranacak ve zincirleme bir reaksiyon başlayacaktır. Bunun devamında organizmada redoks dengesi bozulacaktır<sup>4</sup>. Kısaca, reaktif oksijen sınıfları (ROS) ve metal iyonları (örneğin, Fe<sup>+++</sup>) gibi serbest radikallerin üretimi organizmanın antioksidanları tarafından engellenmezse “oksidatif stres” olarak isimlendirilen anormal durum ortaya çıkacak. Oksidatif stresin, hastalıkların büyük bir çoğunluğu ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir<sup>5</sup>. Bu patolojik koşullarda yaygın olarak rastlanan bir mekanizma, polidoymamış yağ asitlerinin oksidasyona uğraması (lipit peroksidasyonu) dır<sup>6</sup>. İşte bu gibi patolojik durumların ortaya çıkmaması için antioksidanlar (radikal süpürücüler, redükleyici ajanlar, prooksidant metallerin potansiyel kompleksörleri, singlet oksijen söndürücüleri gibi..) devreye girer ve organizmayı korur<sup>7,8</sup>.

Antioksidan potansiyelin etkin belirlenmesinde en dikkat çekici parametrelerden birisi fenolik maddelerdir<sup>9</sup>. Fenolik maddelerin çeşide bağlı olarak antioksidan

kapasiteyi değiştirebilmesine rağmen bir ekstrenin toplam fenolik iğeriği ekstrenin antioksidan aktivitesi ile genellikle uyumluluk gösterir. Bu yüzden pek çok bitki ekstresinin antioksidan aktivitesinin ekstredeki fenolik maddelerden kaynaklandığı goruşu yaygın olarak kabul edilmektedir. Antioksidan maddeler hakkındaki diğer bir gerçekte sentetik antioksidanlar hakkındaki kuşkulara bağlı olarak doğal antioksidanların tercih edildiğidir<sup>10</sup>. Bugün insanlar ihtiyaçlarını karşılama hususunda doğal ürünleri tüketmek istemektedir. Bu yüzden doğal antioksidanlar daha çok ilgi çekmektedir.

Yüksek bitkilerdeki antioksidan maddeler hakkında gunumuzde çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen enteresan özelliklere sahip olan likenlerde araştırmalar sınırlı kalmıştır. Likenler, simbiyotik ilişki içerisinde uyumlu bir şekilde yaşayan bir fungus ve bir algden oluşur. Bu simbiyotik yaşam formu genellikle “sekonder metabolitler” olarak isimlendirilen çok sayıda madde üretir. nceki dönemlerde bu maddeler fungal ürünler olarak tariflenirdi. Fakat izleyen yıllarda likenlerin simbiyotik partnerlerinin kültür ve ayırımı yapılmaya başlandığında<sup>11,12</sup> bu maddelerin daima fungal partner tarafından uretildeğini rapor edilmiştir<sup>12-14</sup>. İlaveten bitkiler tarafından da bu maddelerin sentezlenememesi de ilginç bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır<sup>12,15</sup>.

Likenlerin ve liken metabolitlerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve kullanım alanlarının tespit edilmesine yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalardan bir kısmı; antiviral<sup>16,17</sup>, antimikrobial<sup>18-28</sup>, antifungal<sup>29</sup>, antitümöral<sup>30-34</sup>, allerjen<sup>35</sup>, bitki büyüme inhibitoru<sup>36</sup>, antiherbivor<sup>36</sup>, enzim inhibitoru<sup>37,38</sup> şeklinde sıralanabilir. Diğer yandan parfüm sanayiinde<sup>14</sup>, kozmetik krem sanayisinde<sup>39</sup> ve hava kirliliğinin belirlenmesinde<sup>40-42</sup> faydalanılan likenler pek çok ülkede de besin olarak

kullanılmaktadır<sup>12,43</sup>. Likenlerin üstün yaşam mukavemeti sentezledikleri çok özel moleküllerden ileri gelmekte<sup>12,14</sup> ve yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında liken metabolitlerinin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmektedir. Üstelik bu maddelerin genellikle sitotoksik özelliklerinin az olması, ilaç özelliklerinin araştırılmasında önemli yer tutmaktadır.

Liken ekstrelerinin ve liken metabolitlerinin antioksidan etkilerinin incelendiği araştırmalar son yıllarda artmıştır<sup>20-22,25,26,44-47</sup> ve bu çalışmalarda ekibimiz tarafından gerçekleştirilmiş çalışmalar<sup>33,48-52</sup> da önemli bir yer kaplamaktadır.

Bu araştırma; *Flavocetraria cucullata*, *Evernia divaricata*, *Physcia aipolia*, *Ramalina polymorpha* ve *Usnae filipendula* isimli likenlerden elde edilen su, etanol ve aseton ekstrelerinin antioksidan potansiyeli ve indirgeme gücünü belirlemek ve antioksidan potansiyelleri ile toplam fenolik bileşik arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere gerçekleştirilmiştir.



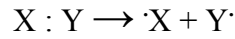
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Antioksidanlar

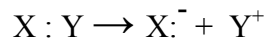
#### 2.1.1. Serbest radikaller:

Serbest radikaller orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Elektronlar atomlar içerisinde orbital olarak bilinen bölgelerde en fazla iki tane olacak şekilde ve birbirlerine zıt konumda bulunmaktadır. Demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezken bazı atom grupları (nitrit dioksit, nitrik oksit) bir orbitalinde tek elektron bulunduran dağılımları nedeni ile radikalik özellik gösterirler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dizilişlerinin yanında termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilmelidir. Serbest radikaller üç yolla meydana gelir<sup>53</sup>.

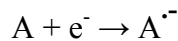
1. Hemolitik bağ parçalanması ve bir elektronun bir molekülden diğerine transfer edilmesi sonucu oluşan serbest radikallerdir. En yaygın görülen serbest radikal oluşumu hemolitik bağ parçalanmasıdır.



2. Bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik parçalanması. Heterolitik parçalanmada kovalent bağı oluşturan her iki elektronda atom veya atom gruplarının sadece birinde kalır. Bu parçalanma sonucu zıt yüklü iyonlar oluşur.



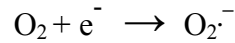
3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu oluşan serbest radikaller.



Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlamaktadır. Oksijen atomu, orbitallerindeki elektronların farklı dizilimi ile de süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna da neden olur. Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalleride yer almaktadır. Oksijenli (aerobik) solunum yapan canlılar dışardan aldıkları besin maddelerini oksijeni kullanarak enerjiye çevirirler. Dolayısıyla aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin en fazla olduğu canlı grubudur. Bu yüzden aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin etkilerine daha fazla maruz kalırlar<sup>54</sup>.

#### 2.1.1.1. Serbest radikal çeşitleri:

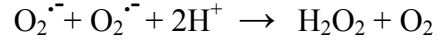
**Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>):** Oksijen molekülünün içerdiği iki serbest elektrondan bir tanesini dışarıdan bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur.



Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) hemen hemen bütün aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Süperoksit radikalinin eozinofil, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi fagositik hücreler tarafından üretilerek radikal oluşumunu artırdığı bilinmektedir<sup>54</sup>.

Süperoksit radikali nadir olarak oksidatif hasara neden olur. Çünkü süperoksit dismutaz enzimi ile hızlı bir şekilde hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çevrilir. Buna ilaveten asidik durumlarda  $H_2O_2$  ve peroksil ( $HO_2^{\cdot}$ ) radikallerini üreten spontan reaksiyona uğrar. Süperoksit radikallerinin asıl zararları hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır<sup>55</sup>.

İki süperoksit radikalinin bir araya gelmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



Süperoksit radikali ve peroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.

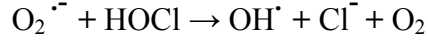


Süperoksit radikalinin nitrik oksit radikali ile birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlamaları sonucu peroksinitrit meydana gelir<sup>56</sup>.



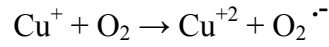
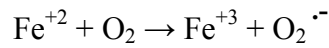
Hidroklorik asit (HOCl) oksijen metabolitleri ile reaksiyona girme özelliğine sahip olması nedeniyle ilgi uyandırmıştır. Hidroklorik asitin süperoksit radikali ile

reaksiyona girmesi sonucunda oldukça güçlü oksidan olan hidroksil (OH $\cdot$ ) radikalinin oluştuğu görülmüştür<sup>57</sup>.



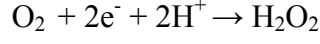
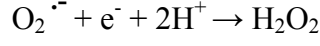
Süperoksit anyonu hem indirgeyici hem yükseltgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitler nitrobluetetrazolium ve sitokrom c'yi ise indirger. Redüktan olarak görev yaptığında ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise epinefrinin oksidayonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksite indirgenir<sup>58</sup>.

Diğer taraftan geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir.

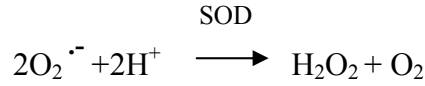


Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olup serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir<sup>59</sup>.

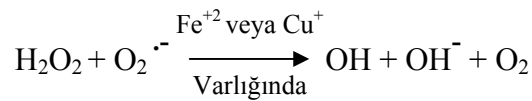
**Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** Asidik ortamda moleküler oksijenin ortamdaki iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir<sup>60</sup>.



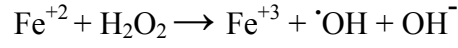
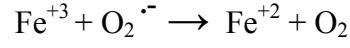
Biyolojik sistemlerdeki hidrojen peroksitin asıl kaynağı herhangi bir sistem tarafından üretilen süperoksit radikalinin dismutasyon reaksiyonudur. Ayrıca ürat oksidaz, glukoz oksidaz, ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler iki elektronunu oksijene vererek  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluştururlar.



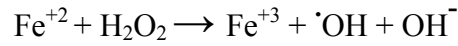
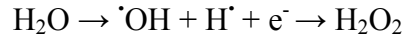
Hidrojen peroksit kendi başına çok zayıf oksidant özelliği gösterir. Çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir. Hidrojen peroksit gerektiğinde hücreler tarafından selenyum içeren glutation peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılabilir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir<sup>60</sup>.



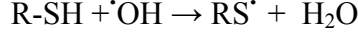
Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz olarak meydana gelebilir. Ancak katalizör olmadığı zaman çok yavaş ilerler. Bu reaksiyonda önce ferri demir ( $\text{Fe}^{+3}$ ) süperoksit tarafından ferro demir'e ( $\text{Fe}^{+2}$ ) indirgenir. Daha sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten  $\cdot\text{OH}$  ve  $\text{OH}^-$  üretilir<sup>61,62</sup>. Reaksiyonun mekanizması aşağıdaki şekildedir.



**Hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ):** Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında yani fenton reaksiyonu sonucu ve suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılması ile oluşan son derece reaktif radikaldir. Hidroksil radikali özellikle biyolojik moleküller üzerine saldırır ve oluştuğu yerde büyük hasarlara neden olan oldukça güçlü bir oksidandır<sup>63</sup>.



Hidroksil radikali birçok biyolojik molekülden hidrojen atomu koparır. Bunlardan birisi de tiollerdir.



Meydana gelen sülfür radikali oksijenle birleşerek tiyol peroksil ( $\text{RSO}_2$ ) ve sülfenil ( $\text{RSO}$ ) gibi oksisülfür radikallerini meydana getirir. Bu radikaller de biyolojik moleküllerde hasar yapıcı etkiye sahiptir.

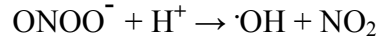
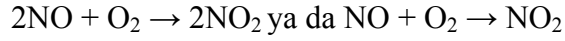
Belki de  $\text{OH}$  radikalinin en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu stimüle etmesidir. Bu durum hidroksil radikallerinin membrana yakın bir yerde üretilmesi ve membran fosfolipid zincirinin yağ asidi tabakasına saldırması ile meydana gelir. Ayrıca hidroksil radikalinin araşidonik asit gibi doymamış yağ asitlerine olan ilgisinin de fazla olduğu ileri sürülmektedir.

**Singlet Oksijen ( $^1\text{O}_2$ ):** Singlet oksijen eşleşmemiş elektron yada elektronlara sahip olmadığından dolayı bir serbest radikal değildir. Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Ancak orbitalinde içerdiği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer reaktif oksijen türleri ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen özellikle fotokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir<sup>5,64</sup>.

**Nitrik oksit ( $\text{NO}$ ) ve nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2$ ):** Nitrik oksit ve nitrojen dioksit eşleşmemiş elektronları ile birer radikaldirler. Nitrojen dioksit, nitrik oksitin oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir.  $\text{NO}_2$  oldukça zehirli ve çok güçlü bir oksidandır. Oksijen redüksiyonu sırasında  $\text{NO}_2$ 'ye maruz kalması durumunda araşidonik asit metabolizmasının  $\text{NO}_2$  konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği

görülmektedir. Düşük miktarda NO<sub>2</sub>'nin araşidonik asit metabolizmasını büyük oranda artırdığı gözlenmiştir<sup>60,65,66</sup>.

Nitrik oksit L-arjinin amino asitinden in vivo olarak üretilmektedir. NO kokusuz, renksiz ve az indirgenebilen oksidan bir gazdır. Son yıllarda radikal olan nitrik oksit üzerinde oldukça fazla durulmaya başlanmıştır. Nitrik oksit eşleşmemiş elektronları sayesinde süperoksit, tiol grupları ve nitrojen dioksit ile hızlı reaksiyonlar oluşturmaktadır. Diğer radikallerle birlikte diabetes mellitus, septik şok, kalp bozuklukları, Alzheimer hastalığı ve gastrik ülserlerin oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir<sup>60,66,67</sup>.



**Diğer Serbest Radikaller:** Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R·), peroksil radikalleri (ROO·), alkoksil radikalleri (RO·), tiyol radikalleri (RS·) gibi önemli serbest radikallerde oluşabilir. Bunlardan özellikle polidoymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol radikalleri de tekrar oksijenle reaksiyona girerek sülfenil (RSO·) veya tiyol peroksil (RSO<sub>2</sub>·) vb. gibi radikalleri oluşturabilirler<sup>68</sup>



**2.1.2. Serbest radikal kaynakları:**

Serbest radikaller organizmanın normal yaşamını sürdürmesi için gerekli olan metabolik faaliyetlerini devam ettirmesi için gerekli olan reaksiyonların sonunda oluşabildiği gibi stress ve radyasyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşabilmektedir. Bu nedenle serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır.

**Eksojen radikal kaynakları:**

- İlaç oksidasyonları
- Radyasyon
- Güneş ışığı, UV-ışınları
- Sigara dumanı, egzoz gazları
- Kükürtdioksit
- Alışkanlık yapan maddeler
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksit, pestisitler, solventler, anesteziik maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotikler.
- Stres: Stres katekolamin düzeyini artırır ve artan katekolaminlerin oksidasyonu ile serbest radikal oluşumu gözlenir<sup>5,69,70</sup>.

### Endojen radikal kaynakları:

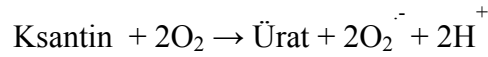
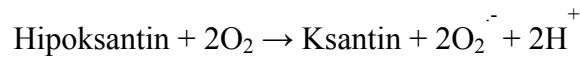
#### a. Küçük moleküllerin otooksidasyonu:

Normal ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiyopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon reaksiyonları ile serbest radikalleri oluşturur<sup>71,72</sup>.

#### b. Enzimler ve proteinler:

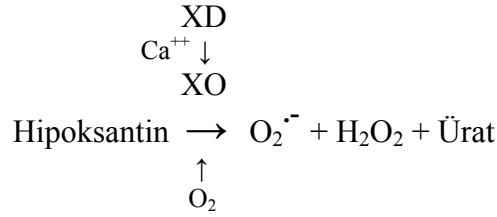
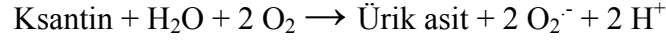
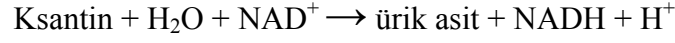
Birçok enzimin katalitik çevrimleri sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, serbest radikal oluşumuna neden olurlar<sup>5,73</sup>.

Ksantin oksidaz normalde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat, in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürata oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir<sup>5,68,74</sup>.



Hipoksantin- ksantin arasındaki bu tepkime sonucu oluşan süperoksitin yarattığı en büyük hasar vasküler sistemdedir. Fakat yapılan araştırmalar ksantin oksidaz enziminin barsak, akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda da hasara neden olduğu gözlenmiştir<sup>75,76</sup>.

Normalde NAD bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal oluşumuna neden olmaz. Ancak ilk iskemi atağından sonra hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası oluşturma eğilimine girer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması proteazların miktarı artsa bile devam eder. Bu sırada hücre ksantin dehidrogenazın (XD) ksantin oksidaz (XO)'a dönüşümüne izin verir. Bu oluşan hücre içi olayların sonunda XD enzimi dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşür ve süperoksit ( $O_2^-$ ) radikalinin üretimine neden olur. Oluşan süperoksit radikalleri hızlı bir şekilde hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit güçlü bir radikal olmasa da,  $Fe^{+2}$  varlığında fenton reaksiyonu oluşturarak güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur<sup>53,77,78</sup>.



Aldehit oksidaz yapı itibarıyla ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğunu da aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler<sup>79</sup>.

**c. Mitokondriyal elektron transferi:**

Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynaklarından biri elektron taşıma sisteminden (ETS) sızan elektronlardır. Mitokondriyal ETS'den elektron iki yerde sızmaktadır. Birincisi, nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH)-dehidrogenaz basamağında, ikinci olarak ise koenzim Q ya da ubikinon basamağında elektron sızması görülmektedir. ETS'nin son basamağında elektronların  $O_2$ 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi oksijenin %97-99'unu harcayarak suya indirger. Ancak  $O_2$ 'nin %1-3'ü elektron transport zincirinden sızan elektronlarla bir araya gelerek süperoksit radikalinin üretimini artırır. Böylece  $NAD^+$  bağlı substratlar, süksinat, adenzin di fosfat (ADP) ve oksijen gibi endojen faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretime etki eder<sup>5,68,77,80</sup>.

**d. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri:**

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve  $b_5$ , doymamış yağ asitleri ve ksénobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları ise okside ederler.

**e. Peroksizomlar:**

Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu organeldeki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar  $O_2^-$  üretmeden, bol miktarda  $H_2O_2$  üretimine sebep olurlar.

Ancak katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçtiği bilinmemektedir<sup>48,58</sup>.

**f. Plazma membranı:**

Plazma membranı serbest radikal üretimi için kritik bir yer oluşturmaktadır. Ekstraselüler olarak üretilen serbest radikaller diğer hücre komponentlerine ulaşmadan önce plazma membranını geçmesi gerekir. Bu geçiş sırasında membranda toksik reaksiyonların oluşmasına da neden olabilirler. Membranda yer alan fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler ve membran proteinleri serbest radikallerden çabuk etkilenirler. Lipid peroksidasyonu veya yapısal proteinlerin oksidasyonu sonucu membran permabilitesinde bozukluklar meydana gelmektedir<sup>5,48,81,82</sup>.

Hidrojen peroksit membranları neredeyse su kadar kolay geçebilen güçlü oksidandır. Bu nedenle proteinlerin ve lipidlerin hidrofobik kısımlarını daha iyi parçalayabileceği ve toksik etkisinin daha fazla olacağı tahmin edilmektedir. Serbest radikallerin nonfagositik hücre membranlarında NADPH-oksidad aracılığı ile üretiminin serbest radikal oluşumunun önemli bir kaynağı olarak görülmektedir<sup>5,83</sup>.

Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi plazma membranıyla bağlantılı enzimler ile mikrozoamlar tarafından serbest radikal üretimi, bu enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asit metabolizması ile ilişkili pek çok yeni buluş ve biyolojik açıdan önemli ürünlerin meydana gelmesinden dolayı ilginçtir. Bu ürünler prostaglandinleri, tromboksanları, lökotrienleri ve anafleksinin slow-reakting substratını içerir. Son zamanlarda araşidonat metabolizmasında yer alan bu enzimatik proseslerin otokatalitik lipid peroksidasyonuna öncülük etmesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır.

Serbest radikal üretimini bazı toksik maddeler artırabilir. Bu maddeler dört gruba ayrılır<sup>58,84</sup>.

- 1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.
- 2- Toksin bir serbest radikale metabolize olabilir. Örneğin toksik bir madde olan karbontetra klorür (CCl<sub>4</sub>) karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil (·CCl<sub>3</sub>) serbest radikaline dönüştürülür. Bu radikalın oksijenle reaksiyona girmesi neticesinde meydana gelen peroksil radikali güçlü lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.
- 3- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun en basit örneği paraguattır.
- 4- Toksin antioksidant aktiviteyi düşürebilir. Örneğin parasetamol karaciğerde sitokrom P-450 tarafından glutatyonla reaksiyona girerek ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

### **2.1.3. Serbest radikallerin etkileri:**

Serbest radikaller etkilerini özellikle canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip olan DNA, yağlar, proteinler ve karbonhidratlara saldırarak gösterirler. Mitokondride oksijenli solunum sonucunda meydana gelen serbest radikallerin alveolar epitel tabakada ve DNA'ya zarar vererek yapısal ve metabolik çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir<sup>5,77,85,86</sup>.

Membran lipidleri üzerine etkileri: Membranlar üzerindeki birçok bileşik ve molekülün serbest radikallerden etkilenmesine rağmen, radikallerin en belirgin etkileri yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatmaları olarak bilinir. LPO, polidoymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan

ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam eden bir çok biyolojik yapıda hasarlara neden olan reaksiyon sürecidir. LPO'nun membranlarda oluşturduğu yıkıcı etkisi genellikle reaksiyon sırasında açığa çıkan  $\cdot\text{OH}$  radikalinin membran yağ asidi zincirlerine saldırmasıyla oluşur. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür<sup>5,77,87,88</sup>.

Lipid peroksidasyonunu başlatan ilk hareket membran yada polidoymamış yağ asitlerinin içerdiği metilen grubundan ( $-\text{CH}_2-$ ) bir hidrojen (H) atomunun çıkartılmasıdır. Böylece tek elektron içeren H'nin uzaklaştırması sonucu karbon merkezli  $-\text{CH}-$  lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Bir dizi değişikliğe uğrayarak molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam ederek zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur<sup>5,60,70,77</sup>.

Lipid hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir. Ayrıca lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizörlüğünde yıkılması sonucu çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı

moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler<sup>84,89-91</sup>.

LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder<sup>60</sup>.

LPO sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar kısaca<sup>92</sup>;

- 1- Membran üzerindeki yağ asiti miktarında azalma meydana gelir.
- 2- Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan lipid hidroperoksitleri biomembranlar üzerinde yerleşmiş halde bulunan bazı enzimleri inhibe eder.
- 3- Tiyol gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerindeki protein-lipid ilişkisini bozar
- 4- Membranın yapı taşlarından olan lipitlerin akışkanlığını bozar.
- 5- Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli yapısal moleküllerde bozulmalara neden olurlar.

Proteinler üzerine etkileri: Proteinler, lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Proteinlerin radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli



radikallerden karbonillerin (PCO) ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinlerde fragmantasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal fonksiyonlarında bozukluklar ve enzim aktivitelerinde aksaklıklar meydana gelir<sup>5,77,93</sup>.

Proteinlerin çok farklı şekillerde modifikasyona uğramasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirteci yoktur. Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit miktarı, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifikdir. Bazı oksidatif protein modifikasyonları ise geniş çaplı özellik taşır ve çok sayıda amino asitte değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir. Spesifik modifikasyonlara tirozinin ditirozine dönüşümü, geniş çaplı modifikasyonlara ise arginin, lizin ve tirozin amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir<sup>94,95</sup>.

DNA üzerine etkileri: İyonize edici radyasyondan kaynaklanan hücre ölümünün başlıca nedeni olarak nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girmesi ve bu reaksiyon sonucu DNA'da mutasyona ve hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan melanoaldehit (MDA)'in nadir de olsa DNA'da mutasyona sebep olduğu, beslenme ve yaşam şekli gibi faktörlerle bir araya gelerek kanser ve genetik bazı hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir<sup>96,97</sup>.

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon

atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer ve DNA hasarına neden olurlar. Hidroksil radikali Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer<sup>98,99</sup>.

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. DNA'nın oksidatif hasarı sonucu karsinogenesisin yanısıra çeşitli hastalıklar görülebilir<sup>5,48,77,97,100,101</sup>.

#### **2.1.4. Antioksidant savunma sistemleri**

Canlılar serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranında etki gösteren birçok koruyucu mekanizmaya sahiptirler. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engellemek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. İşte canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme antioksidant savunma sistemi veya kısaca antioksidantlar denilmektedir. Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmakla beraber serbest radikal oluşumunu engelleyen ve mevcut radikalleri etkisiz hale getirenler veya enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilir.

### 2.1.4.1. Endojen (Doğal) antioksidantlar:

#### 2.1.4.1.1. Primer antioksidantlar (Enzimler):

**Süperoksit dismutaz (SOD):** Süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD'nin aktivitesi yaş artışıyla beraber artar. SOD yaklaşık olarak bütün canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu-ZnSOD, extraselular etki gösteren ECSOD ve mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden Mn-SOD izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'nin tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler<sup>102-104</sup>.



Süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bu enzim ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda insan eritrositlerinde de tesbit edilmiştir. Birçok deney sisteminde çalışılan bu enzimin ksantin-ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiği görülmüştür. Hemen hemen bütün canlılarda bulunan ve süperoksit gibi oldukça saldırgan bir radikal etkisini ortadan kaldıran SOD'nin canlılarda önemli roller üstlendiği ve yaşamsal etkiye sahip olduğu düşünülmektedir<sup>5,48,77,105,106</sup>.

Cu-Zn SOD; ilk kez 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Cu-Zn SOD, hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan enzim olup molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32000 Dalton'dur. Birbirinin aynı olan iki alt üniteden meydana gelir. Her alt ünite bir Cu atomu ve bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür

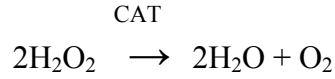
köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetilenmiş terminal amino grubu bulunduğu tesbit edilmiştir<sup>71,105</sup>.

Mn-SOD; prokaryotik hücrelerde molekül ağırlığı 40000 dalton olan, birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan enzimdir. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, ancak 80000 molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının pek çok ortak özelliği primer yapıları da birbirine çok benzerdir. Ancak aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur<sup>107</sup>.

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD (FeSOD) bulundurur<sup>108</sup>.

Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerektiği ve hatta iki enzimin bir kompleks haline getirilip fenton reaksiyonu sonucu oluşan radikallerin giderilmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir<sup>48,106,109</sup>.

**Katalaz (CAT):** Katalaz, tüm canlı hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört tane alt grup içeren ve her bir alt grubu 60000 dalton ağırlığında olan enzimdir. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizlemektir<sup>5,48,77,106,110,111</sup>.

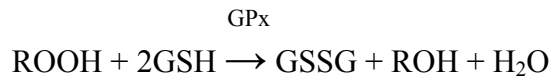
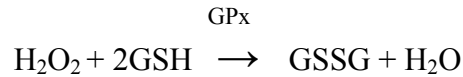


Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda lokalizedir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır<sup>58,112,113</sup>.

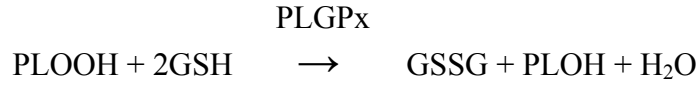
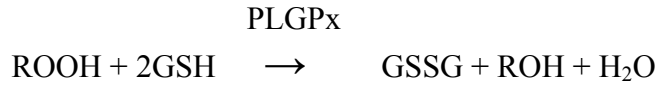
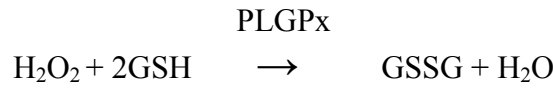
**Glutasyon peroksidaz (GPx):** Glutasyon peroksidaz enziminin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir<sup>5,48,77,114,115</sup>.

Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. GPx, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur<sup>116,117</sup>.

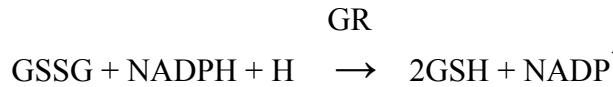
GPx, aşağıdaki reaksiyonları katalizler<sup>48,114,118</sup>.



Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPx) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidant olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGPx membranın peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar<sup>119,120</sup>.



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktazı (GR) katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutatyon (GSH)'a dönüşür.



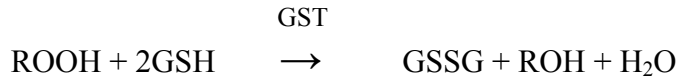
GPx'in, hücredeki dağılımı, GR'a bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur<sup>120</sup>.

**Glutatyon s-transferaz (GST):** “Selenyuma bağlı olmayan GPx” olarak adlandırılır. GST'ler, sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere glutatyonu

aktaran proteinlerdir. E.coli'den insana kadar çok çeşitli türlerden GST saflaştırılabilirken en çok da sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır<sup>121</sup>.

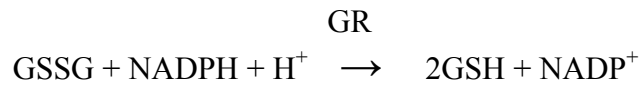
GST'ler başta araşidonik ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere LPO'lara karşı Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi koruyucu mekanizma oluştururlar<sup>122</sup>.

GST'ler antioksidant aktivitelerine ilave olarak çok önemli biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahip GST'lerin tüm canlı hücrelerde bulunması hayati önemlerinin bir göstergesidir. Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak, yabancı maddeleri glutatyonda ki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir ve daha ileri bir ürüne metabolize olabilirler. GSH'dan glutamat ve glisin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür<sup>122</sup>.



**Glutasyon redüktaz (GR):** Glutasyon redüktaz 50.000 daltonluk alt birimlere sahip bir dimerdir. Görevi yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirmektir. Bu indirgenme işlemi sırasında NADPH'dan gelen elektronlar okside glutasyonun disülfid bağına direkt olarak transfer edilemezler. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan Fenil adenin difosfat (FAD)'a transfer edilirler. Daha sonraki alt birimlerdeki 2 sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyona aktarılmış olurlar. Her bir subunit 3 tane yapısal alan içerir, bunlar: FAD bağlayıcı olan, NADPH bağlayıcı olan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı ve

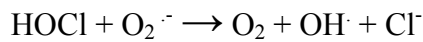
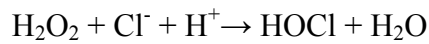
NADP<sup>+</sup> alanı birbirine benzer ve diğer dehidrojenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara benzerler. FAD ve NADP<sup>+</sup>'nin izoalloksozin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde geniş ölçüde aralarında bağlanırlar. Oksidize glutatyon için bağlayıcı alanın bir alt biriminin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği belirtmek gerekir<sup>123</sup>.



Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu ise, GR'nin GSSG'yi GSH'ye çevrimi için gereken NADPH'ı sağlar<sup>124</sup>.

**Miyeloperoksidaz (MPx):** Nötrofil granüllerde bol miktarda bulunan MPx enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den hipoklorik asit (HOCl) oluşturmak üzere etki eder. Asidik pH oluşumuna bağlı olarak MPx aktivitesi artmakta ve membranı kolayca geçen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bakteriyeye toksik etki yapmakta ya da hidrosil (OH·) radikaline dönüşmektedir. Bu tepkimede HOCl yer almaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile MPx Cl<sup>-</sup> iyonlarını HOCl'ye dönüştürmektedir. Çok reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir<sup>124</sup>.

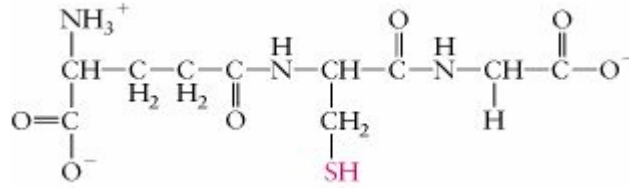
126



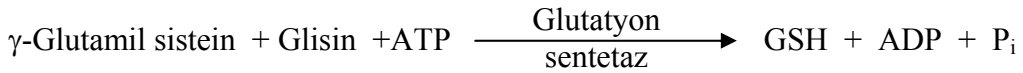
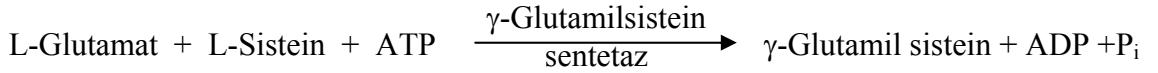


#### 2.1.4.1.2. Sekonder antioksidantlar:

**Glutasyon (GSH):** GSH, birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir. GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır.



**Şekil 1.** Glutasyon'un molekül yapısı



GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutasyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidant etki sergiler ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi alyuvarlardan uzaklaştırır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikmesi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azaltabildiğinden bu tepkime çok

önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ile süperoksit oluşurken diğer dokularda ise bu sitokrom P<sub>450</sub> redüktaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşur<sup>48,124,127,128</sup>.

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH'yi peptid bağından dolayı düşük enerjili bileşikler arasında kabul edebiliriz. GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfid-sülfidril değişimi tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan hidrojen peroksidi uzaklaştıran enzim GPx'e substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'ye indirgenerek GSH miktarı düzenlenir<sup>126,129</sup>.

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. Örneğin GPx ve CAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden askorbik asit,  $\alpha$ - tokoferol ve  $\beta$ -karoten gibi diyetle alınan antioksidantlarla ilgilidir<sup>5,48,77,130</sup>.

Birçok enzimin şayet sistein tiyol grubu (-SH) oksitlenecek olursa enzim inaktive ya da inhibe olur. GSH,  $\gamma$ -glutamilsisteinilglisin, duyarlı ve esansiyel -SH gruplarını içeren enzimlerin doğal aktivatörüdür. Glutasyon hücrede bir ko-enzimden ziyade var olan amino asit öncüllerinden kolayca sentezlenen doğal bir antioksidandır. Fenilalanin ve tirozinin oksidatif yıkımında görev alan maleilasetoasetat izomeraz da dahil olmak üzere glutasyon çok az sayıda enzim için spesifik bir koenzimdir. Glutasyonun hücre içi derişimi kontrol edilerek birçok enzimin aktivitesi düzenlenebilir<sup>129</sup>.

**Diğer sekonder antioksidantlar:** Canlı vücudunda oldukça az miktarlarda bulunmasına rağmen vitaminlerin vücuttaki görevleri oldukça fazladır. Vitaminlerin bir bölümü, besinlerle aldığımız karbonhidrat, yağ ve proteinden enerji ve hücrelerin oluşması ile ilgili biyokimyasal olayların düzenlenmesine yardımcı olurlar. A, E ve C vitaminleri vücut hücrelerinde serbest radikallerin meydana getirebileceği hasarları önleyerek hücrelerin normal işlevlerini sürdürmelerinde ve bazı zararlı maddelerin etkilerinin azaltılmasında (antioksidan etki) yardımcı olurlar. Antioksidanlar, hücremizi, serbest radikalleri nötrleştirerek korurlar. Bunlar uyum içerisinde çalışan bir takım gibi radikalik saldırılara karşı koyarlar.  $\beta$ -Karotenin, askorbik asitin ve tokoferolün(E vitamini) antioksidan etkileri yıllardan beri bilinmektedir.  $\beta$ -Karoten organizmada A vitaminin parsiyel oksijen öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidant olarak görev yapar. Bununla beraber, 15 torr'da 150 torr'dan daha iyi antioksidan olduğu, 760 torr'da ise prooksidan olarak davrandığı bildirilmiştir. Hücrelerin dışında  $\beta$ -Karoten nöbet tutarken; hücre duvarından içeri girmek isteyen saldırganlara karşı savunmayı ise eser elementlerden selenyumun da yardımıyla E vitamini üstlenmiştir<sup>5,131</sup>.

Suda çözünen vitaminlerden birisi olan askorbik asit yapı itibariyle en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Yüksek yapılı hayvanların pek çoğu ve bitkiler kolayca askorbik asidi glukozdan sentezleyebilmektedirler. Hücre içerisindeki C vitamini serbest radikallere son darbeyi vurmakta ve bu şekilde radikallerin tesirlerini ortadan kaldırmaya çalışmaktadır. E vitamini yağda çözünen bir vitamin olup temel görevi lipitleri oksidatif hasardan korumaktır. İnce barsaklardan kolayca emilir ve vücudun tüm dokularına taşınarak

hücre membranları etrafında depolanır. Böylece hücre membranında koruyucu bir tabaka oluşturmuş olur<sup>5,77,132-134</sup>.

#### **2.1.4.2. Ekzojen antioksidanlar:**

1. *Ksantin oksidaz inhibitörleri*: Tungsten, allopürinol, oksipürnol, folik asit ve pterin aldehit
2. *Soya fasulyesi inhibitörleri*: Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.
3. *NADPH oksidaz inhibitörleri*: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, cetiedil ve difenilin iyodonyum
4. *Recombinant süperoksit dismutaz*
5. *Troloks-c*: E vitamini analogu
6. *Endojen antioksidant aktiviteyi artıran maddeler*: Glutasyon peroksidaz aktivitesini artırır. Bunlar; Ebselen ve asetil sisteindir.
7. *Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları*: Mannitol ve albümin
8. *Demir redoks döngüsünün inhibitörleri*: Desferroksamin ve seruloplazmin
9. *Nötrofil adezyon inhibitörleri*
10. *Sitokinler*:
  - *Tümör Nekroz Faktör (TNF)*
  - *Interlökin 1*
11. *Barbitüratlar*
12. *Demir şelatörleri*<sup>5,135</sup>

#### **2.1.4.3. Gıda antioksidanları:**

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Etoksiguin
- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
- Propilgalat
- Sodyum benzoat
- Fe-superoksid dismutaz<sup>5,135</sup>

### 2.1.5. Antioksidan etki tipleri:

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler<sup>5,48,77,126,131,135</sup>;

- I. *Toplayıcı etki (scavenging etki)*: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya reaktif olamayan yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.
- II. *Bastırıcı etki (quencher etki)*: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen atarak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkiye bastırıcı etki denir.
- III. *Onarıcı etki (repair etki)*: Genellikle DNA'daki hasarların tamir edilmesinde bu etki sürekli geçerlidir.
- IV. *Zincir kırıcı etki (chain breaking etki)*: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir.

Serbest radikaller ve bunları etkisizleştirmek için kullanılan veya üretilen antioksidanlar hakkında mevcut bilgiler arttıkça bunlara olan ilgi de bilim adamları tarafından her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda hemen her sahada yapılan

çalışmaların antioksidan özellikler ile birlikte değerlendirme çalışmaları da ön plana çıkmaktadır.

## 2.2. Likenler

Yaklaşık 400 milyon yıl öncesinden beri var olduğu bilinen likenler, halen yaşayan en yaşlı ve en uzun ömürlü canlılar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Hypogymnia physodes gibi bazı özel türlerin en az 25 milyon yıldır bulunduğu düşünülmekte hatta bu rakamın 70 milyon yıl olabileceğine inanılmaktadır<sup>136-142</sup>. Bu üstün yaşam mukavemeti pek çok bilim adamının ilgisini çekmiş, yaşlanmanın önlenmesinde likenlerin kullanılabileceği düşünülmüştür<sup>143</sup>. Bilindiği gibi Lokman hekimin ölüme çare bulduğu rivayet edilmektedir. Bundan yola çıkarak, likenler konusunda çalışmalar yapan bazı Türk likenologları; rivayet edilen bu bitkilerin likenler olduğuna inanmaktadırlar.

Liken kelimesi ilk defa M.Ö. IV yüzyılda Yunanlı bilim adamı Theophrastus tarafından kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda liken olarak adlandırılan bitkilerin gerçekte liken olmayıp bu terimin “ciğer otları” için kullanıldığı anlaşılmıştır. Likenler önceleri bir tek bitki olarak biliniyordu. Schwender ve Trebox’un yaptığı çalışmalar sonucu likenlerin mantarlar ile alglerin birleşerek morfolojik ve fizyolojik bir bütün halinde meydana getirdikleri ortak yaşamlı (simbiyotik) bitkiler oldukları açıklanmıştır<sup>144</sup>.

Likenler tanım olarak, bir mikobiyont olarak anılan fungal ortak ile bir ya da daha fazla sayıda alg ya da siyanobakteri olabilen ve fotobiyont olarak anılan

fotosentetik ortak ile oluşan simbiyotik organizmalardır<sup>139</sup>. 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 cinsler görülür<sup>145,146</sup>.

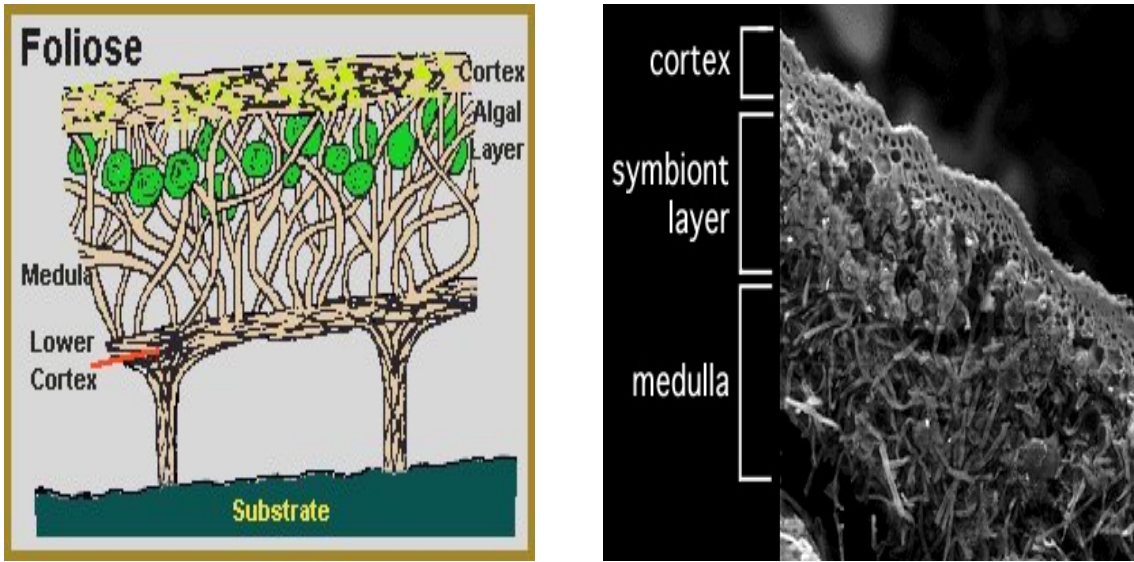
Günümüzde likenlerin ikili yapısı büyük ölçüde biliniyor olmasının yanı sıra, bazı likenlerin üç ya da daha fazla ortak içeren simbiyotik canlılar olduğu da bilinmektedir<sup>139</sup>. Alg ve mantarın birbirleri ile birleşmeleri farklı şekillerde olabilir. Eğer alg ve mantar dağılımı homojen şekildeyse bu likenler; "Homeomerik liken", heterojen bir dağılım varsa "Heteromerik liken" olarak isimlendirilirler<sup>147</sup>.

Önceleri mantarın klorofil içermemesi nedeniyle bir parazit gibi alglerden yararlandığı düşünülmesine karşın daha sonraları bu açıklama önemini yitirmiştir. Mantar ortak yaşam içinde alg'in fotosentez yapabilmesi için ortamdan su ve suda erimiş mineral maddeleri, hifleri yardımı ile tespit etmektedir<sup>144</sup>.

Likenleri oluşturan alg ve mantarlar (funguslar) arasında bazı fizyolojik iş bölümleri vardır. Funguslar, kendi karbohidratını üretemez, 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<sup>145,147</sup>. İki organizma da tek başlarına yaşayamayacakları yerlerde beraber kolonize olup yaşayabilirler<sup>139</sup> (Şekil 2).

Tallus alg hücrelerinin mantar hifleri arasına homojen ya da tabaka halinde yerleşimi ile meydana gelmektedir. Bu simbiyoz yaşam örneğinde üreme daha çok tallustan oluşan vejetatif üreme birimleri ile olmakta, eşeyli üreme sadece mantar üyelerinde görülmektedir<sup>144</sup>.



**Şekil 2.** Likenlerin simbiyont yapıları

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 1000 yıldan fazla hayatta kalabilirler. Mezar taşları ve bazı tarihi eser anıtların yaşları ile heyelan ve depremlerin meydana geliş tarihleri likenler incelenerek belirlenebilir<sup>148</sup>. 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, buldukları ekosistemin mineral döngüsünde önemli bir rol oynayabilirler<sup>136,137,139-141</sup>.

Likenler, Dünyanın hemen her yerinde yayılış gösterirler. 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<sup>139,149</sup>.

Dünya üzerindeki toprak ototrofları içerisinde likenler minyatür olarak ilginç varyasyonlar gösterirler. Renk olarak fantastik bir turuncu, sarı, kırmızı, yeşil, gri, kahverengi ve siyah, ihtişamlarını sergilemektedir. Ebat olarak 1/mm<sup>2</sup>'den, ağaç dallarında 2 m'ye kadar sarkan, uzun, asılı formlar olmak üzere değişik boyutlarda bulunabilirler. Ağaçlar ve diğer bitkiler üzerinde epifit (yalnız konum ve destek sağlamak için başka bitki üzerinde gelişen bitki) olmalarının yanı sıra, çıplak toprak ve kaya yüzeylerinde de sıkça kolonize olurlar. 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<sup>139,150</sup>.

Likenlerin sekonder ürünleri olan liken asitleri likenlere doğadaki karasal süksesyonda öncül canlılar olma özelliği kazandırmıştır<sup>144</sup>. 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<sup>15,139,147,151</sup>. Likenler doğal abiyotik şartlara (canlılardan kaynaklanmayan ortam şartlarına) çok dayanıklıdır. Ancak diğer bitkiler ile rekabete dayanamazlar<sup>139</sup>.

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<sup>145,152-154</sup>.

Diğer yandan Ülkemizde 9000'e yakın bitki türünün doğal olarak yetiştiği ve bunların kimyasal içerikleri hakkındaki çalışmaların yeterli olmadığı da vurgulanmaktadır<sup>155</sup>. 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 itibariyle değerlendirilmişlerdir<sup>150,156</sup>.

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<sup>41,145,156</sup>. 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<sup>157</sup>.

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<sup>14</sup>. 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<sup>158</sup>.

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<sup>152-154</sup>.

Son yıllardaki araştırmalar, liken metabolitleri ve onların antimikrobiyal etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırmalar sonucunda 800'ün üzerinde liken metabolitinin yapısı aydınlatılmıştır<sup>14,150,158</sup>.

İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra ilkel funguslardan elde edilen antibiyotiklerin kıtlığı, likenler üzerinde benzer araştırmaların yapılmasına yol açmıştır. Likenlerdeki bu antimikrobiyal etki, 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 saptanmıştır<sup>158,159,160,161,150</sup>. Öte yandan likenlerin tıbbi önemleri bilim adamlarının ilgisini çekmekte ve likenlerin tıbbi kullanım alanları, araştırmacıların likenler üzerinde yoğunlaşmasını sağlamaktadır.

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 ekstrelerinin 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<sup>152</sup>. *Cladonia*, *Evernia*, *Cetraria*, *Usnea*, *Alectoria*, *Ramalina* cinsleri antibiyotik özelliğe sahip asitler yönünden önemlidir. Bu maddeler gram pozitif koklara, verem basiline ve difteri etkenine karşı etkilidir<sup>149</sup>. 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<sup>150,162</sup>. 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<sup>14,150,163</sup>.

Çalışma konusu olarak seçilen liken türleri hakkındaki bilgiler aşağıda verilmiştir.

### 2.2.1. *Flavocetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt & Thell

**Sinonim:** *Flavocetraria cucullata*

Tallus 2–6 cm boyunda şerit şeklinde ve/veya çalimsı püskül şeklinde, dallar 4 mm ye kadar genişlikte düzensiz dallanmış, uç kısım küt ve çentikli üst ve alt yüzey soluk saman rengi sarıdan-sarımsı griye kadar, tabansa koyu kırmızı-menekşe tonundadır. Yüzeyi semer şeklinde çıkıntılı ve buruşuk genellikle bariz bir şekilde kanallı ve oyuklu, kenarlar kıvrık ve tüpsü yapıda, apotesyumu genellikle görülmez, ancak olanlarda 3–20 mm çapına kadar sarı kahverengi renktedir. Medulla Pd (parafenilen daimin ile muamele) -, K -, C -, KC (hem K hem de C damlatılmış) - ve UV- dir. Ülkemizde genel olarak Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak gelişmektedir<sup>164</sup>. Alaska ve Kanada’ da Eskimolar tarafından direkt yiyecek olarak kullanılmasının yanında balık ve ördek çorbalarına tat verici olarak ta kullanılmaktadır<sup>165</sup>.



**Şekil 3.** *Flavocetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt & Thell doğal ortamdan çekilmiş resim.

### 2.2.2. *Evernia divaricata* ( L. ) Ach.

**Sinonim:** *Letharia divaricata*, *Lichen divaricatus*

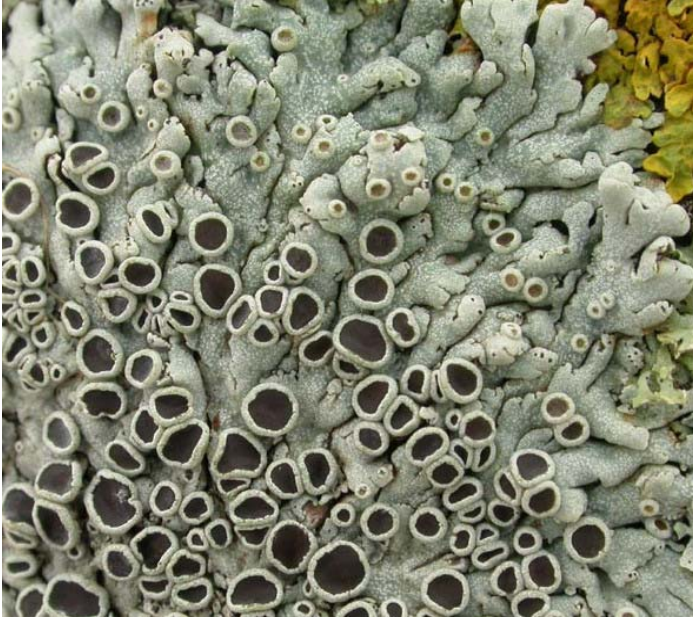
Tallus sarıdan gri yeşile kadar değişen renklerde, dar ve düzensiz seyrek dallı, yüzeyi çukurlu veya keskin kenarlı, ipliksi yapıdadır. Korteks gevşek ve kırılgan yapıda olduğu için çatlak kısımlardan beyaz renkte medulla görülür. Boreal Bölge'den Akdeniz Havzası'nın kuzeyine kadar yayılım gösterir. Soğuk, nemli ve yağışlı bölgelerde, özellikle ağaçların ince dallarının asitli kabuklarında gelişir. Ülkemizde Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır<sup>144</sup>. Bu türün metanol ekstresinin antioksidan, antimikrobial ve antiviral aktiviteye sahip olduğu Aslan ve arkadaşları ile Karagöz ve ark. tarafından tespit edilmiştir<sup>17,26</sup>.



**Şekil 4.** *Evernia divaricata* ( L. ) Ach. doğal ortamdan çekilmiş resim.

### 2.2.3. *Physcia aipolia* ( Ehrh. ex Humb. ) Frn.

Tallus beyazımsı, açık gri veya mavimsi gri renkte, üzeri beyaz noktalı ve rozet şeklindedir. Beyazdan soluk kahverengiye kadar değişen renklerdeki alt kortekste kahverengi rizinler (tutunma organı) bulunur. Medulla K + sarı renk verir. Apotesyumlar kalın bir tallus kenarı içerir. Disk koyu kahverengi veya siyah renkte, üzeri beyaz unsu yapıdadır. Yaprak döken ağaç kabukları, az kirlenmiş bölgelerdeki ağaçların gövdeleri hatta bazen kayalar üzerinde gelişir. Ilıman ve boreal bölgelerde geniş yayılış gösterir. Ülkemizde ise Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır<sup>144</sup>. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda bu türün antimikrobiyal etkili olduğu belirlenmiştir<sup>23,24</sup>.



**şekil 5.** *Physcia aipolia* ( Ehrh. ex Humb. ) Frn. doğal ortamdan çekilmiş resim.

#### 2.2.4. *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach.

Tallus 3–6 cm, dik durumlu ya da  $\pm$  yatık, dağınık öbekler halinde veya sıklıkla yoğun çimenlikler oluşturur, koyu yeşildir. Dalları yıldız şeklinde veya çeşitli şekillerde uzunlamasına yarılmıştır; sıklıkla uçlara doğru  $\pm$  sivrileşir, sıklıkla tırtıklı, eğik–bükük; yüzey pürüzlü,  $\pm$  skabrit,  $\pm$  uzunlamasına yükselteli, striat, yaygın olarak dağınık veya bitişik, tallusla aynı renkte veya da soluk, çok sayıda açıklık oluşturan psödosifeller mevcut. Granüller mevcut, 60–180  $\mu$ m çaplı, psödosifeller etrafında tek başlarına veya çoğunlukla katmanlar halinde bulunurlar, tallusla aynı renktedirler,  $\pm$  pürüzsüz, kabuklu. Apotesyumlar nadir, küçük talluslarda uçta ya da uca yakın, daha geniş örneklerde yatay ve kenarlarda,  $\pm$  sürekli olarak kupa şeklinde, nadiren konveks; tallin eksipl skabrit-siğilli. Askosporlar 12–16 x 4–6  $\mu$ m, geniş elipsoit. Medulla Pd–, K–, KC–, C–. Besince zengin kayalar üzerinde bulunur. Özellikle kuş tünneklerinin veya yuvalarının alt kısmında gelişir<sup>144</sup>. Bu türün metanol ekstresinin antioksidan, antimikrobial ve antiviral aktiviteye sahip olduğu Güllüce ve arkadaşları ile Karagöz ve ark. tarafından tespit edilmiştir<sup>17,28</sup>.



**Şekil 6.** *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach. Doğal ortamdan çekilmiş resim.



### 2.2.5. *Usnea filipendula* Aggr.

**Sinonim:** *Usnea dasypoga* (Ach.) Röhl, *U. flagellata* Mot.

Ağaçların dallarından aşağıya sarkan çalimsı bir liken türüdür. Uzunluğu 0,5 metreyi geçen pendul şeklindeki bu liken türü sarımsı yeşil veya açık yeşildir. Apotesyum bulunmaz, filamentler üzerinde seyrek şekilde izidler (parmak şeklinde çıkıntılar) bulunur. Tallus K + (yeşil) reaksiyonu verir. Tallus çok dallı, kalın dallar kısa, ince izidlidir. İzidlerin üzeri çok sayıda sored (tozsu veya unsu yapı) taşır. Ana dal kısa fibrilli, renk yeşil, grimsi yeşil, sarı, yeşilimsi sarı (kuruyunca kahverengi olur). Apotesium bazı durumlarda çok sayıda bulunabilir. Yüksek dağlarda yağışın bol olduğu serin yerlerde yaprak döken, iğne yapraklı ağaçların asitli kabuklarında görülür. Ülkemizde genel olarak Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak gelişmektedir<sup>166</sup>. Bu tür Rusya bölgesinde halk tarafından belirli kumaşların boyanmasında boya kaynağı olarak ve yaraların tedavisinde kullanılmaktadır<sup>165</sup>.



**Şekil 7.** *Usnea filipendula* Aggr.'nın doğal ortamında çekilmiş resmi.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasallar

DeneYlerde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company (Germany)' den temin edilmiştir.

#### 3.2. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal 32 R
UV-Visible Spektrofotometre	: Thermo Spectronic-HELIOS $\beta$
pH metre	: Schott CG 842
Hassas terazi	: Scaltec SPB 31
Derin dondurucu	: Sanyo MDF - 235
Magnetik karıştırıcılar	: Boeco MSH 300
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Buzdolabı	: Profilo
Saf su cihazı	: GFL 2012
Çalkalayıcı su banyosu	: Memmert
Homojenizatör	: Ika-Werke
Döner Buharlaştırıcı (Evaporatör)	: BSI
Kompresör	: Milipore
UV Lambası 254nm - 366nm	: Model Mineralight.

### 3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. 0.2 M Fosfat Tamponu (pH=7)., (Bitki ekstralarının antioksidan aktivitesini ölçmek için gereken homojenat tampon): 2,72 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  90 ml saf suda çözüldü ve pH=7.0'a ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
2. Linoleik asit çözeltisi (Bitki ekstralarının antioksidan aktivitesini ölçmek için gereken çözelti): 0.2804 g linoleik asit, 0.2804 g Tween 20 ve 45 ml homojenat tamponu karıştırıldı ve pH =7.0'a ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Amonyum tiyosiyanat çözeltisi (Bitki ekstralarının antioksidan aktivitesini ölçmek için gerekli çözelti): 4.5 g amonyum tiyosiyanat 15 ml saf suda çözüldü.
4. 0.02 M Fosfat Tamponu, pH= 6.6 (Bitki ekstralarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken homojenat tampon): 2.72 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  90 ml saf suda çözüldü ve pH=6.6'ya ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.
5. %1 Potasyum ferrisiyanit çözeltisi (Bitki ekstralarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken çözeltisi): 0.505 g potasyum ferrisiyanit 50 ml saf suda çözüldü.
6. %10 TCA çözeltisi (Bitki ekstralarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken çözeltisi): 5 g TCA 50 ml saf suda çözüldü.
7. % 0.1 Demir III klorür,  $\text{FeCl}_3$ , çözeltisi (Bitki ekstralarının indirgeme kuvvetlerini ölçmek için gereken çözeltisi):0.1 g  $\text{FeCl}_3$  100 ml saf suda çözüldü.
8. % 7.5  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi (Bitki ekstralarının toplam fenolik bileşiklerini ölçmek için gereken çözeltisi): 7.5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 ml saf suda çözüldü.
9. Folin Ciocalteu Çözeltisi (Bitki ekstralarının toplam fenolik bileşiklerini ölçmek için gereken çözeltisi): Orijinal ambalajdan hazır olarak kullanıldı.

### 3.4. Deney Bitkileri

Bu araştırma döneminde çalışma materyali olarak bölgemizde bulabileceğimiz *Evernia divaricata*, *Flavocetraria cucullata*, *Physcia aipolia*, *Ramalina polymorpha* ve *Usnea filipendula* isimli farklı liken türleri tercih edildi. Liken örnekleri, 2005-2007 yıllarının Haziran-Eylül aylarında muhtelif zaman aralıklarıyla Artvin, Erzurum, Giresun illeri ve çevresinden Dr. Ali Aslan tarafından toplandıktan sonra uluslar arası teşhis yöntemleri kullanılarak teşhis edildi<sup>154,167,168</sup>. Liken türlerinin birer herbaryum örneği Atatürk Üniversitesi-Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Herbaryumu'nda depolanmıştır.

### 3.5. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Liken örnekleri toplandıktan sonra yabancı maddelerden temizlendi ve oda sıcaklığında, gölgede kurutuldu. Kuru örnekler bir havanda sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. Her birinden 100'er g öğütülmüş liken örneği çalkalayıcı bir su banyosunda iki gün süreyle devam ettirilerek ayrı ayrı su, etanol ve aseton ile muamele edildi (50 °C, 250 ml x 4). Ekstreler süzüldü ve etanol ile aseton çözücü içeriği döner buharlaştırıcı (evaporatör) da düşük basınç ve düşük sıcaklıkta uzaklaştırıldı. Etanol ekstresi suda çözüldü ve su ekstresi ile beraber 5 µm-Hg basınç altında liyofilize edilerek su uzaklaştırıldı. Ekstrelerin % verimleri (g liyofilizat /100 g liken) tartılmak suretiyle belirlendi ve Tablo halinde aşağıda verildi (Tablo 1). Elde edilen ekstrelerin kısaltmaları Tablo 1'de ayrı bir sütun olarak belirtildi. Elde edilen ekstreler deneyler yapılncaya kadar -20 °C'ta muhafaza edildi.

**Tablo. 1.** Liken örneklerinden elde edilen ekstrelerin % verimi (100 g likenden elde edilen net ekstre miktarı)

Liken örneği	Ekstreler	Ekstrelerin kısaltılmış isimleri	% verim (g liyofilizat /100 g liken)
<i>Evernia divaricata</i>	Su	EDSE	4.79
	Etanol	EDEE	6.27
	Aseton	EDAE	6.38
<i>Flavocetraria cucullata</i>	Su	FCSE	5.28
	Etanol	FCEE	4.07
	Aseton	FCAE	3.33
<i>Physcia aipolia</i>	Su	PASE	4.34
	Etanol	PAEE	3.92
	Aseton	PAAE	2.91
<i>Ramalina polymorpha</i>	Su	RPSE	11.50
	Etanol	RPEE	5.38
	Aseton	RPAE	1.99
<i>Usnea filipendula</i>	Su	UFSE	12.15
	Etanol	UFEE	5.36
	Aseton	UFAE	6.20

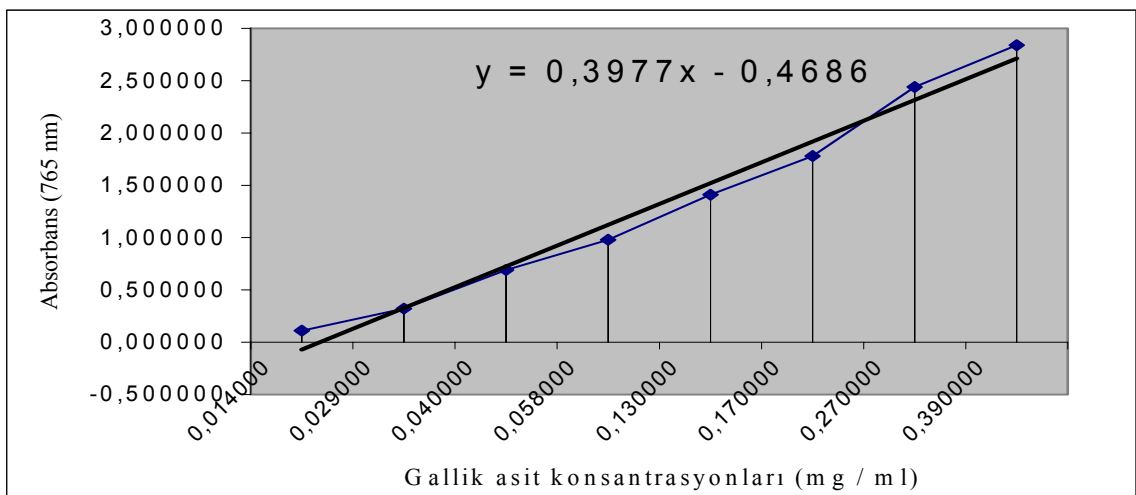
### 3.6. Bitki Ekstrelerinin Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi

Likenlerden elde edilen ekstrelerin antioksidan aktivitesi Mitsuda ve arkadaşları tarafından belirtilen prosedüre göre tiyosiyanat yöntemi kullanılarak ölçüldü<sup>169</sup>. 1 mg ekstre 1 ml saf suda çözüldükten sonra kapaklı deney tüpü içerisinde üzerine 4 ml fosfat tamponu (0.2 M, pH 7.0) ve 5 ml linoleik asit çözeltisi ilave edildi ve daha sonra 37 °C'ta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun başlatılmasını müteakip her 12 saatte bir %75 etanol ve %30 amonyum tiyosiyanat çözeltilerine 0.1 ml inkübasyon karışımı ilave edilerek vortekslendi. Karışıma %35 HCl içerisinde 0.02 M FeCl<sub>2</sub> çözeltisi ilave

edilerek absorbanslar 500 nm’de köre karşı ölçüldü. Kontrol için aynı işlemler yalnızca linoleik asitli karışımda, kör için ise 0.1 ml saf su ilave edilerek tekrarlandı. İnkübasyona kontrolün maksimum absorbansa ulaşması neticesinde son verildi. İnkübasyon karışımından her seferinde 3 tekerrür ile sonuçlar verildi.

### 3.7. Bitki Ekstrelerindeki Toplam Fenolik Bileşiklerin Miktarlarının Belirlenmesi

Liken ekstrelerindeki toplam fenolik bileşiklerin miktarları, Slinkard ve Singleton tarafından belirtilen prosedüre uygun olarak Folin-Coicalteu çözeltisi kullanılarak belirlendi<sup>170</sup>. 0,5 mg liyofilizat 0.5 ml saf suda çözüldükten sonra kapaklı deney tüpü içerisinde üzerine 2.5 ml Folin-Coicalteu çözeltisi ilave edildi ve 30 °C’ta 5 dakika inkubasyona bırakıldı. Sonra bu karışımın üzerine 2ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilerek 30 °C’ta 90 dakika süreyle yeniden inkubasyona bırakıldı. 90. dakikanın sonunda 765 nm’de absorbanslar ölçüldü. Gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafikten de yararlanılarak sonuçlar, mg Gallik Asit ekuvalenti(GAE) / g liyofilizat şeklinde verildi.



**Şekil 8.** Toplam fenolik bileşik miktarını belirlemede kullanılan gallik asit standart grafiği

### **3.8. Bitki Ekstrelerindeki İndirgeme Kuvvetinin Belirlenmesi**

Liken ekstrelerinin indirgeme güçleri Yen ve Chen tarafından belirtilen prosedüre uygun olarak ölçüldü<sup>171</sup>. 0.5 mg ekstre 0.5 ml saf suda çözüldükten sonra kapaklı deney tüpü içerisinde üzerine 2.5 ml fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 ml % 1'lik potasyum ferrisiyanür çözeltisi eklendikten sonra 50 °C'ta 30 dakika inkubasyona bırakıldı. % 10'luk TCA çözeltisinden 2.5 ml ilave edilip 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu karışımın üzerine 2.5 ml süpernatant alınarak üzerine 2.5 ml %0.1'lik FeCl<sub>3</sub> ve 2.5 ml saf su ilave edildikten sonra 700 nm'de absorbans ölçüldü. Yüksek absorbans, yüksek indirgeyici gücü temsil etmektedir.

### **3.9. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizler SPSS 12.0 software programı kullanılarak yapıldı. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri one-way variance analyzes (ANOVA) testi ile belirlendi ve  $p < 0.05$  seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulandı.

#### 4. BULGULAR

Yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz veriler, bu bölümde tablo ve şekiller ile gösterilmiştir. Antioksidan aktivite deneylerine ait veriler kontrole göre mukayese edilerek % inhibisyon olarak ifade edilmiştir. Deneysel verilere ait tablonun hemen altında deney grupları arasındaki farkın daha iyi görülmesi amacıyla, verilerin ortalamalarına göre hazırlanan grafikler sunulmuştur.

##### 4.1. *Flavocetraria cucullata*'nın antioksidan özellikleri:

*Flavocetraria cucullata*'nın su ekstresi (FCSE):

FCSE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 9'da gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller ile mukayese edilerek verilmiştir.

Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 9'da ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 2'de sunuldu. Tablo 2 ve Şekil 9'dan görülebileceği gibi FCSE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0,458 \pm 0,002$ ,  $0,226 \pm 0,003$ ,  $0,149 \pm 0,002$ ,  $0,084 \pm 0,003$  ve  $0,721 \pm 0,00$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 2'ye göre, kontrole karşılaştırıldığında FCSE'nin üç dozunun sırasıyla %69.9, %85.1, %90.2 ve pozitif kontroller, troloks ve askorbik asit'in %94.5 ve %52.6 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında FCSE'nin üç dozunda antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidant aktiviteninde arttığı hatta 5 mg/ml dozda çok güçlü bir antioksidan olan troloksa yakın bir değer aldığı söylenebilir.

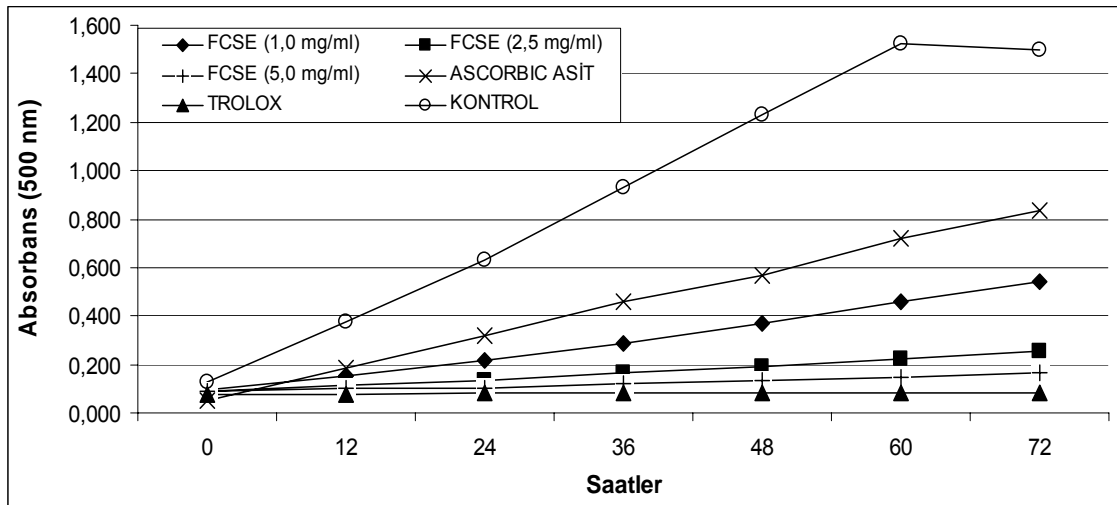


Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan FCSE'nin indirgeme gücü ise  $0.225 \pm 0.002$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstralarının antioksidan özelliklerinde genellikle içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle FCSE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $23.4 \pm 0.64$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 2). Bu sonuç bize FCSE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklandığını göstermektedir.

**Tablo 2.** Flavocetraria cucullata'nın su ekstresi (FCSE)'nin total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
FCSE	1	0.458±0.002d	69.9	0.225 ± 0.002	23.4 ± 0.64
	2.5	0.226±0.003c	85.1	—	—
	5	0.149±0.002b	90.2	—	—
C vitamini	1	0.721±0.002e	52.6	—	—
Troloks	1	0.084±0.003a	94.5	—	—
Kontrol		1.521±0.003f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 9.** Flavocetraria cucullata'nın su ekstresi (FCSE)'nin, troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Flavocetraria cucullata*'nin etanol ekstresi (FCEE):

FCEE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 10'da gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

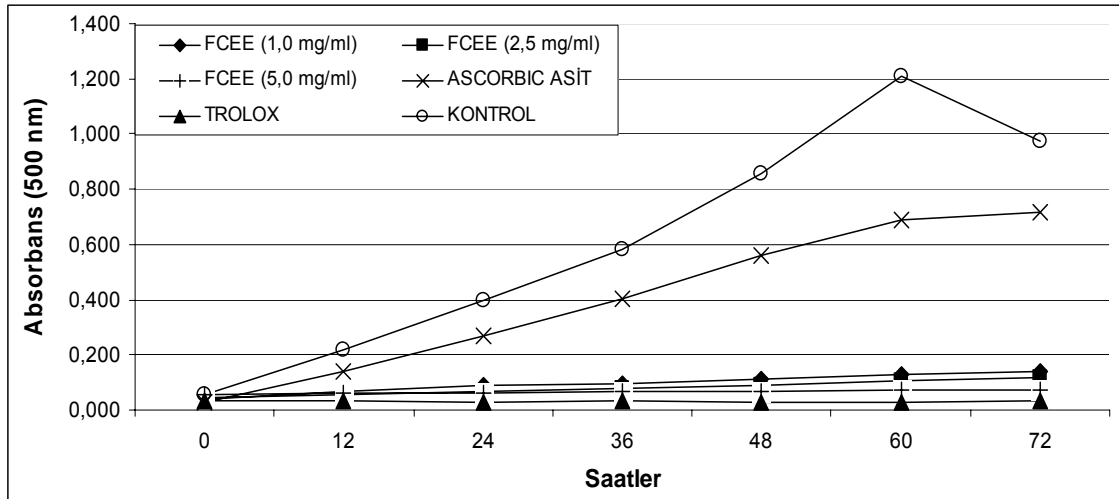
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 10'da ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 3'de sunuldu. Tablo 3 ve Şekil 10'dan görülebileceği üzere FCEE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.127 \pm 0.002$ ,  $0.107 \pm 0.001$ ,  $0.072 \pm 0.001$ ,  $0.030 \pm 0.001$  ve  $0.691 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 3'e göre, kontrolle karşılaştırıldığında FCEE'nin üç dozunun sırasıyla %89.5, %91.1, %94.0 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise %97.5 ve %42.8 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında FCEE'nin üç dozunda antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidant aktiviteninde arttığı hatta 5 mg/ml dozda çok güçlü bir antioksidan olan trolokse yakın bir antioksidan özellik göstermiştir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan FCEE'nin indirgeme gücü ise  $0.170 \pm 0.001$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstralarının genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle FCEE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $32.7 \pm 0.42$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 3). Bu sonuç bize FCEE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklandığını göstermektedir.

**Tablo 3.** *Flavocetraria cucullata*'nın etanol ekstresinin (FCEE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
FCEE	1	0.127±0.002d	89.5	0.170 ± 0.001	32.7 ± 0.42
	2.5	0.107±0.001c	91.1	—	—
	5	0.072±0.001b	94.0	—	—
C vitamini	1	0.691±0.002e	42.8	—	—
Troloks	1	0.030±0.001a	97.5	—	—
Kontrol		1.208±0.002f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 10.** *Flavocetraria cucullata*'nın etanol ekstresinin (FCEE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Flavocetraria cucullata*'nin aseton ekstresi (FCAE):

FCAE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 11'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

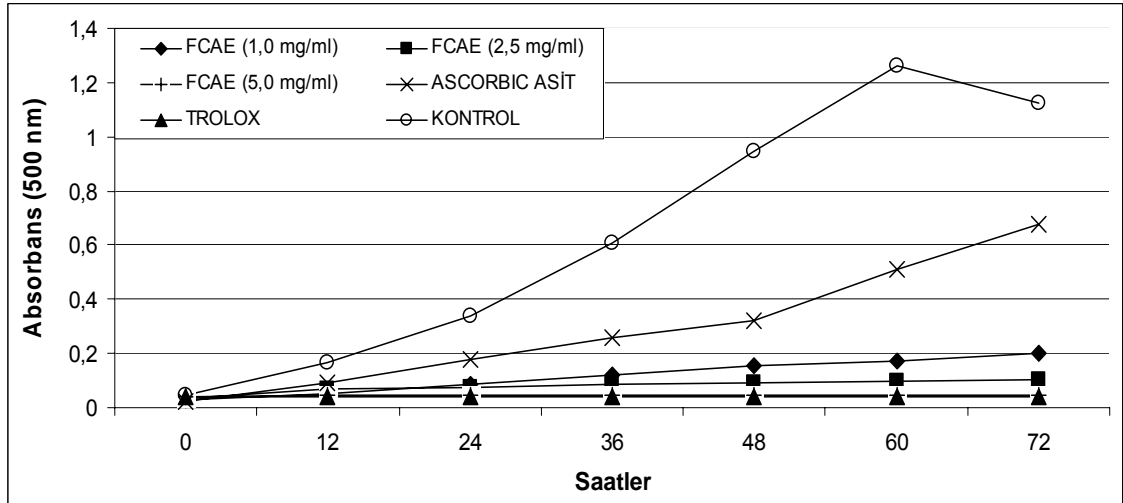
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 11'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 4'de sunuldu. Tablo 4 ve Şekil 11'ten görülebileceği gibi FCAE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.173 \pm 0.001$ ,  $0.097 \pm 0.001$ ,  $0.047 \pm 0.001$ ,  $0.040 \pm 0.001$  ve  $0.513 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 4'e göre, kontrolle karşılaştırıldığında FCAE'nin üç dozunun sırasıyla %86.3, %92.3, %96.3 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise %96.8 ve %59.5 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar bize FCAE'nin üç dozunda güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak da antioksidant aktiviteninde arttığını göstermektedir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan FCAE'nin indirgeme gücü ise  $0.116 \pm 0.002$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumlu<sup>169,171</sup> olmasından yola çıkarak FCAE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $54.5 \pm 1.3$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 4). Bu sonuç bize FCAE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklandığını göstermektedir.

**Tablo 4.** *Flavocetraria cucullata*'nın aseton ekstresinin (FCAE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
FCAE	1	0.173±0.001c	86.3	0.116 ± 0.002	54.5 ± 1.3
	2.5	0.097±0.001b	92.3	—	—
	5	0.047±0.001a	96.3	—	—
C vitamini	1	0.513±0.002d	59.5	—	—
Troloks	1	0.040±0.001a	96.8	—	—
Kontrol		1.265±0.003e	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 11.** *Flavocetraria cucullata*'nın aseton ekstresinin (FCAE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

#### 4.2. *Evernia divaricata*'nın antioksidan özellikleri:

*Evernia divaricata*'nın su ekstresi (EDSE)

EDSE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 12'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

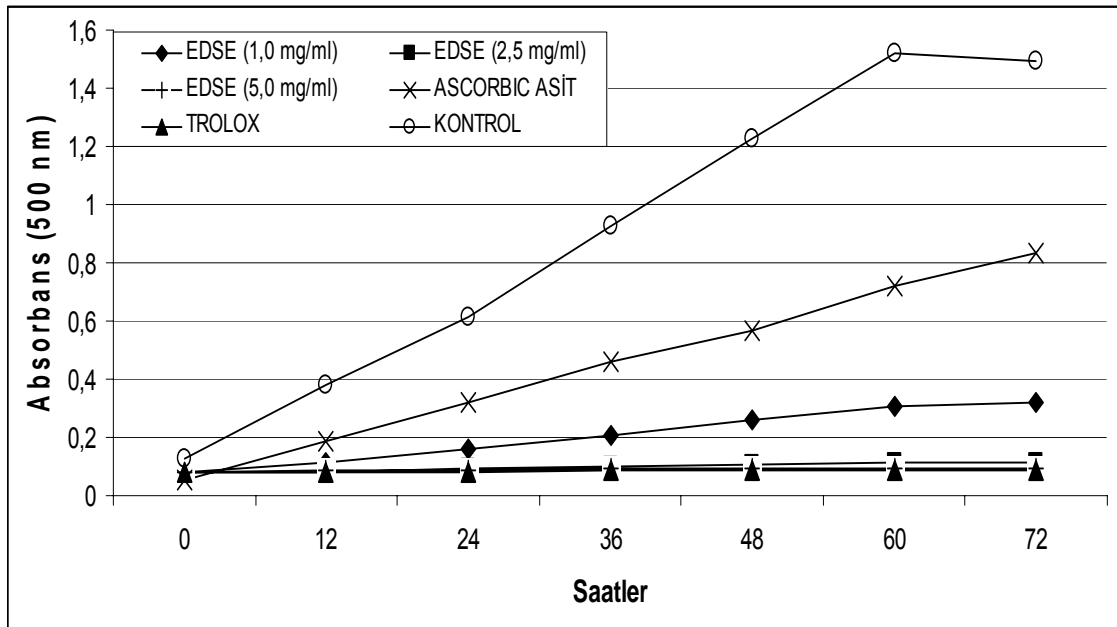
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 12'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 5'de sunuldu. Tablo 5 ve Şekil 12'den görülebileceği gibi EDSE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.309 \pm 0.001$ ,  $0.111 \pm 0.001$ ,  $0.095 \pm 0.001$ ,  $0.084 \pm 0.003$  ve  $0.721 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 5'e göre, kontrolle karşılaştırıldığında EDSE'nin üç dozunun sırasıyla %79.7, %92.7, %93.8 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise %94.5 ve %52.6 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında EDSE'nin üç dozunda antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidant aktiviteninde arttığı söylenebilir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan EDSE'nin indirgeme gücü ise  $0.291 \pm 0.003$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle EDSE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $34.3 \pm 0.8$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 5). Bu sonuç bize EDSE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

**Tablo 5.** *Evernia divaricata*'nın su ekstresinin (EDSE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
EDSE	1	0.309±0.001d	79.7	0.291 ± 0.003	34.3 ± 0.8
	2.5	0.111±0.001c	92.7	—	—
	5	0.095±0.001b	93.8	—	—
C vitamini	1	0.721±0.002e	52.6	—	—
Troloks	1	0.084±0.003a	94.5	—	—
Kontrol		1.521±0.003f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 12.** *Evernia divaricata*'nın su ekstresinin (EDSE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Evernia divaricata*'nın etanol ekstresi (EDEE):

EDEE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 13'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 13'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 6'da sunuldu. Tablo 6 ve Şekil 13'ten görülebileceği gibi EDEE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.142 \pm 0.001$ ,  $0.060 \pm 0.001$ ,  $0.026 \pm 0.001$ ,  $0.030 \pm 0.001$  ve  $0.691 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 6'ya göre, kontrolle karşılaştırıldığında EDEE'nin üç dozunun sırasıyla %88.3, %95.0, %97.9 ve pozitif kontroller, troloks ve askorbik asit'in ise sırayla %97.5 ve %42.8 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar açıkça EDEE'nin üç dozunda antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidant aktivitenin de arttığını göstermektedir.

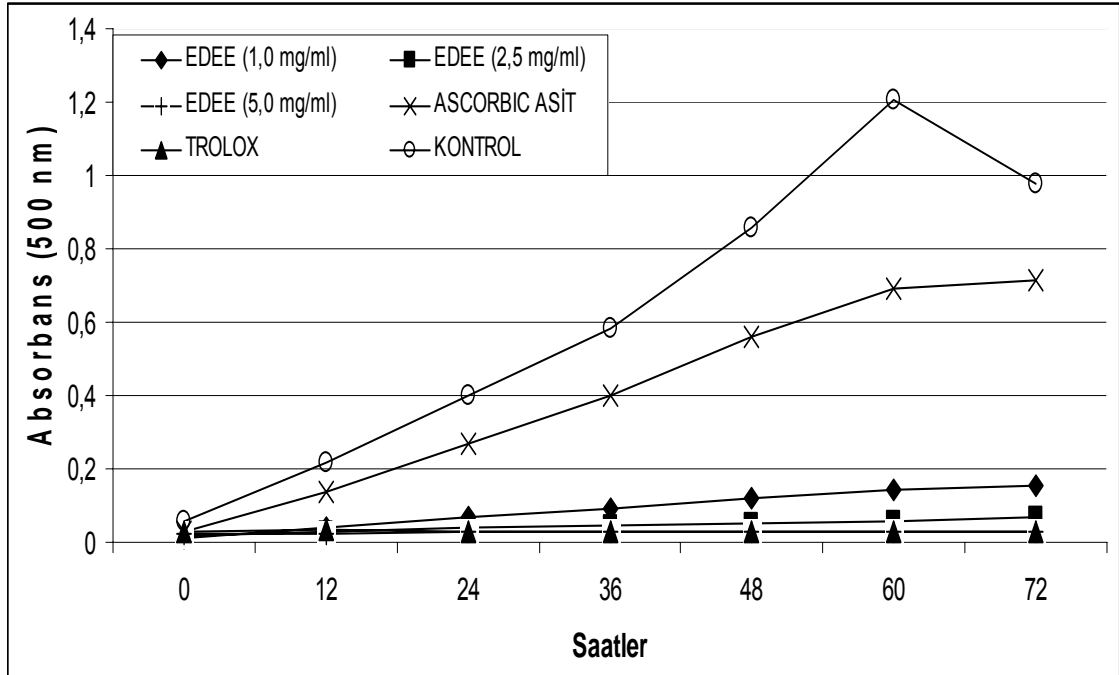
Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan EDEE'nin indirgeme gücü ise  $0.170 \pm 0.002$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstralarının genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddelerin sorumlu<sup>169,171</sup> olduğundan yola çıkılarak EDEE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $49.6 \pm 0.7$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 6). Bu sonuç bize EDEE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.



**Tablo 6.** *Evernia divaricata*'nın etanol ekstresinin (EDEE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
EDEE	1	0.142±0.001c	88.3	0.170 ± 0.002	49.6 ± 0.7
	2.5	0.060±0.001b	95.0	—	—
	5	0.026±0.001a	97.9	—	—
C vitamini	1	0.691±0.002d	42.8	—	—
Troloks	1	0.030±0.001a	97.5	—	—
Kontrol		1.208±0.002e	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farksızdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 13.** *Evernia divaricata*'nın etanol ekstresinin (EDEE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Evernia divaricata* 'nın aseton ekstresi (EDAE):

EDAE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 14'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

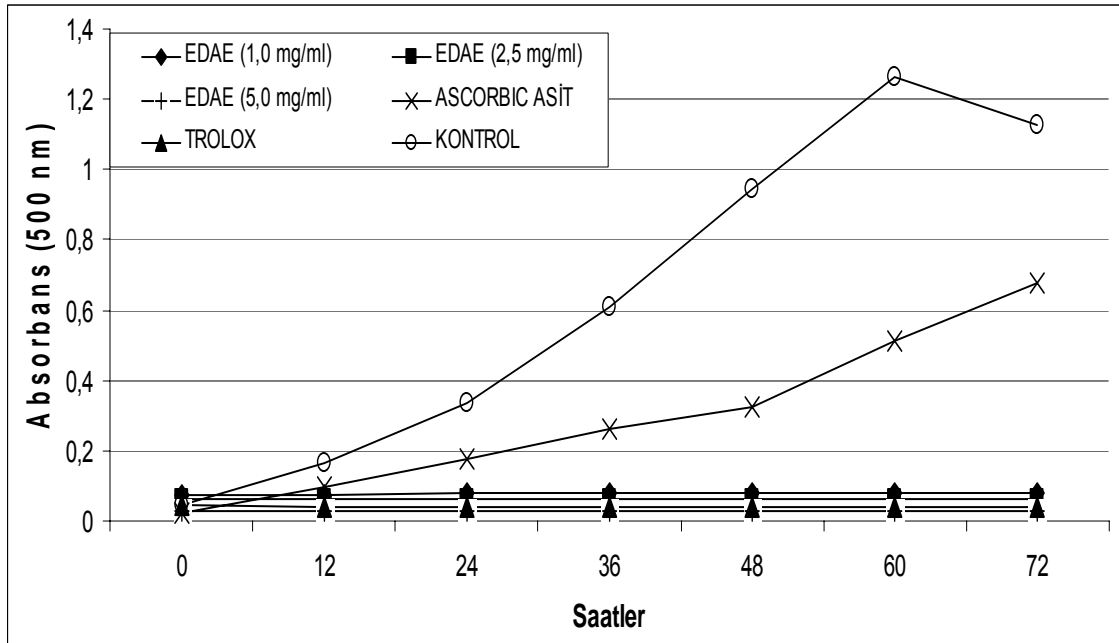
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 14'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 7'de sunuldu. Tablo 7 ve Şekil 14'ten görülebileceği gibi EDAE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.082 \pm 0.001$ ,  $0.064 \pm 0.001$ ,  $0.027 \pm 0.001$ ,  $0.040 \pm 0.001$  ve  $0.513 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 7'ye göre, negatif kontrole karşılaştırıldığında EDAE'nin üç dozunun sırasıyla %93.5, %95.0, %97.9 ve pozitif kontroller, troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %96.8 ve %59.5 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında EDAE'nin üç dozunda antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidant aktiviteninde arttığı hatta 5 mg/ml dozda çok daha güçlü bir antioksidan özellik sergilediği söylenebilir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan EDAE'nin indirgeme gücü ise  $0.185 \pm 0.002$  (ort. Abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle EDAE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $63.7 \pm 1.2$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 7). Bu sonuç bize EDAE'nin antioksidan özelliğinin de genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

**Tablo 7.** *Evernia divaricata*'nın aseton ekstresinin (EDAE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
EDAE	1	0.082±0.001d	93.5	0.185 ± 0.002	63.7 ± 1.2
	2.5	0.064±0.001c	95.0	—	—
	5	0.027±0.001a	97.9	—	—
C vitamini	1	0.513±0.002e	59.5	—	—
Troloks	1	0.040±0.001b	96.8	—	—
Kontrol		1.265±0.003f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 14.** *Evernia divaricata*'nın aseton ekstresinin (EDAE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

### 4.3. *Physcia aipolia*'nin antioksidan özellikleri:

*Physcia aipolia*'nin su ekstresi (PASE):

PASE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 8 ve Şekil 15'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

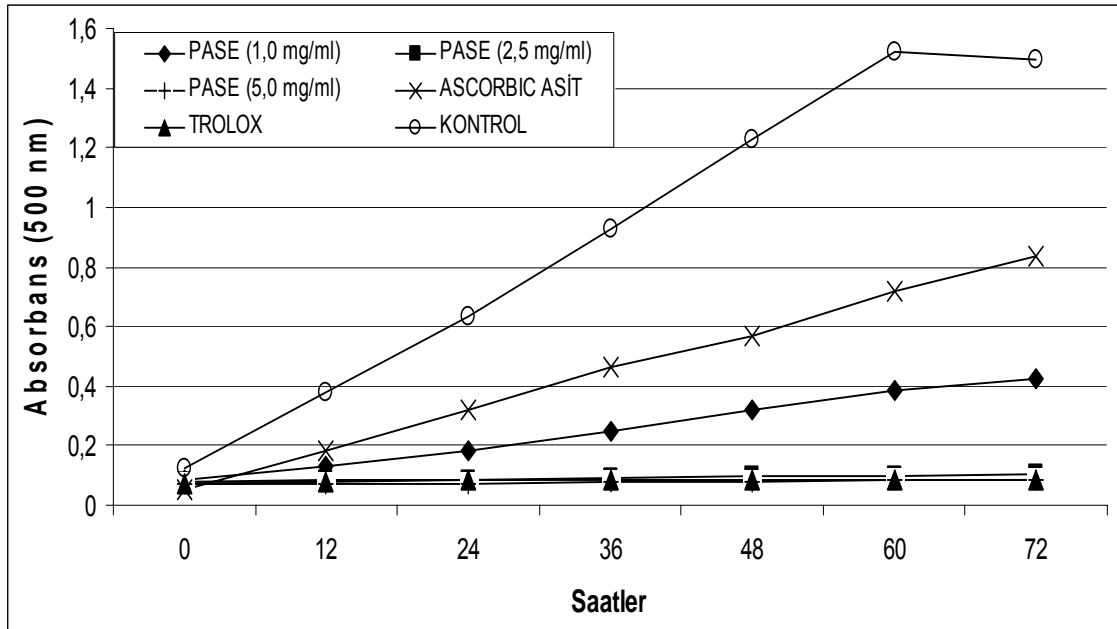
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 15'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 8'de sunuldu. Tablo 8 ve Şekil 15'ten görülebileceği gibi PASE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.384 \pm 0.002$ ,  $0.101 \pm 0.001$ ,  $0.085 \pm 0.001$ ,  $0.084 \pm 0.003$  ve  $0.721 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 8'e göre, negatif kontrolle mukayese edildiğinde PASE'nin üç dozunun sırasıyla %74.8, %93.4, %94.4 ve pozitif kontroller, troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %94.5 ve %52.6 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar bize PASE'nin üç dozunda antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidan aktivitesinde arttığını göstermektedir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan PASE'nin indirgeme gücü ise  $0.171 \pm 0.002$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu bilgiden yola çıkarak PASE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $26.4 \pm 0.2$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 8). Bu sonuç bize PASE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklandığını göstermektedir.

**Tablo 8.** *Physcia aipolia*'nın su ekstresinin (PASE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
PASE	1	0.384±0.002c	74.8	0.171 ± 0.002	26.4 ± 0.2
	2.5	0.101±0.001b	93.4	—	—
	5	0.085±0.001a	94.4	—	—
C vitamini	1	0.721±0.002d	52.6	—	—
Troloks	1	0.084±0.003a	94.5	—	—
Kontrol		1.521±0.003e	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 15.** *Physcia aipolia*'nın su ekstresinin (PASE), troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Physcia aipolia*'nın etanol ekstresi (PAEE):

PAEE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 9 ve Şekil 16'da gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

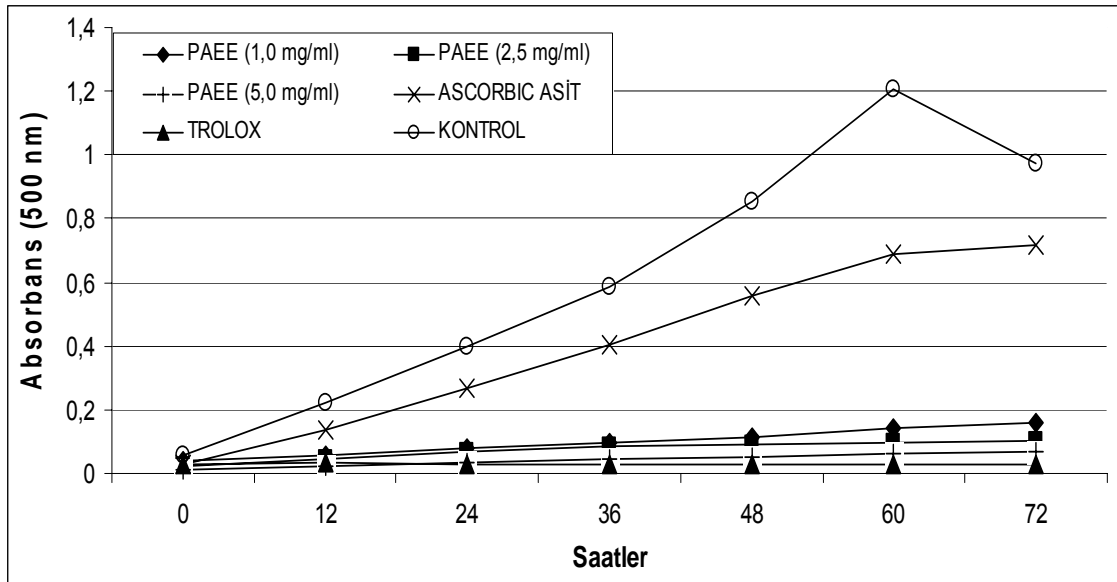
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 16'da ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 9'da sunuldu. Tablo 9 ve Şekil 16'dan görülebileceği gibi PAEE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.142 \pm 0.002$ ,  $0.097 \pm 0.001$ ,  $0.061 \pm 0.001$ ,  $0.030 \pm 0.001$  ve  $0.691 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 9'a göre, negatif kontrolle karşılaştırıldığında PAEE'nin üç dozunun sırasıyla %88.2%92.0, %95.0 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %97.5 ve %42.8 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında PAEE'nin üç dozunda antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidan aktivitesinde arttığı söylenebilir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan PAEE'nin indirgeme gücü ise  $0.202 \pm 0.001$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle PAEE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $35.9 \pm 0.5$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 9). Bu sonuç bize PAEE'nin antioksidan özelliğinin de genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

**Tablo 9.** *Physcia aipolia*'nın etanol ekstresinin (PAEE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
PAEE	1	0.142±0.002d	88.2	0.202 ± 0.001	35.9 ± 0.5
	2.5	0.097±0.001c	92.0		
	5	0.061±0.001b	95.0		
C vitamini	1	0.691±0.002e	42.8	—	—
Troloks	1	0.030±0.001a	97.5	—	—
Kontrol		1.208±0.002f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 16.** *Physcia aipolia*'nın etanol ekstresinin (PAEE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Physcia aipolia*'nın aseton ekstresi (PAAE):

PAAE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 17'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 17'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 10'da sunuldu. Tablo 10 ve Şekil 17'den görülebileceği gibi PAAE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.052 \pm 0.001$ ,  $0.046 \pm 0.001$ ,  $0.035 \pm 0.001$ ,  $0.040 \pm 0.001$  ve  $0.513 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 10'a göre, negatif kontrolle karşılaştırıldığında PAAE'nin üç dozunun sırasıyla %95.9, %96.4, %97.2 ve pozitif kontroller, troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %96.8 ve %59.5 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar bize PAAE'nin üç dozunda çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve doz artışına bağlı olarak antioksidan aktivitesinin arttığını ve hatta 2.5 mg/ml dozda troloks ile aynı oranda, 5 mg/ml dozda ise troloks'tan daha güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

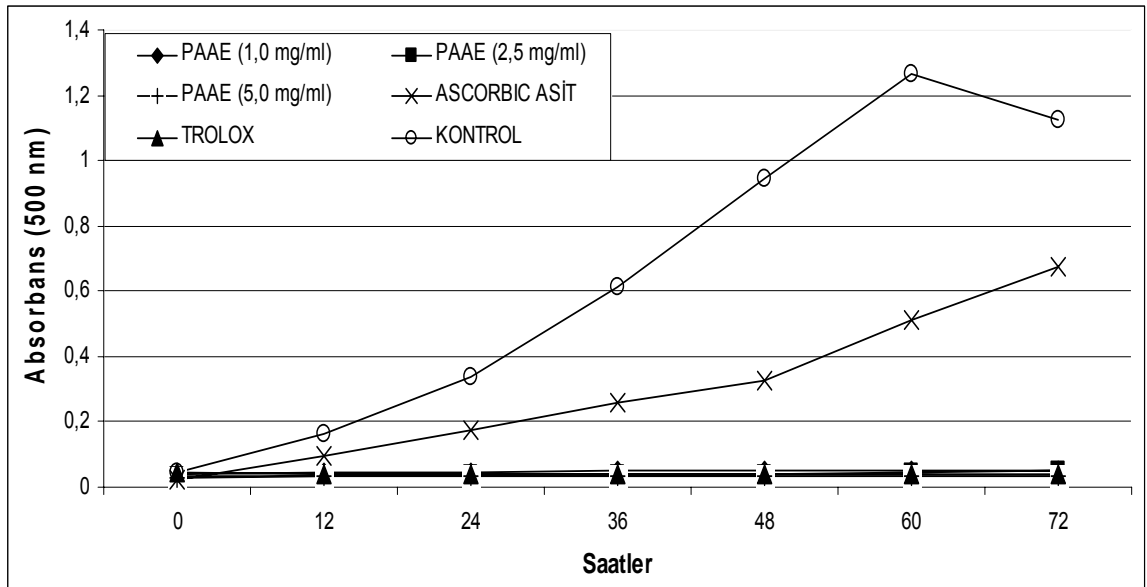
Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan PAAE'nin indirgeme gücü ise  $0.155 \pm 0.002$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstraktlarının genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle PAAE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $56.2 \pm 1.2$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 10). Bu sonuç bize PAAE'nin antioksidan özelliğinin de genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.



**Tablo 10.** *Physcia aipolia*'nın aseton ekstresinin (PAAE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
PAAE	1	0.052±0.001d	95.9	0.155 ± 0.002	56.2 ± 1.2
	2.5	0.046±0.001c	96.4	—	—
	5	0.035±0.001a	97.2	—	—
C vitamini	1	0.513±0.002e	59.5	—	—
Troloks	1	0.040±0.001b	96.8	—	—
Kontrol		1.265±0.003f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 17.** *Physcia aipolia*'nın aseton ekstresinin (PAAE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

#### 4.4. *Ramalina polymorpha*'nın antioksidan özellikleri:

*Ramalina polymorpha*'nın su ekstresi (RPSE):

RPSE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 11 ve Şekil 18'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller ile mukayese edilerek verilmiştir.

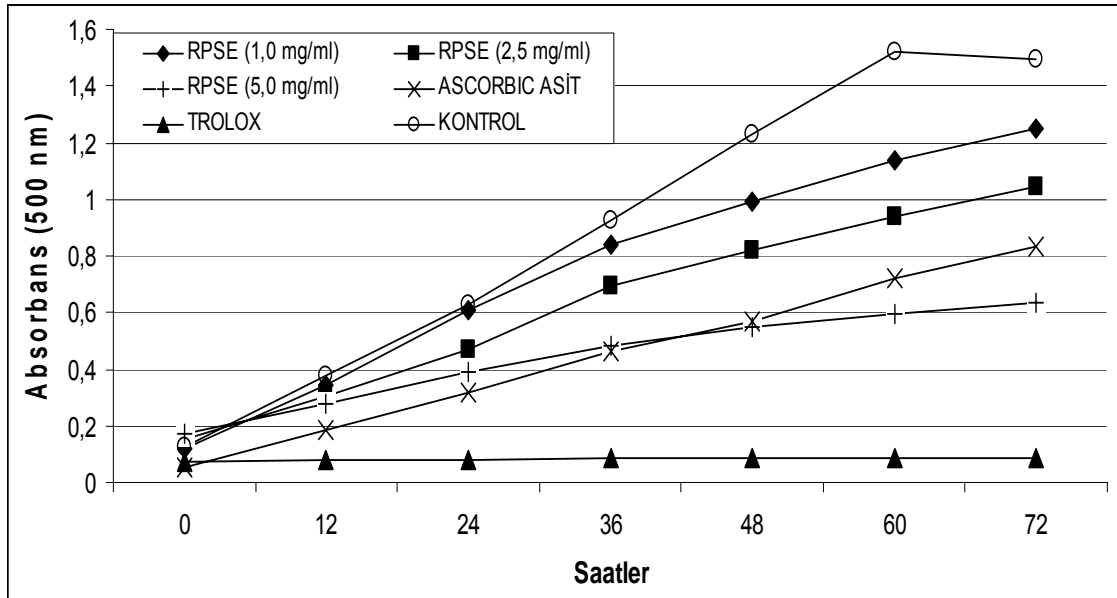
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 18'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 11'de sunuldu. Tablo 11 ve Şekil 18'den görülebileceği gibi RPSE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $1.136 \pm 0.013$ ,  $0.941 \pm 0.008$ ,  $0.593 \pm 0.008$ ,  $0.084 \pm 0.003$  ve  $0.721 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 11'e göre, negatif kontrolle karşılaştırıldığında RPSE'nin üç dozunun sırasıyla %25.3, %38.1, %61.0 ve pozitif kontroller, troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %94.5 ve %52.6 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında RPSE'nin antioksidan potansiyelinin oldukça düşük bulunduğu, yalnızca yüksek dozda (5 mg/ml ) orta düzeyde bir antioksidant özelliğine sahip olduğu söylenebilir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan RPSE'nin indirgeme gücü ise  $0.159 \pm 0.002$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddelerin sorumlu<sup>169,171</sup> olmasından yola çıkarak RPSE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $17.0 \pm 0.3$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 11). Bu sonuç bize RPSE'nin düşük antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği düşük orandaki fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

**Tablo 11.** *Ramalina polymorpha*'nın su ekstresinin (RPSE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
RPSE	1	1.136±0.013e	25.3	0.159 ± 0.002	17.0 ± 0.3
	2.5	0.941±0.008d	38.1		
	5	0.593±0.008b	61.0		
C vitamini	1	0.721±0.002c	52.6	—	—
Troloks	1	0.084±0.003a	94.5	—	—
Kontrol		1.521±0.003f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 18.** *Ramalina polymorpha*'nın su ekstresinin (RPSE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Ramalina polymorpha*'nın etanol ekstresi (RPEE):

RPEE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 12 ve Şekil 19'da gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

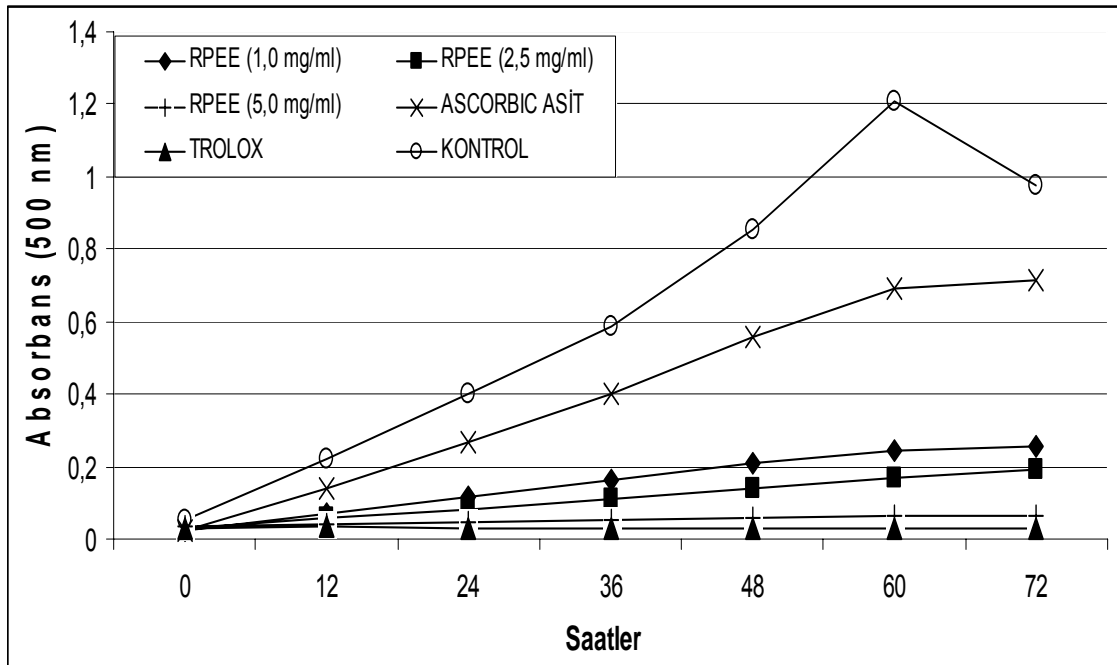
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 19'da ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 12'de sunuldu. Tablo 12 ve Şekil 19'dan görülebileceği gibi RPEE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.243 \pm 0.002$ ,  $0.166 \pm 0.002$ ,  $0.061 \pm 0.001$ ,  $0.030 \pm 0.001$  ve  $0.691 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 12'ye göre, kontrolle karşılaştırıldığında RPEE'nin üç dozunun sırasıyla %79.9, %86.3, %95.0 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %97.5 ve %42.8 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar bize RPEE'nin üç dozunda antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak bu antioksidan aktivitenin arttığını göstermektedir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan RPEE'nin indirgeme gücü ise  $0.154 \pm 0.006$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstralarının genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu bilgi ışığında RPEE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $25.6 \pm 0.2$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 12). Bu sonuç bize RPEE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklandığını göstermektedir.

**Tablo 12.** *Ramalina polymorpha*'nın etanol ekstresinin (RPEE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
RPEE	1	0.243±0.002d	79.9	0.154 ± 0.006	25.6 ± 0.2
	2.5	0.166±0.002c	86.3		
	5	0.061±0.001b	95.0		
C vitamini	1	0.691±0.002e	42.8	—	—
Troloks	1	0.030±0.001a	97.5	—	—
Kontrol		1.208±0.002f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farksızdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 19.** *Ramalina polymorpha*'nın etanol ekstresinin (RPEE) troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Ramalina polymorpha*'nın aseton ekstresi (RPAE):

RPAE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 13 ve Şekil 20'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

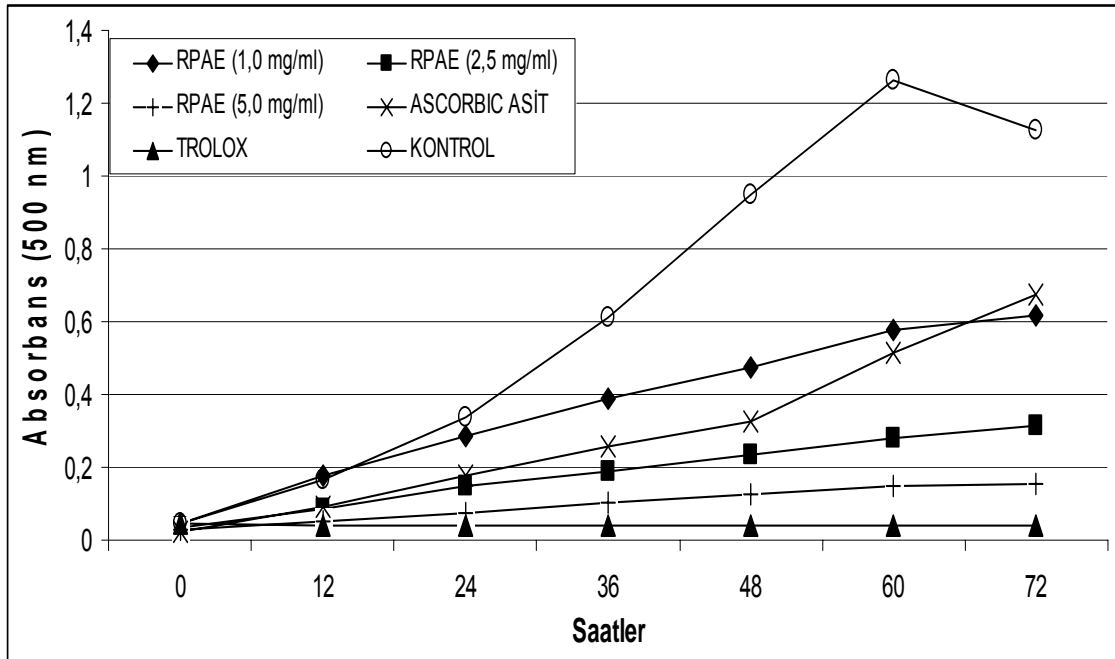
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 20'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 13'de sunuldu. Tablo 13 ve Şekil 20'den görülebileceği gibi RPAE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asit'in total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.577 \pm 0.002$ ,  $0.282 \pm 0.002$ ,  $0.147 \pm 0.001$ ,  $0.040 \pm 0.001$  ve  $0.513 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 13'e göre, negatif kontrolle karşılaştırıldığında RPAE'nin üç dozunun sırasıyla %54.4, %77.7, %88.4 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %96.8 ve %59.5 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar RPAE'nin üç dozunda antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidant aktiviteninde arttığını göstermektedir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan RPAE'nin indirgeme gücü ise  $0.122 \pm 0.002$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstralarının genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu bilgiler ışığında RPAE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $46.2 \pm 0.9$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 13). Bu sonuç bize RPAE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

**Tablo 13.** *Ramalina polymorpha*'nın aseton ekstresinin (RPAE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
RPAE	1	0.577±0.002e	54.4	0.122 ± 0.002	46.2 ± 0.9
	2.5	0.282±0.002c	77.7		
	5	0.147±0.001b	88.4		
C vitamini	1	0.513±0.002d	59.5	—	—
Troloks	1	0.040±0.001a	96.8	—	—
Kontrol		1.265±0.003f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 20.** *Ramalina polymorpha*'nın aseton ekstresinin (RPAE), troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

#### 4.5. *Usnea filipendula*'nın antioksidan özellikleri:

*Usnea filipendula*'nın su ekstresi (UFSE):

UFSE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 14 ve Şekil 21'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller ile mukayese edilerek verilmiştir.

Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 21'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 14'de sunuldu. Tablo 14 ve Şekil 21'den görülebileceği gibi UFSE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.885 \pm 0.009$ ,  $0.443 \pm 0.006$ ,  $0.254 \pm 0.004$ ,  $0.084 \pm 0.003$  ve  $0.721 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 14'e göre, kontrolle karşılaştırıldığında UFSE'nin üç dozunun sırasıyla %41.8, %70.9, %83.3 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %94.5 ve %52.6 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında UFSE'nin antioksidant potansiyelinin diğer liken ekstrelerine oranla oldukça düşük bulunduğu, yalnızca yüksek dozda (5 mg/ml) orta düzeyde bir antioksidant özelliğine sahip olduğu belirlendi.

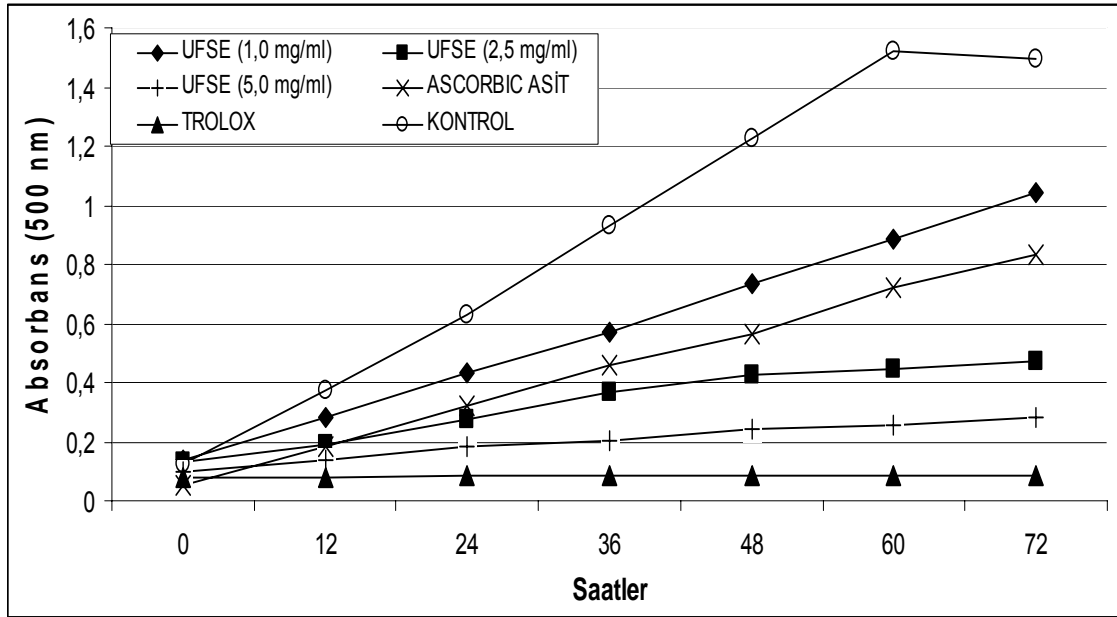
Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan UFSE'nin indirgeme gücü ise  $0.187 \pm 0.003$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle UFSE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $18.6 \pm 0.2$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 14). Bu sonuç bize UFSE'nin düşük antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği düşük orandaki fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.



**Tablo14.** *Usnea filipendula*'nın su ekstresinin (UFSE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
UFSE	1	0.885±0.009e	41.8	0.187 ± 0.003	18.6 ± 0.2
	2.5	0.443±0.006c	70.9	—	—
	5	0.254±0.004b	83.3	—	—
C vitamini	1	0.721±0.002d	52.6	—	—
Troloks	1	0.084±0.003a	94.5	—	—
Kontrol		1.521±0.003f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 21.** *Usnea filipendula*'nın su ekstresinin (UFSE), troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

*Usnea filipendula*'nın etanol ekstresi (UFEE):

UFEE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 15 ve Şekil 22'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller (troloks ve askorbik asit) ile mukayese edilerek verilmiştir.

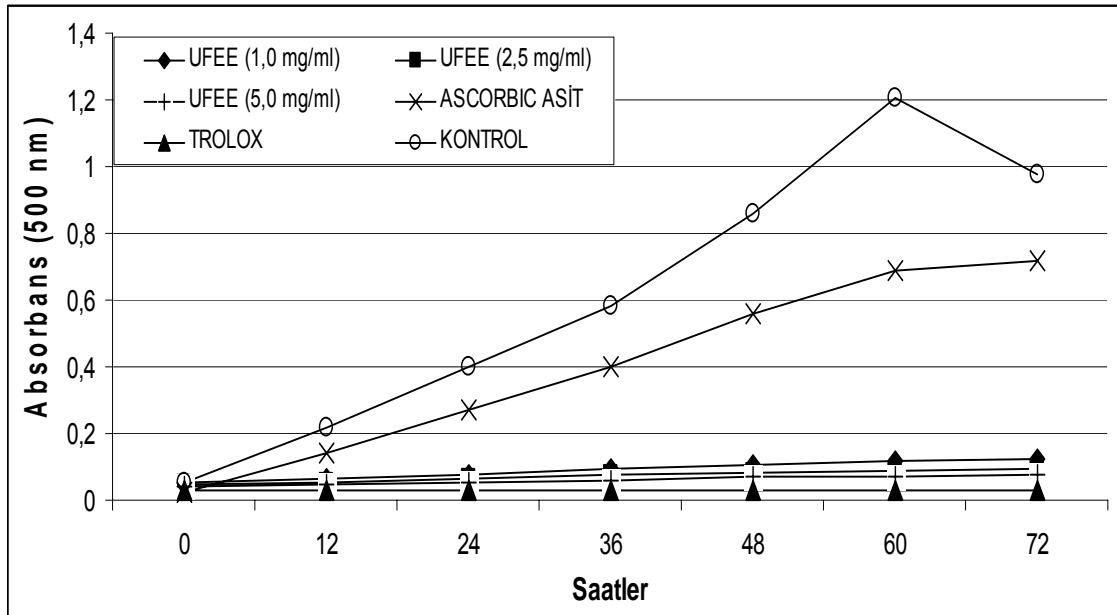
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 22'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 15'de sunuldu. Tablo 15 ve Şekil 22'den görülebileceği gibi UFEE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.118 \pm 0.001$ ,  $0.088 \pm 0.001$ ,  $0.073 \pm 0.001$ ,  $0.030 \pm 0.001$  ve  $0.691 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 15'e göre, kontrolle karşılaştırıldığında UFEE'nin üç dozunun sırasıyla %90.2, %92.7, %94.0 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %97.5 ve %42.8 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında UFEE'nin üç dozunda UFSE gibi çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidan aktiviteninde arttığı ve uygulanan en yüksek doz olan 5 mg/ml dozda ise çok güçlü bir antioksidant olan troloksa yakın bir değer aldığı söylenebilir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan UFEE'nin indirgeme gücü ise  $0.167 \pm 0.001$  (ort. abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstralarının genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle UFEE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $34.5 \pm 0.1$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 15). Bu sonuç bize UFEE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

**Tablo 15.** *Usnea filipendula*'nın etanol ekstresinin (UFEE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
UFEE	1	0.118±0.001d	90.2	0.167 ± 0.001	34.5 ± 0.1
	2.5	0.088±0.001c	92.7		
	5	0.073±0.001b	94.0		
C vitamini	1	0.691±0.002e	42.8	—	—
Troloks	1	0.030±0.001a	97.5	—	—
Kontrol		1.208±0.002f	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farksızdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 22.** *Usnea filipendula*'nın etanol ekstresinin (UFEE), troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir

*Usnea filipendula*'nın aseton ekstresi(UFAE):

UFAE'nin total antioksidan aktivitesi (TAA), toplam fenolik bileşik (TFB) miktarı ve indirgeme gücü (İG) belirlenerek sonuçlar Tablo 16 ve Şekil 23'de gösterilmiştir. TAA'ya ait sonuçlar, pozitif kontroller ile mukayese edilerek verilmiştir.

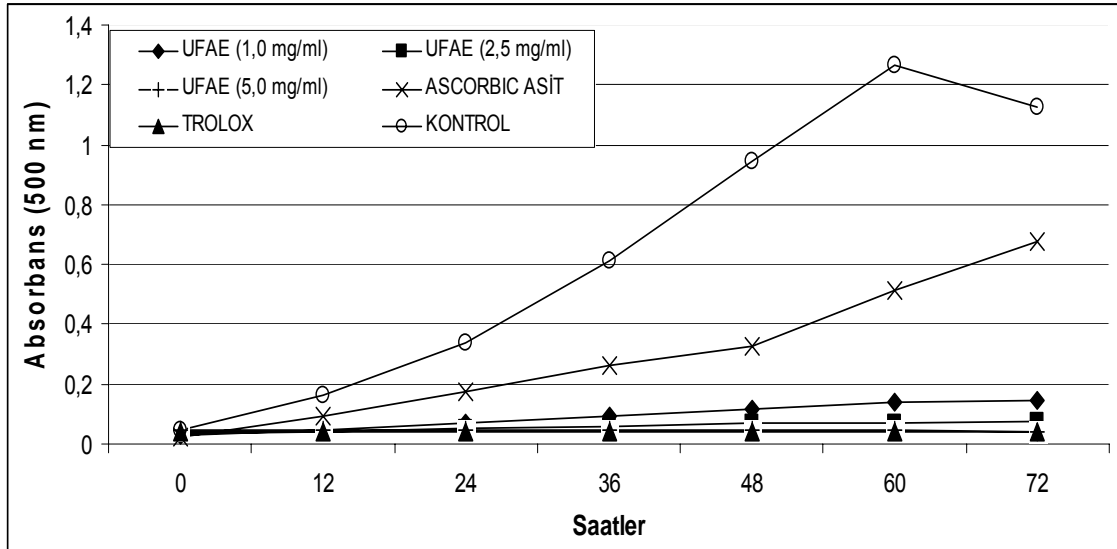
Her 12 saatte bir alınan ölçümleri içeren Şekil 23'de ki veriler esas alınarak 60. saatte en yüksek seviyeye çıkan peroksit oluşumu esnasında ölçülen TAA'lar Tablo 16'da sunuldu. Tablo 16 ve Şekil 23'ten görülebileceği gibi UFAE'nin üç dozu, troloks ve askorbik asidin total antioksidan aktivitesi sırasıyla  $0.138 \pm 0.001$ ,  $0.072 \pm 0.001$ ,  $0.045 \pm 0.001$ ,  $0.040 \pm 0.001$  ve  $0.513 \pm 0.002$  olarak tespit edilmiştir. Tablo 16'ya göre, kontrolle karşılaştırıldığında UFAE'nin üç dozunun sırasıyla %89.1, %94.3, %96.4 ve pozitif kontroller troloks ve askorbik asit'in ise sırasıyla %96.8 ve %59.5 oranında peroksit oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar bize UFAE'nin üç dozunda hem UFEE hemde UFSE gibi çok yüksek antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve doz artışına bağlı olarak antioksidant aktiviteninde arttığını göstermektedir.

Farklı bir antioksidan özellik göstergesi olan UFAE'nin indirgeme gücü ise  $0.116 \pm 0.007$  (ort. Abs.) olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstralarının genellikle antioksidan özelliğinden içerdikleri fenolik maddeler sorumludur<sup>169,171</sup>. Bu nedenle UFAE ekstresinin toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiş ve fenolik madde içeriğinin  $51.6 \pm 0.9$  GAE/g liyofilizat'a tekabül ettiği bulunmuştur (Tablo 16). Bu sonuç bize UFAE'nin antioksidan özelliğinin genellikle içerdiği yüksek fenolik madde içeriğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. UFAE'nin sahip olduğu fenolik madde miktarı aynen UFEE ve UFSE' de olduğu gibi çok yüksek bir miktar olarak ortaya çıkmakta ve bu türün her üç ekstraktında hem antioksidant aktivite yönünden hemde fenolik içerik yönünden çok yüksek olduğunu gözler önüne sermektedir.

**Tablo 16.** *Usnea filipendula*'nın aseton ekstresinin (UFAE) total antioksidan aktivitesinin, indirgeme gücünün ve fenolik bileşik miktarının karşılaştırılması.

Örnekler	Doz (mg/ml)	Total antioksidan aktivite		İndirgeme gücü Ort. Absorbans (700 nm)	Fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g liyofilizat)
		Ort. Absorbans (60. saat , 500 nm)	% İnhibisyon		
UFAE	1	0.138±0.001c	89.1	0.116 ± 0.007	51.6 ± 0.9
	2.5	0.072±0.001b	94.3		
	5	0.045±0.001a	96.4		
C vitamini	1	0.513±0.002d	59.5	—	—
Troloks	1	0.040±0.001a	96.8	—	—
Kontrol		1.265±0.003e	—	—	—

Sonuçlar, paralel üç ölçümün ortalaması ( $\pm$ standart hata) olarak verilmiştir. Aynı harfe sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ( $\alpha = 0,05$ ).



**Şekil 23.** *Usnea filipendula*'nın aseton ekstresinin (UFAE), troloks'un ve askorbik asit'in antioksidan aktiviteleri. Sonuçlar, her 12 saatte bir paralel üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bitkisel organizmalar içerisinde incelenen likenlerden antik çağlardan beri morfolojik özelliklerine dayanılarak (örneğin: akciğere benzeyen *Lobaria pulmonaria*) o organdaki hastalıkların tedavisinde yararlanılmaya çalışılmış ve tıbbi özellikleri itibariyle değerlendirilmişlerdir<sup>150,156</sup>. 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.

Likenlerde bulunan maddelerin çoğu asit özelliği gösterdiği için bunlara karakteristik olarak “liken asitleri” de denilmektedir. Likenlerin kayaları parçalama özelliğini sentezledikleri bu asitler vasıtası ile gerçekleştirdiklerine inanılmaktadır. Likenlerin bu asidik maddeleri %1–5 oranında, liken ekstrelerinin 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<sup>152</sup>. *Cladonia*, *Evernia*, *Cetraria*, *Usnea*, *Alectoria*, *Ramalina* cinsleri antibiyotik özelliğe sahip asitler yönünden önemlidir. Bu maddeler gram pozitif koklara, verem basiline ve difteri mikrobuna karşı etkilidir<sup>149</sup>. 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<sup>150,162</sup>. Likenler tarafından sentezlenen alifatik ve aromatik bileşikler ise sekonder metabolitler olup günümüze kadar 300'den fazla sekonder metabolit saflaştırılmış ve yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak karakterize edilmiştir<sup>14,150,163</sup>.

Bitki, sebze ve meyve tüketiminin pek çok hastalığın yanı sıra kanser ve kardiovasküler hastalıklara da yakalanma riskini azalttığı kaydedilmiştir<sup>1</sup>. Bu özelliğin bitki, sebze ve meyvelerde bulunan antioksidan maddelerden kaynaklandığına inanılmaktadır. Antioksidan maddeler besinlerin korunmasını artırırken depolanmış besinlerin bozulma süresini de uzatır. Bu yüzden çok sayıda antioksidan madde besin endüstrisinde kullanılmaktadır<sup>2</sup>.

Antioksidanlar “serbest radikaller” olarak isimlendirilen maddelere karşı etki gösterir. Bu maddeler bir elektrona ihtiyaç duyarlar ve bu yüzden de yüksek derecede reaktiftirler. Onlar organizmalarda hücre membranındaki lipitler gibi kritik yapılardan ve organellerden elektron çalabilirler<sup>3,4</sup> ve böylece elektronunu kaybetmiş bileşen serbest radikal olarak davranacak ve zincirleme bir reaksiyon başlayacaktır. Bunun devamında organizmada redoks dengesi bozulacaktır<sup>4</sup>. Kısaca, reaktif oksijen türleri ve metal iyonları (örneğin, Fe<sup>+++</sup>) gibi serbest radikallerin üretimi organizmanın antioksidanları tarafından engellenmezse “oksidatif stres” olarak isimlendirilen anormal durum ortaya çıkacaktır. Oksidatif stresin hastalıkların büyük bir çoğunluğu ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir<sup>5</sup>. Bu patolojik koşullarda yaygın olarak rastlanan bir mekanizma, polidoymamış yağ asitlerinin oksidasyona uğraması (lipit peroksidasyonu) dir<sup>6</sup>. İşte bu gibi patolojik durumların ortaya çıkmaması için antioksidanlar (radikal süpürücüler, redükleyici ajanlar, prooksidant metallerin potansiyel kompleksörleri, singlet oksijen söndürücüler gibi..) devreye girer ve organizmayı korur<sup>7,8</sup>.

Antioksidan potansiyelin etkin belirlenmesinde en dikkat çekici parametrelerden birisi fenolik maddelerdir<sup>9</sup>. Fenolik maddelerin çeşide bağlı olarak antioksidan kapasiteyi değiştirebilmesine rağmen bir ekstraktın toplam fenolik içeriği ekstraktın antioksidan aktivitesi ile genellikle uyumluluk gösterir. Bu yüzden pek çok bitki

ekstraktının antioksidan aktivitesinin ekstrakta bulunan fenolik maddelerden kaynaklandığı görüşü yaygın olarak kabul edilmiştir. Antioksidan maddeler hakkındaki diğer bir gerçekte sentetik antioksidanlar hakkındaki kuşkulara bağlı olarak doğal antioksidanların tercih edildiğidir<sup>10</sup>. Bugün insanlar ihtiyaçlarını karşılama hususunda doğal ürünleri tüketmek istemektedir. Bu yüzden bitkilerde bulunan antioksidanlar (doğal antioksidanlar) çok ilgi çekmektedir.

Literatürde liken ekstrelerinin ve liken metabolitlerinin antioksidan etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda araştırmaya rastlanmıştır<sup>20-26,44-47</sup> ve mevcut araştırmalar içinde bizim araştırma ekibimiz tarafından gerçekleştirilmiş çalışmalar<sup>33,48-52</sup> da önemli bir yer kaplamaktadır.

Bu araştırmada ülkemizde yayılış gösteren likenlerden *Evernia divaricata*, *Flavocetraria cucullata*, *Physcia aipolia*, *Ramalina polymorpha* ve *Usnea filipendula* isimli türler antioksidan aktivite, fenolik bileşik miktarları ve indirgeme yetenekleri yönünden araştırıldı. Liken örneklerinin her bir türü için su, etanol ve aseton ekstreleri literatüre uygun yöntemler kullanılarak elde edildi ve her ekstre ayrı ayrı deneylere alınarak değerlendirildi.

Araştırmamızda *Evernia divaricata*'nın her üç ekstresinde güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu belirlendi. Doza bağlı olarak sırasıyla su ekstresi %79.7, 92.7 ve 93.8; etanol ekstresi %88.3, 95.0 ve 97.0; aseton ekstresi 93.5, 95.5 ve 97.9 oranında lipid peroksidasyonunu engelledi (Tablo 5, 6, 7 ve Şekil 12, 13, 14). Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere bu tür yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahiptir ve bu likenden elde edilen ekstreler içerisinde antioksidan aktivite su<etanol<aseton şeklinde sıralanabilir. Fenolik bileşik miktarları su, etanol ve aseton ekstrelerinde sırası ile  $34.3 \pm 0.8$ ,  $49.6 \pm 0.7$  ve  $63.7 \pm 1.2$  olarak tespit edildi (Tablo 5, 6 ve 7). Fenolik bileşik



miktarları arasındaki ilişkide antioksidan aktivitede olduğu gibi su<etanol<aseton ekstreleri şeklinde sıralanmaktadır. Diğer yandan indirgeme gücü su, etanol ve aseton ekstreleri için sırasıyla  $0.291 \pm 0.003$ ,  $0.170 \pm 0.002$  ve  $0.185 \pm 0.002$  olarak belirlenmiştir (Tablo 5, 6 ve 7).

Bu sonuçlar bize antioksidan aktivitenin çok olduğu ekstrelerde fenolik bileşiklerin miktarında daha fazla olduğunu göstermektedir. İndirgeme gücü ile ilgili bulgularımız içerisinde en dikkat çekici olanı da, su ekstresindeki sonuçlarda görülebilir. Nispeten daha düşük antioksidan aktivitenin tespit edildiği su ekstresinde belirlenen indirgeme gücü diğer ekstrelerden daha yüksek bulunmuştur.

*Evernia divaricata* ( L. ) Ach., soğuk, nemli ve yağışlı bölgelerde, özellikle ağaçların ince dallarının asitli kabuklarında gelişen bir liken türüdür. Ülkemizde Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır<sup>144</sup>. Literatürlerde *E. divaricata*'dan usnik asit ve divaricatic asit isimli iki molekül bildirilmiştir<sup>163,172</sup>. Bu likenin içerdiği moleküller hakkında ne yazıkki fazla bilgiye sahip değiliz. Bu yüzden literatürdeki bu boşluğun doldurulması gerektiğini düşünüyoruz. Diğer yandan bu likenin biyolojik aktiviteleri konusundada literatürde çok sınırlı bilgiye ulaşıldı. Bu türün metanol ekstresinin antioksidan, antimikrobial ve antiviral aktiviteye sahip olduğu Aslan ve arkadaşları ile Karagöz ve ark. tarafından tespit edilmiştir<sup>17,26</sup>. Bulgularımız bu araştırmacıların bulguları vasıtasıyla desteklenmektedir.

Araştırmamızda *Flavocetraria cucullata*'nın her üç ekstresi içinde oldukça yüksek antioksidan aktivite gözlemlendi. Doza bağlı olarak sırasıyla su ekstresi %69.9, 85.1 ve 90.2; etanol ekstresi %89.5, 91.1 ve 94.0; aseton ekstresi 86.3, 92.3 ve 96.3 oranında antioksidan etki gösterdi (Tablo 2, 3, 4 ve Şekil 9, 10 ve 11). Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere bu türde *E. divaricata* gibi yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye

sahiptir ve bu likenden elde edilen ekstreler içerisinde de en yüksek antioksidan aktivite su<etanol>aseton şeklindedir. Fenolik bileşik miktarları su, etanol ve aseton ekstreleri için sırası ile  $23.4 \pm 0.64$ ,  $32.7 \pm 0.42$  ve  $54.5 \pm 1.3$  olarak tespit edilmiştir (Tablo 2, 3 ve 4). Bu sonuçlar bize fenolik bileşik miktarları arasındaki oran ile gözlenen antioksidan aktivite arasında güçlü bir korelasyonun olduğunu göstermektedir. Diğer yandan indirgeme gücü su, etanol ve aseton ekstreleri için sırasıyla  $0.225 \pm 0.002$ ,  $0.170 \pm 0.001$  ve  $0.116 \pm 0.002$  olarak belirlenmiştir (Tablo 2, 3 ve 4).

Bu sonuçlara göre antioksidan aktivitenin çok olduğu ekstrelerde fenolik bileşiklerin miktarıda daha fazla tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bu türün antioksidan özelliğinin fenolik maddelerden ileri geldiğini açıkça göstermektedir. İndirgeme gücü ile ilgili bulgularımız dikkate alındığında ekstreler arasında antioksidan aktivite ve fenolik miktarlarının yüksek olduğu yerde indirgeme gücünün daha düşük bulunmuş olması oldukça ilginçtir. En yüksek indirgeme gücü su>etanol>aseton şeklinde sıralanmaktadır. Nispeten daha düşük antioksidan aktivitenin tespit edildiği *F. cucullata*'nın su ekstresinde belirlenen indirgeme gücü diğer ekstrelerden daha yüksek bulunmuştur.

*Flavocetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt & Thell, Ülkemizde genel olarak Doğu Karadeniz bölgesinde yayılış göstermektedir<sup>164</sup>. Literatürlerde *F. cucullata*'dan usnik asit, protolikesterinik asit, friedelin, B12 ve C vitaminlerinin mevcut olduğu bildirilmiştir<sup>163,172</sup>. Bu bileşenlerden C vitamininin antioksidan bir vitamin olduğu bildirilmiştir<sup>5</sup>. Bu likenin ekstrelerinde gözlenen antioksidan aktivitenin bir bölümü bu molekülden ileri geliyor olabilir. Bu likenin içerdiği moleküller hakkında ne yazık ki fazla bilgiye sahip değiliz. Bu yüzden literatürdeki bu boşluğun doldurulması gerektiğini düşünüyoruz. Diğer yandan bu likenin biyolojik aktiviteleri konusunda da

literatürde herhangi bir bilgiye ulaşılamadı. Bu liken hakkında yalnız tek kayıt mevcut olup, bu kayıttta *F. cucullata*'nın Alaska ve Kanada' da Eskimolar tarafından direkt yiyecek olarak kullanıldığı, balık ve ördek çorbalarına tat verici olarak katıldığı kaydedilmiştir<sup>165</sup>. Mevcut araştırmadan elde edilen bulgular literatürde yer alan en son çalışmaları teşkil edecek ve bu likenin sahip olduğunu bildirdiğimiz antioksidan aktivite özelliği dikkate alınarak pek çok çalışmalar başlatılacaktır diye düşünüyoruz.

Araştırmamızda *Physcia aipolia*'nın her üç ekstresi de peroksit oluşumunu önemli oranda engelledi. Doza bağlı olarak sırasıyla su ekstresi %74.8, 93.4 ve 94.4; etanol ekstresi %88.2, 92.0 ve 95.0; aseton ekstresi %95.9, 96.4 ve 97.2 oranında antioksidan aktivite gösterdi (Tablo 8, 9, 10 ve Şekil 15, 16, 17). Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere bu türde *E. divaricata* ve *F. cucullata* gibi yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olup bu likenden elde edilen ekstrelerin antioksidan aktivite sıralaması su<etanol<aseton şeklindedir. Üstelik *P. aipolia*'nın her üç ekstresinin de çok yüksek antioksidan etkiye sahip olan ve bizimde deneylerimizde pozitif standart olarak kullandığımız bir molekül olan troloks'tan daha etkili veya ona yakın düzeyde bir antioksidan etki gösterdiği belirlendi.

*P. aipolia*'nın su, etanol ve aseton ekstrelerinin fenolik bileşik miktarları sırası ile  $26.4 \pm 0.2$ ,  $35.9 \pm 0.5$  ve  $56.2 \pm 1.2$  olarak tespit edilmiştir (Tablo 8, 9 ve 10). Fenolik bileşik miktarları arasındaki oran ile antioksidan aktivite arasındaki oran aynıdır ve antioksidan aktivite ile fenolik içerik arasında çok güçlü bir korelasyon vardır. Bu sonuçlar ekstrelerin antioksidan etkisinin içerdiği fenolik maddelerden ileri geldiğini göstermektedir. Diğer yandan indirgeme gücü su, etanol ve aseton ekstreleri için sırasıyla  $0.171 \pm 0.002$ ,  $0.202 \pm 0.001$  ve  $0.155 \pm 0.002$  olarak belirlenmiştir (Tablo 8, 9 ve 10).

İndirgeme gücü ile ilgili bulgularımız dikkate alındığında ekstreler arasında antioksidan aktivite ve fenolik miktarlarının yüksek olduğu yerde indirgeme gücünün daha düşük bulunmuş olmasıda diğer liken türlerinden elde edilen bulgularımızla aynı paralellikte olup oldukça ilginçtir. En yüksek indirgeme gücü etanol>su>aseton şeklindedir. Nispeten daha düşük antioksidan aktivitenin tespit edildiği *P. aipolia*'nın etanol ekstresinde belirlenen indirgeme gücü diğer ekstrelerden daha yüksek bulunmuştur.

*Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb. ) Fűrnr., Ülkemizde Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetişmektedir<sup>144</sup>. Bu liken türünün içerdiği moleküllerin neler olduğu konusunda literatürlerde büyük boşluk olup, yalnızca atranorin isimli bir metabolit kaydedilmiştir<sup>163</sup>. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda bu türün su ekstraktlarının bazı bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir<sup>23,24</sup>. Bu liken türünün su, etanol ve aseton ekstrelerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğuna dair bizim bulgularımız literatürlerde ilk defa yer alacak olup, bu türle ilgili ileri ki zamanlarda yapılacak olan biyolojik aktivite çalışmalarında geniş ölçüde değerlendirilebilme olanakları sağlayacaktır. Zira bizim araştırma ekibimizin ileride yapacağı anti-enflamatuar ve anti-ülserojenik etkili ekstre ve moleküllerle ilgili çalışmalarda da bu liken öncelikli olarak araştırılacak türler arasına alınmıştır.

Araştırmamızda *Ramalina polymorpha*'nın su ekstresinde *F. cucullata*, *E. divaricata* ve *P. aipolia*'nın aksine daha düşük antioksidan aktivite belirlendi. *R. polymorpha*'nın su ekstresinde doza bağlı olarak sırasıyla %25.3, 38.1 ve 61.0 oranında antioksidan aktivite belirlenirken dozlar içerisinde yalnızca 5 mg/ml'lik dozda orta düzeyde aktivite gözlemlendi. Diğer yandan aseton ve etanol ekstrelerinin su ekstresine göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görölmektedir. Doza bağlı olarak sırasıyla

etanol ekstresinde %79.9, 86.3 ve 95.0; aseton ekstresinde %54.4, 77.7 ve 88.4 oranında antioksidan aktivite belirlendi (Tablo 11, 12, 13 ve Şekil 18, 19, 20). Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere bu türün aseton ekstresi ve nispetende etanol ekstresi *F. cucullata*, *E. divaricata* ve *P. aipolia* gibi yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahipken su ekstresi düşük antioksidan aktivite göstermiştir. *R. polymorpha*'nın su, etanol ve aseton ekstresinin fenolik bileşik miktarları sırası ile  $17.0 \pm 0.3$ ,  $25.6 \pm 0.2$  ve  $46.2 \pm 0.9$  olarak tespit edilmiştir (Tablo 11, 12 ve 13). Fenolik bileşik miktarları arasındaki oranda aynı antioksidan aktivitede olduğu gibi su<etanol<aseton ekstreleri şeklindedir. Bu tür diğer türlere göre daha az fenolik madde içeriğine sahiptir. Bu türün diğer türlere göre nispeten daha düşük antioksidan etki göstermesi düşük fenolik içeriğine atfedilebilir. Diğer yandan indirgeme gücü su, etanol ve aseton ekstreleri için sırasıyla  $0.159 \pm 0.002$ ,  $0.154 \pm 0.006$  ve  $0.122 \pm 0.002$  olarak belirlenmiştir (Tablo 11, 12 ve 13).

İndirgeme gücü ile ilgili bulgularımız dikkate alındığında ekstreler arasında antioksidan aktivite ve fenolik miktarlarının yüksek olduğu yerde indirgeme gücünün daha düşük bulunmuş olması diğer liken türlerinden elde edilen bulgularımızla aynı paralellikte olup oldukça ilginçtir. İndirgeme gücü su> etanol>aseton şeklindedir. Daha düşük antioksidan aktivitenin tespit edildiği *R. polymorpha*'nın su ekstresinde belirlenen indirgeme gücü diğer ekstrelerden daha yüksek bulunmuştur.

*Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach., Besince zengin kayalar üzerinde bulunur. Özellikle kuş tüneklerinin veya yuvalarının alt kısmında gelişir<sup>144</sup>. Bu likende diğer araştırdığımız liken türleri gibi fazla araştırılmamıştır ve literatür kayıtları oldukça sınırlıdır. Bu likenle ilgili olarak literatürde usnik asit, arabitol, mannitol ve ramalinik asit isimli moleküllerin mevcut olduğu kaydedilmiştir<sup>27,163,172</sup>. Bu türün metanol ekstresinin antioksidan, antimikrobial ve antiviral aktiviteye sahip olduğu Güllüce ve

arkadaşları ile Karagöz ve ark. tarafından tespit edilmiştir<sup>17,28</sup>. Diğer yandan bu türden izole edilen usnik asidin antimikrobial aktiviteye sahip olduğu da literatürlerde kayıtlıdır<sup>27</sup>. Araştırmamızda bu liken türünün su ekstralarında yalnızca yüksek dozda orta düzeyde antioksidan aktivite belirlediğimizi, diğer yandan literatürlerde usnik asidin aseton ekstralarından izole edilebileceği<sup>27,173</sup> kaydedilmiş ve bizim deneylerimizde de aseton ekstresinde yüksek antioksidan aktivite gözlenmişti. Bu türün antioksidan aktivitesi içerdiği usnik asitten ileri gelebilir. Zira usnik aside, araştırma ekibimizin muhtelif izolasyon çalışmalarında da gözlediği üzere, liken ekstralarının hemen tümünde (su, etanol, metanol, eter, kloroform, aseton...v.s.) özellikle kloroform ve aseton ekstralarında rastlanmaktadır. Bu bilgiler bu türün antioksidan etkisinin ağırlıklı olarak usnik asitten ileri geldiğini doğrulamaktadır.

Araştırmamızda *Usnea filipendula*'nın her üç ekstresi için de yüksek antioksidan aktivite belirlendi. Doza bağlı olarak sırasıyla su ekstresi %41.8, 70.9 ve 83.3; etanol ekstresi %90.2, 92.7 ve 94.0; aseton ekstresi %89.1, 94.3 ve 96.4 oranında antioksidan aktivite gösterdi (Tablo 14, 15, 16 ve Şekil 21, 22, 23). Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere *U. filipendula*'nın her üç ekstresi de yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahiptir ve ekstralar antioksidan aktivite sıralaması su<etanol<aseton şeklindedir. Üstelik *U. filipendula*'nın etanol ve su ekstraları çok yüksek antioksidan etkiye sahip olan ve bizimde deneylerimizde pozitif standart olarak kullandığımız bir molekül olan troloks kadar veya ona yakın düzeyde bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

*U. filipendula*'nın su, etanol ve aseton ekstralarının fenolik bileşik miktarları sırası ile  $18.6 \pm 0.2$ ,  $34.5 \pm 0.1$  ve  $51.6 \pm 0.9$  olarak tespit edilmiş olup diğer türlerde olduğu gibi en yüksek fenolik içerik aseton ekstresindedir. Fenolik içerikte olduğu gibi antioksidan aktivitede de en güçlü aktivite aseton ekstresindedir. Böylece bu türün de

antioksidan aktivitesi fenolik maddelerden ileri gelmektedir (Tablo 14, 15 ve 16). Diğer yandan indirgeme gücü su, etanol ve aseton ekstreleri için sırasıyla  $0.187 \pm 0.003$ ,  $0.167 \pm 0.001$  ve  $0.116 \pm 0.007$  olarak belirlenmiştir (Tablo 14, 15 ve 16).

İndirgeme gücü ile ilgili bulgularımız dikkate alındığında ekstreler arasında antioksidan aktivite ve fenolik miktarlarının yüksek olduğu yerde indirgeme gücünün daha düşük bulunmuş olması da diğer liken türlerinden elde edilen bulgularımızla aynı paralellikte olup oldukça ilginçtir. İndirgeme gücü su>etanol>aseton şeklinde sıralanmakta olup daha düşük antioksidan aktivitenin tespit edildiği *U. filipendula*'nın su ekstresinde indirgeme gücü diğer ekstrelerden daha yüksek bulunmuştur.

*Usnea filipendula* Aggr., Ülkemizde genel olarak Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak gelişmektedir<sup>166</sup>. *Usnea* genusu adını yapısında bulunan usnik asitten almakta ve bu gruptaki likenler sınıflandırılırken usnik asidin mevcudiyeti dikkate alınır. Bu bağlamda *U. filipendula*'nın yapısında da usnik asit mevcuttur<sup>163,172</sup>. *Usnea filipendula*'nın aseton ekstresinde sarı iğnemsî şeklinde bir madde kristallenerek ayrılmıştır. Bu maddenin NMR spektroskopisi ile yapısı usnik asit olarak aydınlatılmıştır ve aseton ekstresi majör olarak bu maddeyi içermektedir. Böylece *U. Filipendula*'nın antioksidan etkisi özellikle aseton ekstresinin usnik asitten ileri gelmektedir. Araştırma materyali olarak üzerinde çalıştığımız bu liken türü hakkında da literatürlerde fazla bilgiye sahip değiliz. Bulgularımıza göre bu liken türünde çok yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahiptir. Günümüzde bilim adamları çok yoğun bir şekilde antioksidan etkili bitkiler üzerinde araştırma yapmaktadır. Fakat likenler ayrı bir grup olarak çok az araştırma yapılan bir bitki grubudur. Bizim bu araştırmayı tasarlayıp yapmamızdaki temel nedende zaten az araştırılmış olan bir bitki grubunu hem Ülkemize hemde Dünya'ya antioksidan özellikleri açısından tanıtmaktır. Bu araştırmanın

yayınlanmasını müteakip çok sayıda bilim adamı likenlerin biyolojik aktivitelerinin araştırılmasında mevcut çalışmanın datalarını dikkate alacaklardır diye düşünüyoruz. Bu tür Rusya bölgesinde halk tarafından belirli kumaşların boyanmasında boya kaynağı olarak ve yaraların tedavisinde kullanılmaktadır<sup>165</sup>. Bu likenin biyolojik etkilerinin araştırılmasında bu nokta referans olarak değerlendirilebilir.

Bitki ekstrelerindeki yüksek antioksidatif etki, elbette ekstrenin içerdiği antioksidatif özellikteki moleküllerden ileri gelmektedir. Antioksidan bileşikler, antioksidatif etkinliklerini değişik mekanizmalarla (geçiş metallerini bağlayabilirler, peroksitleri parçalayabilirler, hidrojen koparılmasını engelleyebilirler, moleküllerin radikal özelliklerini ortadan kaldıracılabılırler.. v.s.) ortaya koyabilirler<sup>174</sup>. Bir ekstrenin antioksidan aktivitesini çok değişik faktörlerin etkileyebilmesi, antioksidan aktivitenin ana kaynağının ve diğer faktörlerin katkısının tespitini zorlaştırmaktadır. Ana etkenin ne olduğunun tespiti için ekstredeki her bir bileşik hakkında çok sayıda veriye (indirgeme gücü, serbest metal bağlayabilme, radikal giderebilme, peroksit giderebilme, süperoksit giderebilme yetenekleri) ihtiyaç vardır. Bu amaçla toplam fenolik bileşiklerin miktarı ve indirgeme güçlerinin tespit edilmesi antioksidan aktivitenin kaynağı hakkında bize bilgi verecektir.

Antioksidan potansiyelin etkin belirlenmesinde en dikkat çekici parametrelerden birisi fenolik maddelerdir<sup>9</sup>. Fenolik maddelerin çeşide bağlı olarak antioksidan kapasiteyi değiştirebilmesine rağmen bir ekstrenin toplam fenolik içeriği ekstrenin antioksidan aktivitesi ile genellikle uyumluluk gösterir<sup>49,50</sup>. Bu yüzden pek çok bitki ekstresinin antioksidan aktivitesinin ekstrede bulunan fenolik maddelerden kaynaklandığı görüşü yaygın olarak kabul edilmiştir.



Bizim bulgularımız da bu verilerle tam bir uyum içerisinde. Nitekim deneylerimizde yüksek antioksidan aktivite belirlediğimiz ekstrelerdeki fenolik madde içeriklerinin de diğerlerinden daha yüksek olduğunu tespit ettik. Bizim bulgularımız literatürlerdeki genel kabulü doğrulamaktadır.

İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir etken olabilir<sup>175</sup>. Bizim deneylerimizde antioksidan aktivitenin yüksek olduğu ekstrelerde indirgeme gücünün daha düşük olduğunu gözledik. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan ekstrelerin indirgeme gücünün düşük olabileceği literatürlerde kaydedilmiştir<sup>176,177</sup>. Bunun nedeni serbest demir iyonlarının eser miktarda var olduğu sistemlerde Fenton reaksiyonu ile oksidasyonun net hızının artmasıdır. İndirgeme gücünün yüksek olduğu maddeler böyle bir sistemde Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgeyerek oksidasyonun daha da hızlanmasına sebep olabilir. Likenlerde de demir iyonlarının eser seviyede mevcut olması indirgeme gücünün yüksek olmasına neden olmuş ve antioksidan aktivitenin daha az tespit edilmesine neden olmuş olabilir veya bunun tersi durumda indirgeme gücü düşük olup antioksidan aktivite daha yüksek belirlenmiş olabilir<sup>178</sup>. Nitekim antioksidan aktivite ile indirgeme gücü arasında bir ilişki olduğu da literatürlerde rapor edilmiştir<sup>49,50,179</sup>.

Antioksidan aktivitenin düşük olduğu ekstrelerdeki bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin de düşük olacağını söylemek mümkün değildir. Ekstrelerde oksidasyonu hızlandırıcı maddelerin var olması, bu maddelerin aralarındaki sinergik ve enfüjonistik etkileşim antioksidan etkiyi etkileyebilir. Belki de bu sebeple fenolik bileşik miktarı ve indirgeme gücü yüksek olan ekstrelerde düşük antioksidan aktivite gözlemlemekteyiz. Ayrıca ekstrelerin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması onlardaki bileşiklerinde yüksek antioksidan aktiviteye sahip olacağını göstermez.

Ekstrenin yüksek antioksidan aktivitesi, ondaki birden fazla maddenin sinerjistik ve/veya antagonistik etkisinden dolayı olabilir ve bileşiklerin ayrı ayrı antioksidant aktiviteleri belirlendiğinde aynı aktivite elde edilemeyebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada aşağıda sıralanan sonuçlara ulaşıldı:

1. Ülkemizde yayılış gösteren likenlerden *Evernia divaricata*, *Flavocetraria cucullata*, *Physcia aipolia*, *Ramalina polymorpha* ve *Usnae filipendula* isimli türler antioksidant aktivite, fenolik bileşik miktarları ve indirgeme yetenekleri yönünden araştırıldı.

2. Liken örneklerinin her bir türü için su, etanol ve aseton ekstraları literatüre uygun yöntemler kullanılarak elde edildi ve her ekstre ayrı ayrı deneylere alınarak değerlendirildi.

3. Liken örneklerinden elde edilen ekstraların tümünün çok yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Ekstreler içerisinde yalnızca *Ramalina polymorpha*'nın su ekstresi orta düzeyde aktiviteye sahipti.

4. Ekstrelerde toplam fenolik bileşiklerin miktarı antioksidan aktivite ile paralel olarak artmaktaydı. İndirgeme güçleri ise fenolik bileşiklerin miktarı tersine antioksidan aktivitenin yüksekliğine bağlı olarak daha düşük düzeydeydi.

5. Bu çalışmada deney materyali olarak kullanılan liken türlerinin tümünün antioksidan potansiyele sahip olduğu ve biyolojik aktivite çalışmalarında öncelikli olarak değerlendirilebilecekleri kanaatine varıldı.

## 6. KAYNAKLAR

1. Heinonen MI., Meyer AS, Frankel EN. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agric. Food Chem* 1996; 46: 4107-4112.
2. Lee KY, Weintraub ST, Yu BP. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensi*. *Free Radical Bio. Med.* 2000; 28(2): 261-265.
3. Zhang D, Yasuda T, Yu Y, Zheng P, Kawabata T, Ma Y, Okada S. Ginseng extracts scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxydation. *Free Radical Bio. Med.* 1996; 20(1): 145-150.
4. Osawa T. Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.* 1999; 111: 133-139.
5. Odabaşoğlu F. Antioksidan Vitaminler. Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi - Konferans Kitapçığı, Erzurum, 8 Mart 1999.
6. Cos P, Calomme M, Sindambiwe J, De Bruyne T, Cimanga K, Pieters L, Vlietinck A.J. and Vanden Berghe D. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Medica*, 2001; 67: 515-519.
7. Przybylski R, Lee Y. and Eskin N.A.M. Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998; 75(11): 1595-1601.
8. Xing Y. and White PJ. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997;74(3): 303-307.
9. Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A. and Del-Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L-leaves. *Food Chem.* 2000;68(4): 457-462.
10. Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, Hopia A, Huynh-Ba T, Lambelet P, Mcphail D, Skibsted LH. and Tijburg L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 2001; 212: 319-328.
11. Crittenden, P.D., David, J.C., Hawksworth, D.L., & Campbell, F.S. (1995). Attempted isolation and success in the culturing on a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. *New Phytol.*, 130, 267-298.

12. Odabasoglu F. Likenler. *Pharma Sark*, 2006;1 (3): 16–19.
13. Huneck S. and Yoshimura I. *Identification of Lichen Substances*, Springer, Berlin Heidelberg, New York, USA. 1996
14. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 1996; 86: 559-570.
15. Lawrey JD. Biological role of lichen substances. *The Bryologist*, 1986; 89(2): 111-122.
16. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, Milne GWA, Proksa B. and Pommier Y. Depsides and Depsidones as Inhibitors of HIV-I Integrase: Discovery of Novel Inhibitors Through 3D Database Searching. *J Med. Chem.* 1997; 40: 942-946.
17. Karagöz A, Aslan A. Antiviral and cytotoxic activity of some lichen extracts. *Biologia*, Bratislava, 2005; 60:3: 281-286.
18. Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortis A, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E, Hidalgo ME. Activity of Compounds Isolated from Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 1997; 116: 51-55.
19. Gücin F, Dülger B, Aslan A. *Pseudoevernia furfuracea*(L.) Zopf. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 1997; 7(25): 22-24.
20. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotech. Lett.*, 2005a; 27 (14): 991-995.
21. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U, Tissue culture of some lichens and screening of their antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties. *Phyther. Res.* 2007; 21(12): 1159-1170.
22. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U, Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. *Bioresource Tech.* 2008; 99 (4): 776-784.
23. Rankovic B, Misic M, Sukdolak S, Milosavljevic D. Antimicrobial activity of the lichens *Aspicilia cinerea*, *Collema cristatum*, *Ochrolechia androgyna*, *Physcia aipolia* and *Physcia caesia*. *Italian J. Food Sci.* 2007; 19 (4): 461-469.
24. Rankovic B, Misic M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 24 (7): 1239-1242.

25. Zovko M, Kosalec I, Pepeljnjak S, KaloPera Z, Partl A, Bakmaz M. Antioxidant and antimicrobial activity of lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. *Planta Medica*, 2006; 72 (11): 1035-1035.
26. Aslan A, Gulluce M, Sokmen M, Adiguzel A, Sahin F, Ozkan H, Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. *Pharm Biol.* 2006; 44 (4): 247-252.
27. Cansaran D, Atakol O, Halici MG, Aksoy A, HPLC analysis of usnic acid in some *Ramalina* species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities. *Harm. Biol.* 2007; 45 (1): 77-81.
28. Güllüce M, Aslan A, Sökmen M, Şahin F, Adıgüzel A, Ağar G. and Sökmen A. Screening the antiacidant and Antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*. 2006; 13: 515-521.
29. Wei XL, Jeon HS, Han KS, Koh YJ, Hur JS. Antifungal activity of lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. *Plant Pathol. J.* 2008; 24(2): 202-206.
30. Schindler H. Zur Geschichte der Anwendung von Flechten(Lichens) in der Medizin. *Carolinea*. 1988; 46: 31-36.
31. Demleitner S, Kraus J, Franz G. Synthesis and Antitumor Activity of Derivates of Curdlan and Lichenan Branched at C-6. *Carbohydr. Res.* 1992;226: 239-245.
32. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Vanella L, Cardile V, Garbarino J. Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Anti-cancer Drugs*. 2006; 17 (10): 1163-1169.
33. Yucel O, Odabasoglu F, Gulluce M, Calik ZZ, Cakir A, Aslan A, Yazici K, Halici M. Antioxidant and antimicrobial properties of a lichen species, *Cladonia rangiformis* growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 4 (2): 101–109.
34. Odabasoglu F, Gulluce M, Cakir A, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Yazici K. Investigation of antioxidant and antimicrobial properties of three lichen species growing in Turkey. *19<sup>th</sup> European Workshop on Drug Metabolism* Antalya-Turkey. (DMW-2004), 03-08 October 2004.

35. Braasch J, Jacobsen P. Flechten und Ihre Allergene. *Allergologie*, 1991; 14: 99-104.
36. Huneck S, Schreiber K. Wachstumsregulatorische Eigenschaften von Flechten- und Moos-Inhaltsstoffen. *Phytochemistry*. 1972; 11: 2429-2433.
37. Ingolfssdottir K, Wiedemann B, Birgisdottir M, Nenniger A, Jonsdottir S. and Wagner H. Inhibitory Effects of Baeomycesic Acid from the Lichen "*Thamnolia subulisformis*" on 5-Lipoxygenase in vitro. *Phytomed*. 1997; 4: 125-129.
38. Higuchi M, Miura Y, Boohene J, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Yoshimura Y, Yamada Y. Inhibition of Tyrosinase Activity by Cultured Lichen Tissues and Bionts. *Planta Med*. 1993;59: 195-199.
39. Seifert P, Bertram C. Usnic Acid-Natural Preservation from Lichens. *Seifen Öle Fette Wachse* 1995; 121: 480-485.
40. Galun M, Ronen R. Interaction of Lichens and Pollutants. In: Galun, M. (ed) *CRC Handbook of Lichenology Vol-III*. CRC, Boca Raton 1988; P: 55.
41. Yazıcı K, Aslan A. Distribution of epiphytic lichens and air pollution in the city of Trabzon, Turkiye. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2006; 77: 838-845.
42. Kirschbaum U, Wirth V. *Flechten Erkennen, Luftgüte Bestimmen*. Eugen Ulmer, Stuttgart. 1995.
43. Tanker N, Koyuncu M. and Coşkun M. *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Basımevi-Ankara, 1998.
44. Paudel B, Bhattarai HD, Lee JS, Hong SG, Shin HW, Yim JH. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biol*. 2008; 31(5): 605-608.
45. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *LWT-Food Sci. TECH* 2006; 39 (1): 80-85.
46. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytotherapy Res*. 2005b; 19 (1): 58-64.

47. Devehat FLL, Tomasi S, Elix JA, Bernard A, Rouaud I, Uriac P, Boustie J. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *J Natural Products* 2007; 70 (7): 1218-1220
48. Halıcı M. Ratlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde "*Usnea longissima*" dan elde edilen su ekstresinin antiülserojenik ve bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması. Sağ. Bil. Enst. Ecz. Fak. Biyokimya ABD. Yüksek Lisans tezi Erzurum, 2003.
49. 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.
50. 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.* 2004; 18: 938–941.
51. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine* 2005; 12: 656-662.
52. Halici M, Kufrevioglu OI, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aslan A, Koc M, Cadirci E, Atalay F. Gastroprotective and anti-oxidative properties of the some extracts from *Ramalina capitata*. 5<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Chemistry ISPC-2007, Abstracts. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007; 4 (Special issue): 78.
53. Rucker RB, Steinberg F. Vitamin C. *Encyclopedia of Biol. Chem.* 2004; 4: 367-371.
54. Kanfer JG, Ashwell JJ, Burns JJ. Formation of L-lyxonic and L-xylonic acids from L-ascorbic acid in rat kidney. *J. Biol. Chem.* 1960; 235: 2518–2521.
55. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *J. Nutr.* 2003; 2: 1-10.
56. Tuncer ŞD. Vitaminler: Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Ankara, Pozitif yayıncılık 2006; 117-118.
57. Fox PF, McSweeney PLH. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Yhomson Science 1998; 289-291.
58. İmik H, Fidancı UR, Sel T. Ankara Keçisi oğlaklarında C ve E vitaminlerinin metabolik strese karşı etkisi. *Vet. Bil. Derg.* 1999; 15: 47-53.

59. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J. Am. College of Nutr.* 2003; 22: 18–35.
60. Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border Membrane Vesicles. *J. Nutr.* 2000; 130: 63–69.
61. Rose RC, Choi JL. Intestinal absorption and metabolism of ascorbic acid in rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: 1238-41.
62. Olson JA, Hodges RE. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin C in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987; 45: 693-703.
63. Huges DA. Dietary antioxidants and human immune function. *British Nutr. Founda.* 2000; 25: 35-41.
64. McCorkle F, Taylor R, Stinson R, Day EJ, Glick B. The effects of a mega level of vitamin C on the immune response of the chicken. *Poultry Sci.* 1980; 59: 1324-1329.
65. Wu CC, Dorairajan T, Lin TL. Effect of ascorbic acid supplementation on the immune response of chickens vaccinated and challenged with infectious bursal disease virus. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 2000; 74: 145-152.
66. Perdue SL, Thaxton JP. and Brake J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *J. Applied Physiol.* 1985; 58: 1511-1516.
67. Iqbal K, Khan A, Khattak MMAK. Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health – A review. *Pakistan J. Nutr.* 2004; 3: 5-13.
68. Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K, Maity P, Banerjee RK. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40: 1397–1408
69. Vatn S, Sjaastad OV, Ulvund MJ. Histamine in lambs with abomasal bloat, hemorrhage and ulcers. *J. Vet. Med.* 2000; 47: 251–255.
70. Sullivan M. and Yool DA. Gastric disease in the dog and cat. *The Vet. J.* 1998; 156: 91-106.
71. Halpern SL. Quick reference to clinical nutrition a guide for physicians. America, 1979; 175-176.



72. Belaiche J, Burette A, De Vos M, Louis E, Huybrechts M, Deltenre M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. *Acta Gastroenterol. Belg.* 2002; 65: 65-73.
73. Brendan JRW. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500: 427–439.
74. Villegas Í, La Casa C, La Lastra CA, Motilva V, Herrerias JM, Martin MJ. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response. *Life Sci.* 2004; 74: 873–884.
75. Jainu M, Devi CSS. Gastro protective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chemico-Biol. Interac.* 2006; 161: 262–270.
76. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.* 2007; 59: 257-268.
77. Odabasoglu F. Antioksidan vitaminler. *Pharma Şark* 2006; 1 (1): 19–21.
78. Burke A, Smyth E, Fitz Gerald GA. In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Laurence L. Brunton, Ed.; Mc Graw-Hill Companies. New-York. 2006; (11): 671-717.
79. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am. J. Med.* 1999; 106: 37-42.
80. Maricic N, Ehrlich K, Gretzer B, Schuligoi R, Respondek M, Peskar BM. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors aggravate ischemia-reperfusion injury in the rat stomach. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 128:1659 -1666.
81. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2001; 15: 801-820.
82. Laine L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *J Pain Symptom Manage.* 2003; 25: 32-40.
83. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. *Feryal Matbaacılık Sanayi ve Tic Ltd Şti.* 1997; 3(7): 2818-2856.
84. Takeuchi K, Kagawa S, Mimaki H, Aoi M, Kawauchi S. COX and NOS isoforms involved in acid-induced duodenal bicarbonate secretion in rats. *Dig. Dis. Sci.* 2002; 47: 2116–2124.

85. Schmassmann A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 1998; 104: 43–51.
86. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon, AKÜ. Yayın. 2000; 1-35.
87. Halliwell B. and Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219: 1-14.
88. Weis SJ, LoBuglio AF. Biology of disease: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 5-18.
89. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Med.* 2007; 1-9.
90. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoat K. and Xin W. Nutritional aspects of free radicals. *Pro. Nutr. Soc.* 1987; 46: 1-12.
91. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları. 1995; 1-80.
92. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Rad. Biol. Med.* 1985; 1: 3-25.
93. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; 41(12): 1819-1828.
94. Szabo S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand. J. Gastroenterol.* 1987; 127: 21-8.
95. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide and nitric oxide under physiological and pathological conditions . *Mol. Biotechnol.* 2007; 37:2–4.
96. Auroma O. Free radicals, antioxidants and international nutrition review. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 1999; 8: 53-63.
97. Halliwell B. Tell me about radicals, doctor: a review. *J. Royal Society of Med.* 1989; 82: 747-752.
98. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 7915-7922.
99. Robison TW, Murphy JK, Beyer LL, Richters A, Forman HJ. Depression of stimulated arachidonate metabolism and superoxide production in rat alveolar

- macrophages following in vivo exposure to 0.5 ppm NO<sub>2</sub>. *J Toxicol Environ Health*. 1993; 38: 273-92.
100. Aslan R, Dündar Y. Bir fizyolojik eleman ve radikal olarak azot oksit. *Hay. Araş. Derg.* 1998; 8: 34-38.
101. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Med. Sci. Monit.* 1998; 4: 1089-1095.
102. Guemourı L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* 1991; 37: 1932-7.
103. Georgieva NV. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – A Review. *Bulgarian J. Vet. Med.* 2005; 8: 1-11.
104. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426.
105. Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Biochem. and Biophys.* 1978; 191: 351-357.
106. Dengiz GO, Odabasoglu F, Halici Z, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y. Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Arch Pharm Res*, 2007; 30 (11): 1426–1434.
107. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Office J. Turk. Nephrol. Assoc.* 1997; 3-4: 92-95.
108. Prichard M, Ducharme NG, Wilkins PA, Erb HN, Butt M. Xanthine Oxidase Formation during Experimental Ischemia of the Equine Small Intestine. *Can. J. Vet. Res.* 1991; 55: 310-314.
109. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free Radicals: The Pros and Cons of Antioxidants. *J. Nutr.* 2004; 134: 3143–3163.
110. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklundi S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 4985–4994.
111. Doctor RB, Mandel LJ. Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1991; 1: 959-969.
112. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postistemic tissue injury. *The New England J. Med.* 1985; 312: 159-163.

113. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 -dioxygenase reaction. *J. Biol. Chem.* 1971; 25: 7825.
114. Hung-Hai K, Brunk UT, Sohala RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad. Biol. Med.* 1993; 15: 621-627.
115. Ersoy A, Dilek K. Hemodiyaliz Hastalarında Eritrosit Membran Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidatif Homeostazis Değişiklikleri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg.* 1999; 1: 1-4.
116. Jana AK, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by ultrasound: Mechanism and implications. *J. Biosci.* 1990; 15: 211–215.
117. Li JM, Shah AM. ROS Generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 221–226.
118. Comporti M. Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 1985; 53: 599-623.
119. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letter.* 1991; 281: 9-19.
120. Panduri V, Weitzman SA, Chandel NS, Kamp DW. Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 286: 1220–1227.
121. Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 8220-8226.
122. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Ann. Emerg. Med.* 1986; 15: 1075-83.
123. Goulart M, Batoreu MC, Rodriguez AS, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagen.* 2005; 20: 311–315.
124. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 1999; 424: 83–95.
125. Hudson N, Everitt S, Edwards T. Elevation of gastric mucosal leukotriene B4 levels of patients on long-standing NSAID therapy. *Gastroenterol.* 1991; 100: A86.

126. Halıcı M. Bazı likenlerden izole edilen maddelerin sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde antiülser mekanizmalarının araştırılması. Fen Bilimleri Enst. Kimya ABD. Doktora tezi Erzurum, 2008.
127. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993; 57: 715-25.
128. Long CA, Bislskl HJ. Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species. *J. Phys. Chem.* 1980; 84: 555-557.
129. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrah Paşa Tıp Derg.* 2004; 35: 140-149.
130. Dalle-Donne İ, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chem. Acta.* 2003; 329: 23–38.
131. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Gebicki JM, Dean RT. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem. J.* 1992; 282: 621-624.
132. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicol.* 2002; 181-182: 219-222.
133. Epe B, Ballmaier D, AdamW, Grimm GN, Saha-Möller CR. Photolysis of N-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 1625–1631.
134. Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Cadirci E, Suleyman H. Gastroprotective effect of vegetable oils and alpha-tocopherol on indomethacine-induced gastric ulcer in rats and its relation with myeloperoxidase and glutathione s-transferase activities. *3<sup>rd</sup> International Meeting on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry.* 2007. October 16-21. Antalya, TURKEY, P: 73.
135. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem. J.* 1998; 335: 85-94.
136. Richardson DHS. *The Vanishing Lichens.* David and Charles Newton Abbot. 1975.
137. Richardson DHS. *Lichens as Pollution Monitors.* Richmond Publishing. 1992.
138. Taylor TN, Hass H, Remy W, Kerp H. The oldest fossil lichen. *Nature*, 1995 ; 378, 244.
139. Nash I, Thomas H. *Lichen Biology.* Cambridge University Press 304p, UK. 1996.

140. Baron G. Understanding Lichens. Richmond Publishing Slough, England. 1999.
141. Dobson FS. Lichens: An Illustrated Guide to British and Irish Species, by Fifth Edition Richmond Publishing 2005.
142. <http://www.earthlife.net/lichens/intro.html>.
143. Altun D. *Usnea longissima* Ach. Likenin Drosophila Melanogaster' in Çeşitli Gelişim Parametreleri Ve Ömür Uzunluğu Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ERZURUM, 2007.
144. Aslan A. Erzurum-Kars-Artvin arasında yer alan bölge likenleri üzerine taksonomik incelemeler. Doktora tezi, Uludağ üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, BURSA, 1995.
145. Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften 2002;89:137–146.
146. Sanders WB. Bacteria, algae, and phycobionts: maintaining useful concepts and terminology The Lichenologist. 2004;36 (5): 269–275.
147. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Likenler>.
148. Armstrong RA. Lichens, Lichenometry And Global Warming. Microbiologist. 2004;5(3): 32-35.
149. Aslan A, Öztürk A, Kaya E. Likenlerin ekonomik önemi ve Oltu bölgesinden tesbit edilen önemli liken türleri. Geçmişten geleceğe Oltu ve Çevresi Sempozyumu, Erzurum, 1998.
150. Boustie J. and Grube M. Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genetic Resources. 2005; 3(2): 273–287.
151. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens Appl Microbiol Biotechnol, 2001; 56: 9–16.
152. Öztürk A, Aslan A. Likenlerin ekonomik özellikleri ve Kuzeydoğu Anadolu'dan bazı liken türleri. Yüzüncü Yıl Univ, Fen-Edeb. Fak, Fen Bilimleri Dergisi. 1991; 2 (2): 27–42.
153. Aslan A, Öztürk A. Oltu (Erzurum) Yöresine ait liken florası üzerine çalışmalar. Tr J Botany. 1994; 18: 103–106.
154. Aslan A. Lichens from the Regions of Artvin, Erzurum, and Kars, Turkey. Israel Journal of Plant Sciences. 2000; 48: 143-155.

155. İçlim A, Dığrak M, Bağcı E. Bazı bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Tr J Biology. 1998; 22: 119–125.
156. Dilsizoğlu A, Kavuncuoğlu Z, Oba D. Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. Tübitak Bilim ve Teknik. 2004; 439: 86–89.
157. Harmala P, Hiltunen R, Caldentey KM, Laakso T, Kauppinen V. Isolation and in vitro cultivation of lichen alga and their antimicrobial properties. Fitoterapia. 1992; 63(3): 3217-3225.
158. Ingólfssdottir K. Molecules of interest: usnic acid. Phytochemistry. 2002; 61: 729–736.
159. Vartia KO. Antibiotics in lichens. I. Ann-Med Ex Biol Fenn. 1950; 27: 46-54.
160. Dölger B, Gücin F, Kara A, Aslan A. *Usnea florida* (L) Wigg likeninin antimikrobiyal aktivitesi. Turk J. Biol. 1997; 21: 103–108.
161. Dölger B, Gücin F, Aslan A. *Cetraria islandica* (L) Ach likeninin antimikrobiyal aktivitesi. Turk J. Biol. 1998; 22: 111–118.
162. Huneck S. New results on the chemistry of lichen substances. Fortschr-Chem-Org-Naturst. 2001; 81: 1-276.
163. Culberson CF. Chemical and Botanical guide to Lichen Products. The Univ of North Carolina Press Chapel Hill. 1969.
164. Haris CW. Lichens: Cetraria. The Bryologist. 1901; 4(3): 41-45.
165. <http://www.lichen.com/usetaxon.html>
166. Halonen P, Clerc P, Goward T, Brodo I M, Wulff K. Synopsis of the Genus *Usnea* (Lichenized Ascomycetes) in British Columbia, Canada. The Bryologist, 1998; 101(1): 36-60.
167. Aslan A, Yazici K, Karagoz Y. Lichen flora of the Murgul district Artvin, Turkey. Israel J Plant Sci. 2002; 50(1): 77-81.
168. Purvis OW, Coppins BJ, Hawksworth DL, James PW, Moore DM. The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. Natural History Museum Publications in association with The British Lichen Society, London, 1992; 710.
169. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. Eiyō to Shokuryō 1996; 19: 210-214.
170. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. J Enol Vitic. 1977; 28: 49-55.

171. Yen GH, Chen HY. Antioxidant activity of a various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem.* 1997; 43: 27-32.
172. Asahina Y, Shibata S. Chemistry of lichen substances. Asher and Co Ltd. VAALS, Amsterdam. 1971.
173. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol*, 2006; 103(1): 59–65.
174. Diplock AT. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Rad.Res.* 1997; 27: 511-532.
175. Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadas s P. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 1813-1819.1.
176. Yıldırım A, Oktay M, Bilaloğlu V. The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Sciences*,(Baskıda). 2000a.
177. Yıldırım A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur ÖF, Bilaloğlu V. A comrarison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea* Desf Ex Dc), Sage (*Salvia triloba* L.), Black Tea ( *Camellia sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* 2000; 5030-5034.
178. Mavi A. *Polygonum cognatum* Meissn. (Madımak) ve *Rumex crispus* L. (Evelik) bitkilerinin antioksidant aktivitelerinin mukayesesi. Atatürk Üniv., Fen Bil Enst., Kimya Eğt ABD, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2000.
179. Mei L, McClements DJ, Decker EA. Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 5072-5077.