



Cladonia furcata (Huds.) Schrad.'nın İnsan Periferal Lenfositleri Üzerindeki Sitotoksik, Genotoksik ve Oksidatif Etkileri

Bugrahan EMSEN^{1*}, Ali ASLAN², Abdullah KAYA¹

¹Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, TÜRKİYE

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Van, TÜRKİYE

Received: 12.07.2017; Accepted: 30.11.2017

<http://dx.doi.org/10.17776/csj.405735>

Özet: Mevcut çalışmada, *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. likeninden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının (sırasıyla CME ve CSE) insan lenfositleri üzerindeki aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Lenfositlerdeki sitotoksik etkiyi test etmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür ve laktat dehidrogenaz testleri kullanılmıştır. Ayrıca, hücrelerdeki oksidatif stres ve genotoksisite değişimleri sırasıyla toplam oksidan durum ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin seviyeleri ile incelenmiştir. Bu uygulamalara ek olarak, ekstraktlar ile muamele edilen lenfositlerdeki toplam antioksidan kapasite (TAK) değişimleri de belirlenmiştir. CSE'nin düşük konsantrasyonlarının yüksek seviyelerde sitotoksik etki göstermedikleri ortaya çıkarılmıştır (IC₅₀=221,14 mg/L). Gerçekleştirilen korelasyon analizleri sitotoksisitenin oksidatif stres ile ilişkili ($p < 0,01$) olduğunu göstermiştir. Tüm uygulamalar göz önüne alındığında, özellikle CSE'nin negatif kontrole kıyasla hücreler üzerinde istatistiksel olarak ($p > 0,05$) genetik hasar meydana getirmediği tespit edilmiştir. Hücrelerdeki TAK temel alındığında, ekstraktların belli konsantrasyonlarının (12,5-50 mg/L) TAK'yi anlamlı derecede ($p < 0,05$) yükselttiği dikkat çekmektedir. Sonuç olarak elde edilen veriler, özellikle CSE'nin lenfositler üzerinde genotoksik ve oksidatif strese neden olmayarak, yüksek antioksidan özellikleri sayesinde yeni bir tedavi maddesi kaynağı olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sitotoksisite, genotoksisite, toplam antioksidan kapasite, toplam oksidatif stres

Cytotoxic, Genotoxic and Oxidative Effects of *Cladonia furcata* (Huds.)

Schrad. on Human Peripheral Lymphocytes

Abstract: In the present study, it was aimed the evaluation of activities of methanol and water extracts (respectively, CME and CSE) obtained from *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. on human lymphocytes. In order to test cytotoxic effect in lymphocytes, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and lactate dehydrogenase tests were used. Oxidative stress and genotoxicity changes in the cells were also examined with total oxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels, respectively. In addition to these assays, total antioxidant capacity (TAC) changes in lymphocytes treated with extracts were also determined. It was revealed that low concentrations of CSE did not show cytotoxic effect at high levels (IC₅₀=221,14 mg/L). Performed correlation analyzes showed that cytotoxicity was associated with oxidative stress ($p < 0,01$). Considering all applications, it was determined that CSE did not statistically ($p > 0,05$) cause genetic damage on cells compared to negative control. Based on TAC in cells, it is notable that certain concentrations of the extracts (12,5-50 mg/L) significantly increased TAC ($p < 0,05$). Consequently, the resulting data reveal that especially CSE can be a source of new therapeutic agents due to its high antioxidant properties, without causing genotoxic and oxidative stress on lymphocytes.

Keywords: Cytotoxicity, genotoxicity, total antioxidant capacity, total oxidative stress

1. GİRİŞ

Bitkiler sahip oldukları antioksidan bileşenler aracılığı ile çeşitli hastalıkların tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır. Özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin yapılarında barındırdığı antioksidan bileşenler aracılığı ile farklı kanser türlerine karşı koruyucu özellikleri birçok araştırma sonucuna yansımış durumdadır [1–3]. Efdi ve arkadaşları [4] *Enicosanthum membranifolium* bitkisinin, Efferth ve arkadaşları [5] ise *Artemisia annua*'nın yapılarında bulunan antioksidan moleküller sayesinde lösemi ve HeLa kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiklerini kanıtlamışlardır. Bu çalışmalara benzer sayısız araştırma birçok bitkinin farklı hastalıkların tedavi sürecinde kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır. Özellikle kanser hastalıklarının tedavisine yönelik gerçekleştirilen cerrahi, radyoterapi veya kemoterapi yöntemlerine ilave olarak bitkisel ürün kaynaklı tedavi metotları da göz ardı edilemez bir gerçektir. Birçok araştırmacı kanser tedavisi kapsamında bitkisel ürünleri kullanarak hastalıkların seyri üzerinde olumlu katkılar sağlamayı hedeflemişlerdir [6,7].

Liken adı verilen mikobiyont kısmını mantarların, fotobiyont kısmını ise alglerin meydana getirdiği simbiyotik organizmalar, yeryüzünde başka hiçbir canlıda bulunmayan yalnızca kendilerine has metabolitleri üretebilen ilginç canlılardır [8]. Likenlere özgü sekonder metabolitlerin ekstraktlarında yüksek oranda bulunması [9], onların birçok biyolojik aktivitesinin incelenmesine yol açmıştır [10–12]. Son yıllarda alternatif tedavi başlığı altında yararlanılan birçok bitki türü farklı hastalıklar üzerinde umut verici sonuçlar doğurmuştur. Likenler, yapılarında barındırdıkları eşsiz metabolitler sayesinde tıbbın ve sağlık sektörünün değişik alanlarında alternatif tedavi metotları kapsamında kullanılmaktadır [9]. Likenlerin yapılarındaki etken maddelerin toksik ve faydalı özellikleri göz önüne alınarak gerçekleştirilen birçok çalışma ile bilim dünyasına katkı sağlanmıştır. Tarım zararlıları ile mücadelede gerçekleştirilen biyolojik insektisit çalışmaları [13–15], tıp ve sağlık sektöründe alternatif metot

olarak ortaya konulan antimikrobiyal [16], antioksidan [17], antialerjen [18], immünolojik [19], antigenotoksik ve antimitojenik [20] çalışmalar, fikir oluşturması açısından, daha sonraki dönemlerde yapılabilecek ayrıntılı çalışmalara ışık tutmuştur. Ayrıca likenlerin farklı kanser türleri üzerinde alternatif tedavi süreci kapsamında apoptozu indükleyici ve sitotoksik aktiviteler gösterdiğini kanıtlayan birçok bilimsel yayın mevcuttur [11,21]. Bu yayınlar ve geçmiş yüzyıllardan bu yana likenlerin geleneksel bir şekilde kullanılarak birçok alanda olumlu sonuçlar verdiği göz önüne alındığında, birçok hastalıkta da temel tedavi metotlarına destek amaçlı likenlerin kullanımının ayrı bir öneme sahip olduğu göz ardı edilemez bir gerçektir [9].

Daha önce yapılan araştırmalarda, *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. likeninin insan periferik lenfositleri üzerine etkilerinin henüz tespit edilmediği anlaşılmıştır. Bu nedenle; mevcut çalışmada, *C. furcata*'dan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve oksidatif aktivite potansiyelleri değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Liken örnekleri

Bu çalışmada *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. liken türü kullanılmıştır. İlgili örnekler Erzurum ilinden toplanmış ve teşhisi çeşitli flora kitaplarından [22,23] faydalanmak suretiyle gerçekleştirilmiştir.

2.2. Ekstraksiyon

Liken örnekleri toz haline getirildikten sonra Soxhlet ekstraktöründe ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Her bir likenden 30 g kullanılmıştır. Metanol ve su çözücülerinde ekstrakte edilen liken örnekleri, ekstraksiyon işleminin ardından adi süzgeç kâğıdında süzölmüş ve elde edilen süzüntüler döner buharlaştırıcı ile yoğunlaştırılmıştır. *C. furcata*'nın metanol ekstraksiyonu (CME) sonucunda 2,7 g, su ekstraksiyonu (CSE) sonucunda 3,2 g ham ekstrakt

elde edilmiştir. Denemelerde kullanılan ekstraktlar %2 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) çözücüsünde çözdürülmüş ve negatif kontrol (kontrol⁻) olarak %2 DMSO kullanılmıştır.

2.3. Periferik lenfosit kültürünün elde edilmesi

Hiparinize kan örnekleri, sigara ve alkol kullanmayan, ilaç tedavisi altında olmayan ve yakın geçmişte mutajenlerle karşılaşmamış olan gönüllülerden alınmıştır. Lenfositler Fikol-Hipak (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, ABD) ile yoğunluk gradientine bağlı olarak ayrılmıştır. İzole edilen lenfositler 2 mM/L L-glutamin, %10 FBS ve penisilin-streptomisin (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, ABD) ile RPMI-1640 ortamında (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, ABD) %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilmiştir.

2.4. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi

Liken ekstraktlarının lenfositler üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla ticari MTT hücre proliferasyon kiti (Cayman, ABD) kullanılmıştır. Bu kit aracılığı ile hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve indüksiyonu üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada MTT, sahip olduğu net pozitif yük ve plazma zarı potansiyeli nedeniyle hücre içerisine hareket etmekte ve hücre içindeki NAD(P)H oksidoreduktazlar tarafından mor renge sahip olan formazana indirgenmektedir [24]. MTT testleri için pozitif kontrol olarak mitomisin-C (10⁻⁷ M) kullanılmıştır.

2.5. Laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı analizi

Liken ekstraktlarının lenfositler üzerindeki sitotoksik etki göstererek ortaya çıkardıkları LDH salınım seviyelerini belirlemek amacıyla ticari LDH sitotoksikite kiti (Cayman, ABD) kullanılmıştır. LDH, apoptoz veya nekroz olayları esnasında meydana gelen hücre hasarı sonucunda hızla hücre kültür ortamına salınan bir enzimdir. Kit uygulamasının ilk basamağında, laktatın piruvat oksidasyonu aracılığı ile LDH, NAD⁺'ın NADH ve H⁺'a indirgenmesini katalizlemektedir. Reaksiyonun ikinci basamağında, diyaforaz, tetrazolyum tuzunun (INT) renkli bir bileşen olan formazana indirgenmesini katalizlemek amacıyla

yeni meydana gelen NADH ve H⁺'ı kullanmaktadır. Üretilen formazan miktarı, sitotoksitenin bir sonucu olarak kültür medyumuna salınan LDH miktarı ile orantılıdır. Ölü ya da plazma membranı hasara uğramış hücrelerin sayısının artışı kültür süpernatantında LDH aktivitesinin artışına neden olmaktadır [25]. LDH testleri için pozitif kontrol olarak mitomisin-C (10⁻⁷ M) kullanılmıştır.

2.6. Toplam antioksidan kapasite (TAK) analizi

Liken ekstraktlarının lenfositler üzerindeki TAK seviyelerini belirlemek amacıyla ticari TAK kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılmıştır. Kitin uygulamasında amaç, kullanılan örneklerin bir serbest radikal olan 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) bileşiğinin oluşumunu inhibe etmek suretiyle sahip oldukları antioksidan düzeylerini belirlemektir [26]. Kit uygulaması, vitamin E analogu olan ve Troloks eşdeğeri olarak adlandırılan kararlı bir antioksidan ile kalibre edilmektedir. TAK testleri için pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır.

2.7. Toplam oksidan durum (TOD) analizi

Liken ekstraktlarının lenfositler üzerindeki TOD düzeylerini belirlemek amacıyla ticari TOD kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılmıştır. Kit uygulamasında, örnekte mevcut olan oksidan maddeler, demir iyonu içeren kompleksleri demir iyonuna oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamı içinde bol miktarda mevcut olan güçlendirici moleküller ile sürdürülmektedir. Demir iyonları asidik ortamda kromojen ile renkli bir yapı meydana getirmektedir. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilişkilidir [27]. Kit uygulaması hidrojen peroksit (H₂O₂) ile kalibre edilmektedir. TOD testleri için pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanılmıştır.

2.8. Oksidatif DNA hasar analizi

Liken ekstraktlarının lenfositlerin DNA yapıları üzerinde oksidatif hasara neden olarak ortaya çıkardıkları 8-OH-dG seviyelerini belirlemek amacıyla ticari DNA/RNA oksidatif hasar kiti

(Cayman, ABD) kullanılmıştır. Kit uygulamasında amaç, sekonder metabolitlere maruz bırakılan hücrelerde, oksidasyona uğramış guanin bazı olan 8-OH-dG miktarının hesaplanması aracılığı ile hücrelerde oksidatif DNA hasarının belirlenmesidir [28]. 8-OH-dG testleri için pozitif kontrol olarak mitomisin-C (10^{-7} M) kullanılmıştır.

2.9. Verilerin analizi

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 21.0 istatistik veri paketi aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde post-hoc Duncan çoklu karşılaştırma testinden, değişkenler arasındaki ilişki seviyelerinin tespit edilmesinde ikili korelasyon analizinden ve medyan inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerlerinin hesaplanması amacıyla probit analizinden yararlanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. MTT analizi ile hücrelerde canlılık oranının test edilmesi

CME ve CSE'nin farklı konsantrasyonları (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) ile muamele edilen

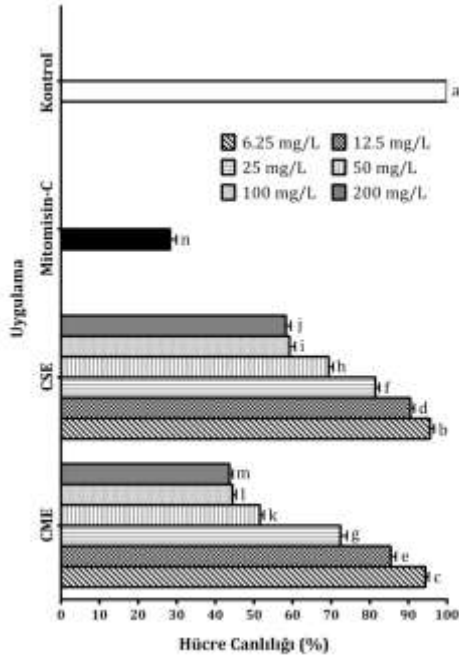
lenfositlerin canlılık oranları MTT analizi aracılığı ile tespit edilmiştir. Araştırma sonuçları göstermiştir ki test edilen tüm liken ekstrakt uygulamaları içerisinde hücre proliferasyonunu en fazla inhibe eden çözeltiler en yüksek konsantrasyonlu (200 mg/L) olanlardır. Elde edilen sonuçlara göre lenfositlerde canlılık oranını en fazla düşüren ekstraktın CME olduğu belirlenmiştir. CME'nin maksimum konsantrasyonuna (200 mg/L) maruz kalan lenfositlerde canlılık yüzdesi %43,68'e düşmüştür. CSE, maksimum konsantrasyonlu çözeltilerinde hücrelerin %58,28'i üzerinde letal etki göstermemiştir (Şekil 1).

Test edilen liken ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan lenfositler üzerinde, bu ekstraktların IC_{50} değerleri probit analizi aracılığı ile belirlenmiştir. Hücreler üzerinde sitotoksik etkileri test edilen ekstraktlar, IC_{50} değerleri baz alınarak kıyaslandığında sıralama CME < CSE şeklinde meydana gelmiştir. Hesaplanan IC_{50} değerlerinin istatistiksel açıdan ($p < 0,05$) birbirinden farklı olduğu da çalışma sonuçlarına yansımıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı liken ekstraktları ile muamele edilen lenfositler için tespit edilen IC_{50} değerleri (mg/L)

Ekstrakt	IC_{50} (Sınırlar)	Eğim ± Standart Hata (Sınırlar)	X^2
CME	90,49 ^a (78,49-106,28)	1,15 ± 0,06 (1,01-1,28)	30,85
CSE	221,14 ^b (174,87-297,01)	0,99 ± 0,07 (0,85-1,13)	13,28

Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.



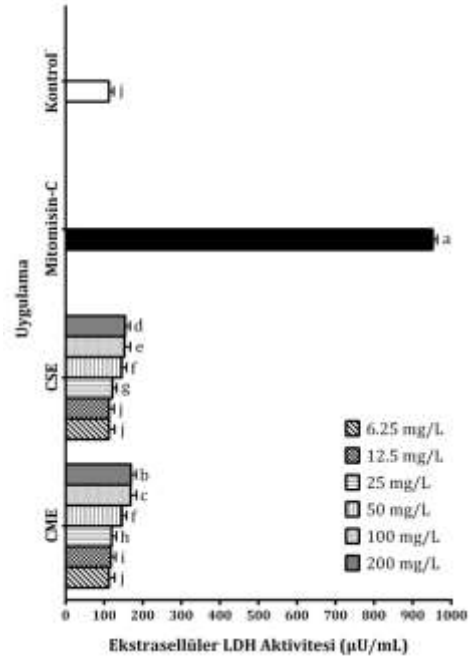
Şekil 1. *C. furcata*'nın farklı ekstraktları ile muamele edilen lenfositlerde MTT analizi sonucu elde edilen canlılık oranları (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

3.2. LDH salınımı analizi ile ekstraktların hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

CME ve CSE'nin farklı konsantrasyonlarının (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) lenfositler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla LDH salınım testinden yararlanılmıştır. Hücre kültürü medyumunda bulunan LDH miktarı hücre zarının bütünlüğü hakkında fikir vermektedir. Bu nedenle zarı hasara uğramış bir hücrenin medyumunda fazla oranda LDH enzimi bulunacağı göz önüne alınarak yapılan çalışmada, en yüksek konsantrasyona (200 mg/L) sahip ekstraktların en fazla LDH salınımına sebep olduğu görülmüştür (Şekil 2).

Hücre medyumlarında en fazla LDH konsantrasyonu (169,80 $\mu\text{U/mL}$), 200 mg/L konsantrasyona sahip CME uygulamasında tespit edilmiştir. CSE'nin 200 mg/L'lik konsantrasyonlu uygulaması yüksek konsantrasyonlar temel alındığında tüm uygulamalar içerisindeki en düşük LDH salınım seviyesine (154,44 $\mu\text{U/mL}$) neden olmuştur. Tüm uygulamalar göz önüne alındığında, her bir ekstraktın sebep olduğu LDH aktivitesinin

pozitif kontrol (mitomisin-C) değerine çok uzak olduğu görülmektedir. Ayrıca ortaya çıkan değerlerin pozitif kontrole kıyasla istatistiksel ($p < 0,05$) olarak farklı olduğu dikkat çekmektedir. CME ve CSE'nin en düşük konsantrasyonlu (6,25 mg/L) çözeltilerinin lenfositler üzerinde gösterdikleri LDH aktivitelerinin, negatif kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan ($p > 0,05$) bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *C. furcata*'nın farklı ekstraktları ile muamele edilen lenfositlerde gözlenen LDH salınım seviyesi (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

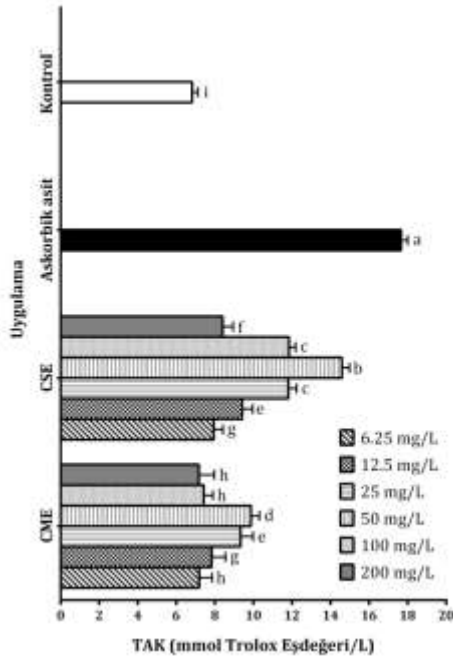
3.3. Ekstraktların *in vitro* koşullarda oluşturduğu TAK düzeylerinin belirlenmesi

CME ve CSE'nin farklı konsantrasyonları (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) ile muamele edilen lenfositlerdeki toplam antioksidan kapasite değişimlerini belirlemek amacıyla TAK analizinden yararlanılmıştır.

Ekstraktların hücreler üzerinde meydana getirdikleri TAK düzeylerine bakıldığında, dikkat çekici en yüksek oranların CSE'ye ait olduğu tespit edilmiştir. CSE'nin 50 mg/L konsantrasyonlu uygulamasının TAK düzeyi 14,59 mmol Troloks Eşdeğeri/L olarak tespit edilmiştir ki bu değer pozitif kontrol (askorbik asit) değerinden (17,66

mmol Troloks Eşdeğeri/L) sonra gelmektedir. CSE'nin 25 ve 100 mg/L'lik konsantrasyona sahip çözeltilerinin sırasıyla 11,81 ve 11,84 mmol Troloks Eşdeğeri/L değerleri yine denemenin en yüksek TAK seviyelerinden olmakla beraber istatistiki olarak ($p > 0,05$) birbirinden farklıdır (Şekil 3).

Konsantrasyonla TAK değerleri arasında bir korelasyonun gözlenmediği uygulamalarda, düşük ve yüksek konsantrasyonlu uygulamaların orta derecedeki konsantrasyonlara kıyasla daha düşük TAK değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Su ekstraktlarının metanol ekstraktlarına kıyasla daha yüksek derecede TAK seviyesine sahip oldukları ortaya çıkmıştır.

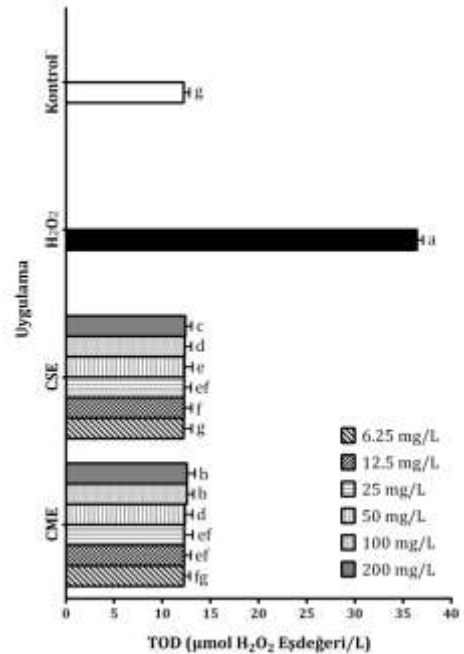


Şekil 3. Lenfositler üzerinde test edilen *C. furcata*'nın farklı ekstraktlarının oluşturduğu TAK düzeyleri (Ortalama \pm Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

3.4. Ekstraktların *in vitro* koşullarda oluşturduğu TOD düzeylerinin belirlenmesi

CME ve CSE'nin farklı konsantrasyonları (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) ile muamele edilen lenfositlerdeki toplam oksidan durum değişimlerini belirlemek amacıyla TOD analizinden yararlanılmıştır.

Ekstraktların lenfositler üzerindeki TOD düzeylerine bakıldığında, en yüksek konsantrasyona sahip çözeltilerinin en yüksek TOD düzeyine sahip oldukları tespit edilmiştir. CME ve CSE'nin 200 mg/L'lik konsantrasyonlu çözeltilerinin TOD düzeyleri sırasıyla 12,57 ve 12,39 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L olarak rapor edilmiştir (Şekil 4). Su ekstraktları ile gerçekleştirilen denemelerde TOD düzeylerinin metanol ekstraktı uygulamalarına kıyasla daha düşük olduğu dikkat çekmektedir. CME'nin 100 ve 200 mg/L uygulamalarının ortaya çıkardığı TOD değerlerinin birbirlerine kıyasla anlamlı olmadığı görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslama yapılmak suretiyle lenfositlerdeki oksidatif stres düzeylerinin değişimine yönelik tespitlerde, iki ekstrakt uygulamasının da 6,25 mg/L'lik konsantrasyonunun TOD düzeylerini istatistiksel olarak ($p > 0,05$) yükseltmediği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, pozitif kontrole kıyasla tüm uygulamaların istatistiksel açıdan farklı ve daha düşük değerlere sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4).



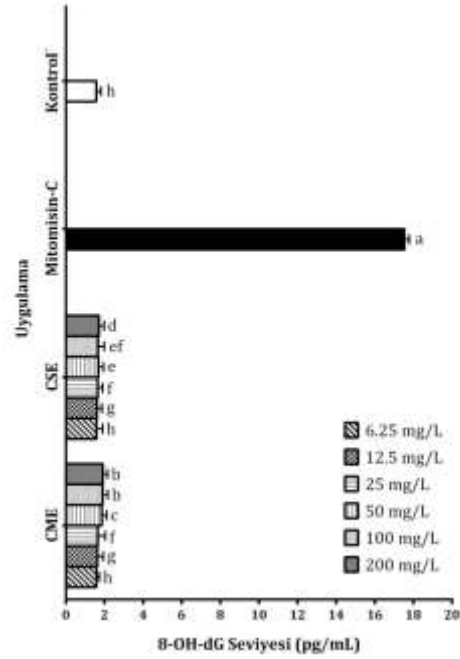
Şekil 4. Lenfositler üzerinde test edilen *C. furcata*'nın farklı ekstraktlarının oluşturduğu TOD düzeyleri (Ortalama \pm Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

3.5. Ekstraktların hücreler üzerinde sebep oldukları oksidatif DNA hasar düzeylerinin belirlenmesi

CME ve CSE'nin farklı konsantrasyonlarının (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) lenfositler üzerindeki oksidatif DNA hasar düzeylerini belirlemek amacıyla hücrelerde ortaya çıkan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) seviyeleri belirlenmiştir.

Ekstraktların lenfositler üzerindeki oksidatif DNA hasar etkileri incelendiğinde, CME'nin 100 ve 200 mg/L konsantrasyona sahip çözeltilerinin diğer tüm ekstrakt uygulamalarından farklı olarak yüksek derecede (sırasıyla 1,90 ve 1,92 pg/mL) DNA hasarı meydana getirdiği tespit edilmiştir. İstatistiki açıdan bakıldığında da bahsi geçen iki uygulamanın sahip olduğu değerlerin, diğer tüm uygulama değerlerinden $p < 0,05$ düzeyinde farklı olduğu göze çarpmaktadır. Bahsi geçen oksidatif DNA hasar düzeyleri pozitif kontrol değerine kıyasla çok düşük derecede kalmaktadır ve istatistiksel olarak da ($p < 0,05$) mitomisin-C'ye kıyasla farklı oldukları göze çarpmaktadır. Kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında, CME ve CSE'nin 6,25 mg/L'lik konsantrasyonlarının sebep oldukları 8-OH-dG seviyelerinin kontrol grubunun sebep olduğu 8-OH-dG seviyesinden istatistiksel olarak ($p > 0,05$) farklı olmadığı saptanmıştır (Şekil 5).

Genel olarak bakıldığında tüm ekstrakt uygulamaları için ortaya çıkan 8-OH-dG seviyelerinin birbirlerine çok yakın oldukları ve pozitif kontrol değerine kıyasla da çok uzakta kaldıkları için lenfositler üzerinde önemli derecede oksidatif DNA hasar meydana getirmedikleri çalışma sonuçlarına yansımıştır.



Şekil 5. *C. furcata*'nın farklı ekstraktları ile muamele edilen lenfositlerde gözlenen 8-OH-dG seviyesi (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

3.6. Lenfositler üzerinde gerçekleştirilen uygulamalar sonucunda değişkenler arasındaki korelasyon seviyelerinin belirlenmesi

CME ve CSE'nin farklı konsantrasyonlarının (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) lenfositler üzerindeki farklı uygulamaları sonucunda ortaya çıkan değerler baz alınarak, denemedeki tüm değişkenlerin her birinin birbirleri ile arasında bir korelasyon olup olmadığını, eğer varsa bu korelasyonun hangi seviyede olduğunu tespit etmek amacıyla tüm değişkenler üzerinde ikili korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Test edilen her ekstrakt için ayrı ayrı uygulanan korelasyon analizinde değişken olarak hücre canlılığı, konsantrasyon, LDH aktivite, oksidatif DNA hasarı, TAK ve TOD göz önüne alınmıştır (Çizelge 2 ve 3).

Gerçekleştirilen korelasyon analizleri incelendiğinde, tüm ekstrakt uygulamalarında *hücre canlılığı-konsantrasyon*, *hücre canlılığı-LDH aktivite* ve *hücre canlılığı-oksidatif DNA hasarı* ikili korelasyon analizlerinde değişkenler arasındaki Pearson korelasyon katsayısının $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Aynı şekilde *konsantrasyon-LDH aktivite* ve *konsantrasyon-oksidatif DNA hasarı* ikili korelasyon analiz sonuçlarına göre Pearson korelasyon katsayısı $\geq 0,80$ olduğundan dolayı ilgili değişkenler arasında yüksek derecede pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2 ve 3).

Hücreler üzerinde CME ve CSE uygulamaları sonucunda ortaya çıkan veriler *hücre canlılığı-*

TOD değişkenleri arasında yüksek derecede negatif korelasyon olduğunu göstermiştir (Pearson korelasyon katsayısı $\leq -0,85$). Ayrıca test edilen tüm ekstraktlar için *LDH aktivite-TOD* değişkenleri arasında Pearson korelasyon katsayısının $> 0,85$ olması, hücreler üzerindeki oksidatif stres düzeyinin LDH aktiviteden kaynaklanabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (Çizelge 2 ve 3).

Çizelge 2. Lenfositler üzerinde CME uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi.

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1 ^a					
Konsantrasyon	-0,80**	1				
LDH Aktivite	-0,95**	0,88**	1			
Oksidatif DNA Hasarı	-0,98**	0,82**	0,97**	1		
TAK	-0,10	-0,36	-0,20	0,01	1	
TOD	-0,87**	0,91**	0,97**	0,89**	-0,38	1

^a Pearson korelasyon katsayısı; ** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 3. Lenfositler üzerinde CSE uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi.

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1 ^a					
Konsantrasyon	-0,85**	1				
LDH Aktivite	-0,98**	0,83**	1			
Oksidatif DNA Hasarı	-0,90**	0,80**	0,88**	1		
TAK	-0,35	-0,15	0,36	0,39	1	
TOD	-0,89**	0,96**	0,87**	0,84**	-0,01	1

^a Pearson korelasyon katsayısı; ** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Deneme sonuçları ele alınarak gerçekleştirilen ikili korelasyon analizleri, farklı liken ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile muamele edilen lenfositlerde canlılık yüzdesinin tüm ekstrakt uygulamalarında konsantrasyon artışı ile orantılı bir şekilde azaldığını göstermiştir (Çizelge 2 ve 3). Çalışmamız sonuçlarına benzer şekilde, liken sekonder metabolitlerinden olivetorik ve fisodik asidin insan amniyon fibroblastları üzerinde

konsantrasyona bağlı sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir [29]. Aynı şekilde Bucar ve arkadaşları [30] insan trombositlerinde 12(S)-HETE üretimi üzerine lobarik, (+)-protolikesterinik ve (+)-usnik asit gibi liken bileşenlerinin inhibisyon aktivitelerinin konsantrasyon ile pozitif korelasyon ortaya koyduğunu tespit etmişlerdir.

Hesaplanan IC₅₀ değerleri, hücreler üzerinde proliferasyonu inhibe edici ekstrakt

konsantrasyonları hakkında fikir vermiştir (Çizelge 1). Düşük IC₅₀ değerine (90,49 mg/L) sahip olan CME lenfositler üzerinde CSE'ye kıyasla daha yüksek sitotoksik etki gösteren uygulamadır. Farklı liken metabolitlerinin yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterebildikleri çeşitli çalışma sonuçlarına yansımıştır. Liken bileşenlerinden psoromik asidin farklı bakteri türleri [31], karaciğer paraziti [32] ve bazı kanserli hücrelerde [33] konsantrasyona bağlı olarak gelişimi inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Mevcut çalışmada, sitotoksik etkiye sebep olabilecek aktiviteler incelendiğinde LDH ve TOD faktörleri dikkat çekmektedir. *Hücre canlılığı-TOD* ve *hücre canlılığı-LDH* arasındaki korelasyon katsayıları $\leq -0,85$ olarak ölçülmüştür (Çizelge 2 ve 3). Bununla birlikte CME ve CSE'nin yüksek konsantrasyonlu uygulamalarının pozitif kontrol ile kıyaslaması gerçekleştirildiğinde MTT testine kıyasla daha düşük LDH seviyelerini ortaya çıkarması, ilgili denemelerin hücrelerdeki LDH stabilitesini yüksek oranda etkileyemediğini ortaya çıkarmıştır [34]. Farklı liken ürünleri tarafından oluşturulan oksidatif stres kaynaklı sitotoksosite birçok bilim insanı tarafından araştırılmıştır. *Bryoria capillaris*, *Peltigera rufescens* [35] ve *Xanthoria elegans* [36] gibi liken türleri ile lenfositler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda adı geçen liken ekstraktlarının hücreler üzerinde meydana getirdikleri toksik etkinin oksidatif stres kaynaklı olduğu saptanmıştır. CSE ve CME'den kaynaklanan sitotoksik etkiye de oksidatif stresin sebep olabileceği fikri analiz sonuçlarına yansımıştır (Çizelge 2 ve 3). Test edilen ekstraktlar hücrelerdeki TOD ve LDH seviyelerini yükseltmelerine rağmen bu oran yüksek konsantrasyonlarda göze çarpmaktadır. Gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre, her bir ekstraktın en düşük konsantrasyonlarının TOD ve LDH oranlarının negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel farklılık ($p > 0,05$) içermediği gözlenmiştir. Bu sonuç test edilen liken ekstraktlarının ki özellikle su ekstraktının belli konsantrasyonlarının (6,25, 12,5 mg/L) lenfositler üzerinde anlamlı derecede toksisiteye sebep olmadıklarını ortaya çıkarmıştır (Şekil 2 ve 4). Mevcut çalışma sonuçlarını destekler nitelikte bir

diğer deneme primer sıçan serebral korteks ve U87MG glioblastoma hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar test edilen saf liken metabolitlerinin (fisodik, olivetorik ve psoromik asit) belli konsantrasyonlarının negatif kontrol grubuna kıyasla hücrelerdeki TOD düzeyini anlamlı derecede etkilediği rapor edilmiştir [37].

Ekstraktların hücrelerde genetik hasar meydana getirme kapasiteleri göz önüne alındığında, hücrelerde oluşan 8-OH-dG seviyesi temel alınmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar, ekstraktların her bir konsantrasyonunun birbirine çok yakın değerlere sahip olduklarını ve pozitif kontrol tarafından sebep olunan hasara kıyasla çok düşük kaldıklarını gözler önüne sermiştir. Genel olarak bakıldığında, en düşük konsantrasyonun istatistiksel olarak 8-OH-dG seviyesini yükseltmediği görülmüştür (Şekil 5). Birçok liken türünün genotoksik ve genotoksik olmayan aktiviteleri üzerine farklı araştırmalar literatürde mevcuttur. *Usnea articulata* ve *Usnea filitendula* likenlerinin mutajenik ajan olan N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidine karşı anti-genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [38]. *Evernia prunastri*'nin metanol ekstraktı ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, aflatoksinin sebep olduğu genotoksik aktivitenin indirgeniği ortaya çıkarılmıştır [39].

CME ve CSE'nin lenfositlerin TAK düzeyleri üzerindeki etkileri incelendiğinde belli konsantrasyonlar ön plana çıkmıştır. Konsantrasyon ve TAK değerleri arasında anlamlı korelasyonlar tespit edilememiştir (Çizelge 2 ve 3). Özellikle test edilen orta seviyedeki konsantrasyonların yüksek TAK seviyeleri önem arz etmiştir. En fazla dikkat çeken değer CSE'nin 50 mg/L'lik uygulaması olmuştur. İlgili değer pozitif kontrole en yakın seviyeye sahip olmuştur. Aynı şekilde CSE'nin 25 ve 100 mg/L'lik uygulamaları da tüm denemenin yüksek TAK değerleri arasında yerini almıştır. Bu sonuçlar su ekstraktının metanole kıyasla daha yüksek antioksidan içeriğe sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 3). Birçok farklı liken sekonder metaboliti ve ekstraktın sahip oldukları antioksidan kapasiteden

dolayı koruyucu özellikte oldukları, bu özelliğinin yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında toksik etki gösterebildikleri araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda görülmüştür. Psoromik asidin 0,005-0,2 mg/mL arasında konsantrasyona sahip çözeltilerinin, konsantrasyon artışı ile orantılı bir şekilde serbest ve nitrik oksit radikallerini yakalama aktivitelerinin ve lipid peroksidasyon inhibisyon düzeyinin yükseldiği tespit edilmiştir. Bu sayede antioksidan kapasitesinin varlığı tespit edilen metabolitin kardiyovasküler koruyucu aktivitesi de aynı çalışmanın sonuçları içerisinde yer almıştır [40]. Psoromik asidin koruyucu özelliğine dair başka bir çalışma fareler aracılığı ile gerçekleştirilmiş ve bu metabolitin mide koruyucu etkisi belirlenmiştir [41]. Mevcut çalışma ve literatürdeki diğer çalışmalar test edilen liken ekstraktları ve metabolitlerinin taşıdıkları antioksidan özelliklerinden dolayı hücrelerdeki koruyucu özelliklerini gözler önüne sermiştir.

Sonuç olarak, çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm denemeler göstermiştir ki *C. furcata* likeninden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının belli konsantrasyonları, yapısında barındırdıkları antioksidan bileşenler sayesinde insan lenfositleri üzerinde toplam antioksidan kapasiteyi artırmaktadır. Elde edilen sonuçlar, yüksek oranda antioksidatif kapasiteye sahip olan *C. furcata*'nın oksidatif stres kaynaklı hastalık türlerine karşı kombine tedavi metotları kapsamında yararlanılabilecek bir bitkisel ürün olduğunu ortaya çıkarmıştır.

5. TEŞEKKÜR

Bu çalışma Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 07-M-16 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

[1] Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal

plant extracts. *Molecules*, 14 (2009) 2167-2180.

- [2] Zamir R, Khalil SA, Shah ST, Ahmad N. Antioxidant activity influenced by *in vivo* and *in vitro* mutagenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *African J. Biotechnol.*, 11 (2012) 11686-11692.
- [3] Paper O. Cadmium-induced response of protein profile and antioxidant enzymes in aquatic macrophytes *Myriophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum*. *J. Environ. Stud.*, 7 (2011) 7: 17-23.
- [4] Efdi M, Itoh T, Akao Y, Nozawa Y, Koketsu M, Ishihara H. The isolation of secondary metabolites and *in vitro* potent anti-cancer activity of clerodermic acid from *Enicosanthum membranifolium*. *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (2007) 3667-3671.
- [5] Efferth T, Herrmann F, Tahrani A, Wink M. Cytotoxic activity of secondary metabolites derived from *Artemisia annua* L. towards cancer cells in comparison to its designated active constituent artemisinin. *Phytomedicine*, 18 (2011) 959-969.
- [6] Markiewicz-Żukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complement. Altern. Med.*, 13 (2013) 50.
- [7] Khan RS, Senthil M, Rao PC, Basha A, Alvala M, Tummuri D, Masubuti H, Fujimoto Y, Begum AS. Cytotoxic constituents of *Abutilon indicum* leaves against U87MG human glioblastoma cells. *Nat. Prod. Res.*, 29 (2015) 1069-1073.
- [8] Nash TH. *Lichen Biology*. New York: Cambridge University Press 2008; 486.
- [9] Öztürk A, Aslan A. Likenlerin ekonomik özellikleri ve Kuzeydoğu Anadolu'dan bazı liken türleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edeb. Fakültesi Fen Bilim. Derg.*, 2 (1991) 27-42.
- [10] Ari F, Ulukaya E, Oran S, Celikler S, Ozturk S, Ozel MZ. Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. *Cytotechnology*, 67

- (2015) 531-543.
- [11] Singh N, Nambiar D, Kale RK, Singh RP. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutr. Cancer*, 65 (2013) 36-43.
- [12] O'Neill MA, Mayer MM, Murray KE, Rolim-Santos HML, Santos-Magalhães NS, Thompson AM, Appleyard VCL. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? *Brazilian J. Biol.*, 70 (2010) 659-664.
- [13] Yildirim E, Emsen B, Aslan A, Bulak Y, Ercisli S. Insecticidal activity of lichens against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control*, 22 (2012) 151-156.
- [14] Emsen B, Bulak Y, Yildirim E, Aslan A, Ercisli S. Activities of two major lichen compounds, diffractaic acid and usnic acid against *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control*, 22 (2012) 5-10.
- [15] Emsen B, Aslan A, Yildirim E, Ercisli S. Toxicity effects of some lichen species extracts against the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control*, 23 (2013) 193-199.
- [16] Grujić D, Stošić I, Kosanić M, Stanojković T, Ranković B, Milošević-Djordjević O. Evaluation of *in vitro* antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology*, 66 (2014) 803-813.
- [17] Yücel O, Odabaşoğlu F, Güllüce M, Çalik ZZ, Çakir A, Aslan A, Yazici K, Halici M. Antioxidant and antimicrobial properties of a lichen species, *Cladonia rangiformis* growing in Turkey. *Turkish J. Pharm. Sci.*, 4 (2007) 101-109.
- [18] Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86 (1999) 559-570.
- [19] Kirmizigül S, Koz O, Boke N. Constituents of apolar extracts including essential fatty acids of some Turkish lichens. *Chem. Nat. Compd.*, 43 (2007) 462-464.
- [20] Agar G, Gulluce M, Aslan A, Bozari S, Karadayi M, Orhan F. Mutation preventive and antigenotoxic potential of methanol extracts of two natural lichen. *J. Med. Plants Res.*, 4 (2010) 2132-2137.
- [21] Einarsdóttir E, Groeneweg J, Björnsdóttir GG, Harethardottir G, Omarsdóttir S, Ingólfssdóttir K, Ogmundsdóttir HM. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med.*, 76 (2010) 969-974.
- [22] Wirth V. Die Flechten Baden Württembergs. Württembergs, vol. 1-2. Stuttgart: Ulmer 1995; 1006.
- [23] Purvis OW, Coppins BJ, Hawksworth DL, James PW, Moore DM. The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. London: Natural History Museum Publications in Association with the British Lichen Society 1992; 710.
- [24] Berridge M V, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11 (2005) 127-152.
- [25] Haslam G, Wyatt D, Kitos PA. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology*, 32 (2000) 63-75.
- [26] Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.*, 37 (2004) 277-285.
- [27] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.*, 38 (2005) 1103-1111.
- [28] Gan W, Nie B, Shi F, Xu XM, Qian JC, Takagi Y, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP. Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 52 (2012) 1700-1707.
- [29] Emsen B, Turkez H, Togar B, Aslan A. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of olivetoric and physodic acid in cultured human amnion fibroblasts. *Hum. Exp. Toxicol.*, 36 (2017) 376-385.

- [30] Bucar F, Schneider I, Ögmundsdóttir H, Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine*, 11 (2004) 602-606.
- [31] Celenza G, Segatore B, Setacci D, Perilli M, Brisdelli F, Bellio P, Piovano M, Garbarino JA, Amicosante G, Nicoletti M. Antibacterial activity of selected metabolites from Chilean lichen species against methicillin-resistant staphylococci. *Nat. Prod. Res.*, 27 (2013) 1528-1531.
- [32] Lauinger IL, Vivas L, Perozzo R, Stairiker C, Tarun A, Zloh M, Zhang X, Xu H, Tonge PJ, Franzblau SG, Pham DH, Esguerra C V., Crawford AD, Maes L, Tasdemir D. Potential of lichen secondary metabolites against Plasmodium liver stage parasites with FAS-II as the potential target. *J. Nat. Prod.*, 76 (2013) 1064-1070.
- [33] Brandao LFG, Alcantara GB, Matos MDFC, Bogo D, Freitas DDS, Oyama NM, Honda NK. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 61 (2013) 176-183.
- [34] Tokur O, Aksoy A. *In vitro* sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, 6 (2017) 112-118.
- [35] Aydin E, Turkez H. Effects of lichenic extracts (*Bryoria capillaris*, *Peltigera rufescens* and *Xanthoria elegans*) on human blood cells: A cytogenetic and biochemical study. *Fresenius Environ. Bull.*, 20 (2011) 2992-2998.
- [36] Turkez H, Aydin E, Aslan A. *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology*, 64 (2012) 679-686.
- [37] Emsen B, Aslan A, Togar B, Turkez H. *In vitro* antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. *Pharm. Biol.*, 54 (2016) 1748-1762.
- [38] Ceker S, Orhan F, Kizil HE, Alpsoy L, Gulluce M, Aslan A, Agar G. Genotoxic and antigenotoxic potentials of two *Usnea* species. *Toxicol. Ind. Health*, 32 (2015) 990-999.
- [39] Alpsoy L, Orhan F, Nardemir G, Agar G, Gulluce M, Aslan A. Antigenotoxic potencies of a lichen species, *Evernia prunastri*. *Toxicol. Ind. Health*, 31 (2015) 153-161.
- [40] Behera BC, Mahadik N, Morey M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharm. Biol.*, 50 (2012) 968-979.
- [41] Sepulveda B, Chamy MC, Piovano M, Areche C. Lichens: Might be considered as a source of gastroprotective molecules? *J. Chil. Chem. Soc.*, 58 (2013) 1750-1752.