

***Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb.'nın İnsan Lenfositleri Üzerindeki Biyolojik Aktiviteleri**

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

¹Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 70100, Karaman

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, 65080, Van

(Alınış / Received: 15.07.2017, Kabul / Accepted: 16.10.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 22.11.2017)

Anahtar Kelimeler

Antioksidan,
Genotoksisite,
Oksidatif stres,
Sitotoksisite

Özet: Likenler yapısında farklı metabolitleri bulunduran ve bu bileşenleri sayesinde antik çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde yararlanılan organizma olarak dikkat çekmektedir. Bu yüzden, mevcut çalışma önemli liken türlerinden biri olan *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb.'nın insan lenfositleri üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlamıştır. *P. glauca*'dan elde edilen metanol (PME) ve su (PSE) ekstraktlarının hücreler üzerindeki sitotoksik aktiviteleri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür ve laktat dehidrogenaz testleri ile analiz edilmiştir. PME ve PSE ile muamele edilen lenfositlerdeki oksidatif değişimin belirlenmesi amacıyla toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamalara ek olarak, ekstraktların hücreler üzerinde sebep olduğu genetik hasar hücrelerdeki 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin seviyeleri ölçülerek tespit edilmiştir. Hesaplanan IC₅₀ değerleri, PSE'nin (162,26 mg/L) PME'ye (84,02 mg/L) kıyasla çok daha düşük seviyede sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Her iki ekstraktın tüm konsantrasyonlarının (6,25-200 mg/L) negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak ($p>0,05$) hücrelerdeki TAK'yi yükselttiği ve aynı zamanda düşük konsantrasyonlarının genetik hasar meydana getirmede belirginleşmiştir. Tüm uygulamalar göz önüne alındığında, PME ve özellikle PSE'nin belli konsantrasyonlarının (<25 mg/L) lenfositler üzerinde anlamlı derecede oksidatif ve genetik hasara neden olmadan TAK'yi yükselttiği ve bu nedenle *P. glauca* likeninin doğal bir antioksidan olarak kullanılabileceği gözlenmiştir.

Biological Activities of *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb. on Human Lymphocytes

Keywords

Antioxidant,
Genotoxicity,
Oxidative stress,
Cytotoxicity

Abstract: Lichens are distinguished as organisms that have different metabolites in their structures and benefited in the treatment of many diseases due to their constituents since antiquity. Therefore, the present study aimed to examine the effects of one of the important lichen species, *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb. on human lymphocytes. The cytotoxic activities of methanol (PME) and water (PSE) extracts obtained from *P. glauca* on the cells were analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and lactate dehydrogenase assays. Total antioxidant capacity (TAK) and total oxidative status (TOD) analyzes were performed to determine the oxidative change in lymphocytes treated with PME and PSE. In addition to these assays, genetic damage caused by extracts on cells was determined by measuring levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cells. Calculated IC₅₀ values revealed that PSE (162,26 mg/L) showed much lower levels of cytotoxic activity than PME (84,02 mg/L). It was determined that all concentrations (6,25-200 mg/L) of both extracts increased TAK in cells statistically ($p>0,05$) compared to negative control and at the same time low concentrations did not cause genetic damage. Considering all applications, it was observed that certain concentrations (<25 mg/L) of PME and especially PSE increased TAC without significant oxidative and genetic damage on lymphocytes and thus, *P. glauca* lichen can be used as a natural antioxidant.

1. Giriş

Hücreler ve organellerimizde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar yaşamımızı sürdürmemize sebep olan önemli faktörlerdir. Bu aktivitelerin oluşum sürecinde ortaya çıkan bazı ürünler vücudumuzda kronik hastalıklara sebep olabilmektedir [1]. Farklı moleküllerle gerçekleşen kimyasal reaksiyonlara karşı oldukça kararsız ve aktif eşlenmemiş elektronlara sahip serbest radikaller biyokimyasal süreçte başı çeken ürünlerdir. Temel olarak reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve reaktif kükürt türleri (RSS) olarak üç başlık altında incelenirler [2]. Metabolizmanın normal bir parçası olarak meydana gelen serbest radikaller sigara, pestisit, radyasyon, ilaç, çevre kirleticileri ve ozon gibi dış faktörlerin uyarımı nedeniyle gereğinden fazla üretilebilmektedir. Antioksidanlar tarafından ROS'nin üretilmesi ve nötralize edilmesi arasındaki denge çok hassastır ve eğer bu denge ROS'nin aşırı üretimi kısmına kayıyorsa, hücreler oksidatif stresin sonuçlarına maruz kalmaya başlamaktadır [3]. Kanseri, kardiyovasküler, diyabet, ateroskleroz, yaşla ilişkili immün yetmezlik, yaşlılık bunaması, katarakt ve hipertansiyon gibi ciddi hastalıkların oluşmasında oksidatif stres önemli rol oynamaktadır [4-6]. Vücudu oksidatif stres kaynaklı hasardan korumak için, serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi önemlidir. ROS'nin zararlı etkileri, sentetik antioksidanlar veya gıda ile alınan doğal antioksidanlar sayesinde dengelenmektedir [7]. Doğal antioksidanlar ile karşılaştırılmak suretiyle standart bir antioksidan aktivite ölçüm sistemine sahip olmak için sentetik antioksidanlar geliştirilmiştir. Bugün, işlenmiş gıdaların çoğu sentetik antioksidan içermektedir fakat yapılan birçok bilimsel çalışma bu antioksidanların oldukça kararlı ve ucuz olmasına rağmen potansiyel yan etkilerinin ihmal edilemeyecek düzeyde olduğunu göstermektedir [8]. Bu nedenle, son yıllarda gıda ve tıp sektöründe doğal bitkisel antioksidanlar üzerine yoğun bir ilgi artışı gözlenmektedir. Doğal olarak meydana gelen birçok antioksidan bitkiler tarafından üretilmektedir. Antioksidan bileşik gurubu olan flavonoidler en çok yararlanılan bitkisel ürünlerden biridir. Fenolik asitler, karotenoidler ve vitaminler de diğer önemli doğal antioksidan maddelerden bazılarıdır [9].

Likenler, mantar ve alglerin simbiyotik birlikteliğinden meydana gelen ve yapılarında benzersiz bileşikler bulunduran organizmalardır. Liken bileşikleri içerisinde çok sayıda doğal antioksidan maddeler mevcuttur. Şeker alkoller, monosiklik aromatik bileşikler, kinonlar, alifatik asitler, ksantonlar ve terpenoidler önemli liken ürünlerinden bazılarıdır [10,11]. Likenler, taşıdıkları ve yalnızca kendilerine has olan saf bileşenleri sayesinde farklı birçok alanda kullanılmışlardır. Antimikrobiyal [12] antiviral [13], antienflamatuvar [14], antioksidan [15], immünolojik [16],

antigenotoksik ve antimitojenik [17] gibi birçok aktivite likenler tarafından sergilenmiştir. Daha spesifik bakıldığında, likenlerin tüberküloz [18], hemoroit ve dizanteri [19] hastalıklarında tedavi amaçlı, prostat [20] ve bağırsak [21] gibi organlarda ise apoptozu indükleyici olarak kullanıldıkları rapor edilmiştir. Aynı şekilde birçok liken türünün farklı organlar üzerindeki antikanser etkileri de çalışmalara yansımıştır [22-24]. Gerçekleştirilen tüm bu çalışmalar, likenlerin alternatif tedavi kapsamında temel metotlara destek amaçlı yararlanılabilecek bir organizma olduğunu gözler önüne sermiştir. Bununla birlikte, literatür çalışmaları incelendiğinde *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb. likeninin insan lenfositleri üzerindeki farklı aktivitelerinin değerlendirilmediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, mevcut çalışma önemli liken türlerinden biri olan *P. glauca*'nın insan lenfositleri üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlamıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Liken örnekleri

Çalışmada kullanılan *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb. liken türü Erzurum, Oltu, İnci Köyü, Masirik Mevkii (40°35'K-41°49'D) istasyonundan toplanarak oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra herbaryumları yapılarak çeşitli flora kitaplarından [25,26] faydalanmak suretiyle teşhisleri yapılmıştır. Herbaryum örnekleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumunda muhafaza edilmektedir.

2.2. Ekstraksiyon

Liken örnekleri toz haline getirildikten sonra Soxhlet ekstraktöründe ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. 30 g liken örneği kullanılmıştır. Metanol ve su çözücülerinde ekstrakte edilen liken örnekleri, ekstraksiyon işleminin ardından adi süzgeç kağıdında süzülüş ve elde edilen süzüntüler döner buharlaştırıcı ile yoğunlaştırılmıştır. *P. glauca*'nın metanol ekstraksiyonu (PME) sonucunda 1,8 g, su ekstraksiyonu (PSE) sonucunda 2,4 g ham ekstrakt elde edilmiştir. Denemelerde kullanılan ekstraktlar %2 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) çözücüsünde çözündürülmüş ve negatif kontrol (kontrol-) olarak %2 DMSO kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan PME ve PSE'nin farklı konsantrasyonları (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L), gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda ortaya çıkan medyan inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri (Tablo 1) temel alınmak suretiyle belirlenmiştir.

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 [27]. MTT testleri için pozitif kontrol olarak mitomisin-C kullanılmıştır.

2.5. Laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı analizi

Liken ekstraktlarının lenfositler üzerindeki sitotoksik etki göstererek ortaya çıkardıkları LDH salınım seviyelerini belirlemek amacıyla ticari LDH sitotoksitesite kiti (Cayman, ABD) kullanılmıştır. 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. Ölü ya da plazma membranı hasara uğramış hücrelerin sayısının artışı kültür süpernatantında LDH aktivitesinin artışına neden olmaktadır. LDH testinin denemelerde kullanılmasının temel sebebi hücrelerin nekroz sonucu hasar görüp görmediklerinin tespit edilmesidir [28]. Ayrıca gerçekleştirilen MTT analizlerini destek amacı ile de LDH testi tercih edilmiştir. LDH testleri için pozitif kontrol olarak mitomisin-C 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 [29]. 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 [30]. 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, ekstraktlara maruz bırakılan hücrelerde, oksidasyona uğramış guanin bazı olan 8-OH-dG miktarının hesaplanması aracılığı ile hücrelerde oksidatif DNA hasarının belirlenmesidir [31]. 8-OH-dG testleri için pozitif kontrol olarak mitomisin-C 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 IC₅₀ değerlerinin hesaplanması amacıyla probit analizinden yararlanılmıştır.

3. Bulgular

3.1. MTT analizi ile hücrelerde canlılık oranının test edilmesi

PME ve PSE'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. Sonuçlar incelendiğinde, her iki ekstrakt için de konsantrasyona bağlı sitotoksitesite belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyonlar temel alındığında, PME'nin 200 mg/L'lik konsantrasyonunun hücrelerin %41,51'i üzerinde toksik etki göstermediği ve ekstrakt denemeleri içerisinde en yüksek sitotoksitesiteye bu uygulamanın sebep olduğu görülmüştür (Şekil 1).

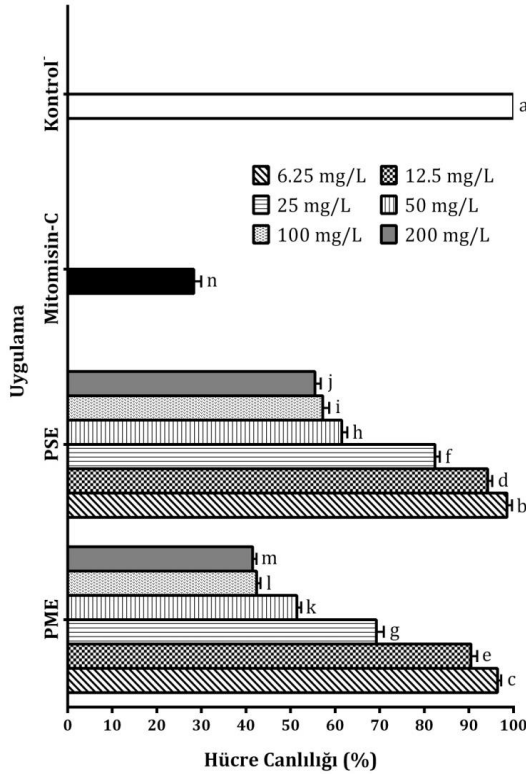
PME ve PSE için hesaplanan IC₅₀ değerleri, sitotoksik açıdan daha etkili olan ekstrakt türünü ortaya çıkarmıştır. IC₅₀ değerleri baz alınarak gerekli kıyaslama gerçekleştirildiğinde PME<PSE şeklindeki sıralama dikkat çekmiştir. Bu veriye göre, PME'nin lenfositler üzerinde daha yüksek seviyede sitotoksitesiteye sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca

hesaplanan IC₅₀ değerlerinin istatistiksel açıdan ($p<0,05$) birbirinden farklı olduğu da çalışma sonuçlarına yansımıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı liken ekstraktları ile muamele edilen lenfositler için tespit edilen IC₅₀ değerleri (mg/L)

Ekstrakt	IC ₅₀ (Sınırlar)	Eğim ± Standart Hata (Sınırlar)
PME	84,02 ^a (74,23-96,36)	1,30 ± 0,07 (1,16-1,44)
PSE	162,26 ^b (136,86-198,81)	1,22 ± 0,08 (1,07-1,37)

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

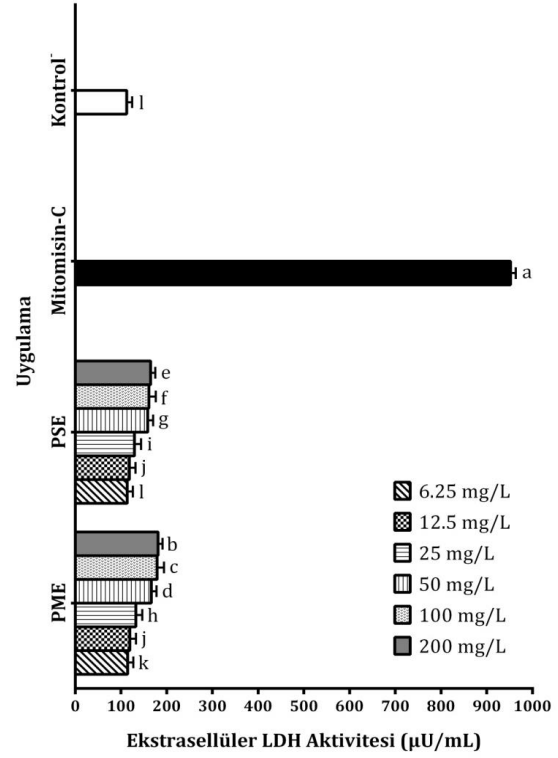


Şekil 1. *P. glauca*'nın farklı ekstraktları ile muamele edilen lenfositlerde MTT analizi sonucu elde edilen canlılık oranları (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

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

PME ve PSE'nin farklı konsantrasyonlarının (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) lenfositler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla LDH salınım testinden yararlanılmıştır. 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. Hücre medyumlarında en fazla LDH konsantrasyonu (181,04 μ U/mL), 200 mg/L konsantrasyona sahip PME uygulamasında tespit edilmiştir. Ayrıca hücreler üzerinde, PME'nin 100 mg/L'lik konsantrasyonunun diğer ekstrakt

uygulamalarına kıyasla daha yüksek oranda LDH salınımına (179,28 μ U/mL) sebep olduğu dikkat çekmektedir. PSE'nin en düşük konsantrasyonlu denemesinin sebep olduğu LDH seviyesinin istatistikî olarak ($p>0,05$) kontrol'den farklı olmadığı görülmüştür. Aynı zamanda, tüm ekstrakt uygulamalarının sebep olduğu LDH aktivitelerinin pozitif kontrol (mitomisin-c) değerine çok uzak olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. *P. glauca*'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

PME ve PSE'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.

Sekil 3'te verilen, ekstraktların hücreler üzerinde meydana getirdikleri TAK düzeylerine bakıldığında, dalgalı bir görünüm dikkat çekmektedir. Yani konsantrasyon ve TAK seviyesi arasında bir korelasyon belirlenmemiştir. Özellikle PSE'nin 25 ve 50 mg/L'lik konsantrasyonlarının pozitif kontrol değerinden sonraki en yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla 8,91 ve 9,04 mmol Troloks Eşdeğeri/L). Aynı şekilde, PME'nin de yüksek ve düşük konsantrasyonlu uygulamaları daha düşük seviyede TAK değeri göstermiştir. Bu verilere ek olarak, tüm ekstrakt uygulamalarının kontrol'ye kıyasla istatistikî açıdan ($p<0,05$) hücrelerdeki TAK'yi yükselttiği çalışma sonuçlarına yansımıştır.

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

PME ve PSE'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 üzerinde sebep oldukları oksidatif stres düzeyi incelendiğinde, konsantrasyona bağlı bir artış göze çarpmaktadır. PME ve PSE'nin 200 mg/L'lik konsantrasyonlu uygulamaları ile muamele edilen hücrelerdeki TOD düzeyleri sırasıyla 13,91 ve 13,15 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L olarak rapor edilmiştir. PME ve PSE'nin 100 ve 200 mg/L uygulamalarının ortaya çıkardığı TOD değerlerinin istatistiksel olarak ($p>0,05$) birbirinden farksız olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında, PME ve PSE'nin her ikisinin de 6,25 ve 12,5 mg/L'lik konsantrasyonlarının hücrelerdeki TOD seviyelerini istatistiksel olarak ($p>0,05$) yükseltmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, pozitif kontrole kıyasla tüm uygulamaların istatistiksel açıdan farklı ve daha düşük değerlere sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4).

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

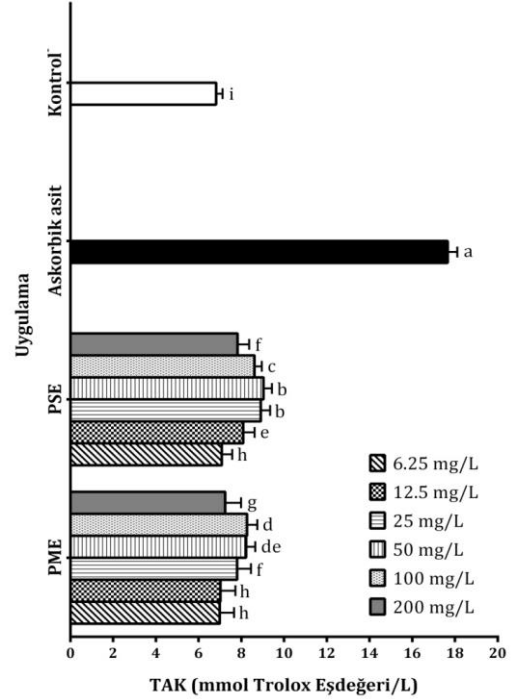
PME ve PSE'nin farklı konsantrasyonlarının (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) lenfositler üzerindeki oksidatif DNA hasar düzeylerini belirlemek amacıyla hücrelerde ortaya çıkan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) seviyeleri belirlenmiştir.

PME ve PSE'nin hücreler üzerinde sebep oldukları oksidatif DNA hasar düzeyleri incelendiğinde, tüm uygulamaların birbirine çok yakın verilere sahip olduğu görülmekle beraber ekstrakt uygulamaları içerisindeki en yüksek değer istatistikî olarak ($p > 0,05$) birbirinden farksız olan PME'nin 100 ve 200 mg/L'lik konsantrasyonlarına aittir. Diğer taraftan, en düşük 8-OH-dG seviyesine sahip olan uygulamalar PME'nin 6,25 ve 12,5 mg/L'lik çözeltileri (sırasıyla 1,58 ve 1,59 pg/mL) olmuştur ki söz konusu değerler istatistikî açıdan ($p>0,05$) kontrol'den farksızdır (Şekil 5). Tüm ekstrakt uygulamalarının lenfositler üzerinde meydana getirdiği oksidatif DNA hasar düzeyleri incelendiğinde, verilerin pozitif kontrol değerine kıyasla çok uzakta kaldığı ve bundan dolayı önemli derecede oksidatif DNA hasarı meydana getirmedikleri çalışma sonuçlarına yansımıştır.

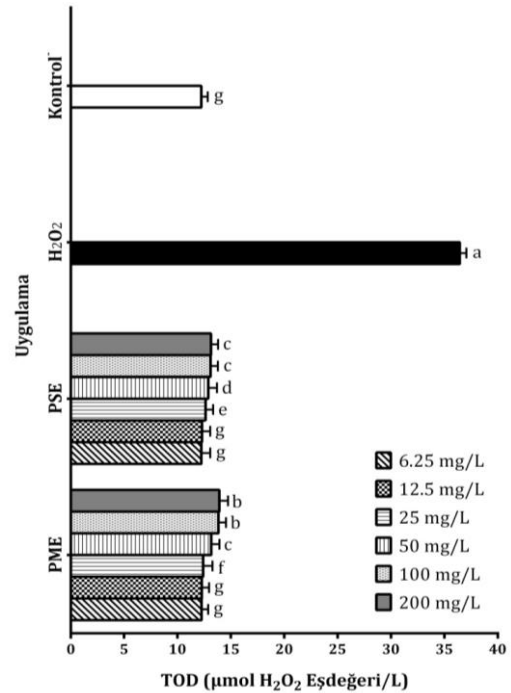
3.6. Lenfositler üzerinde gerçekleştirilen uygulamalar sonucunda değişkenler arasındaki korelasyon seviyelerinin belirlenmesi

PME ve PSE'nin lenfositler üzerindeki aktiviteleri göz önüne alınarak gerçekleştirilen ikili korelasyon analizleri sonucunda *hücre canlılığı-konsantrasyon*,

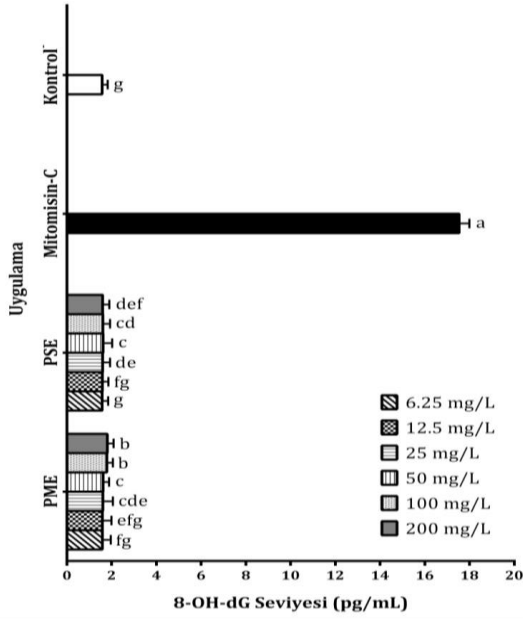
hücre canlılığı-LDH aktivite ve *hücre canlılığı-TOD* değişkenleri arasında 0,01 seviyesinde negatif korelasyonlar tespit edilmiştir. Ayrıca test edilen tüm ekstraktlar için *LDH aktivite-TOD* değişkenleri arasında Pearson korelasyon katsayısının $>0,90$ olması, hücreler üzerindeki oksidatif stres düzeyinin LDH aktiviteden kaynaklanabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (Tablo 2 ve 3).



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



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



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

4. Tartışma ve Sonuç

Doğal antioksidan olarak adlandırılan, bitkilerin yapılarında barındırdığı antioksidan bileşenler aracılığı ile yıllardır sayısız bilimsel çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara konu olan bitkisel ürünler geliştirilen yeni ilaçlar için güvenilir kaynak olarak görülmüştür. Gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda aktif fitokimyasallar ve çeşitli bitkisel ilaçların faaliyetlerinden sorumlu mekanizmalar tanımlanmış, bu sayede belli hastalıklar üzerinde özel bitkisel ürünlerin kullanımı teşvik edilmiştir [32]. Bazı bitkilerin yapılarında bulunan antioksidan bileşenlerin, genellikle diyabetli hastalarda görülen kan basıncını düşürdüğü veya renal ve kardiyovasküler fonksiyonları iyileştirdiği tespit edilmiştir [33]. Aynı şekilde oksidatif strese bağlı böbrek hasarının bitkisel antioksidanlar tarafından azaltıldığı bilim insanları tarafından rapor edilmiştir [34]. Likenler de eşsiz metabolitleri sayesinde şu ana kadar birçok araştırma alanı içerisine dahil edilen önemli canlılardan biridir. *P. glauca* likeninden elde edilen farklı ekstraktların içerisinde barındırdığı bileşenler aracılığı ile insan lenfositleri üzerindeki

biyolojik aktiviteleri mevcut çalışmanın temasını oluşturmaktadır.

Çalışma içerisinde yer alan aktiviteler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen korelasyon analizleri, PME ve PSE'nin lenfositler üzerindeki sitotoksik etkisinin konsantrasyon artışı ile orantılı olduğunu göstermiştir (Tablo 2 ve 3). Aynı zamanda hesaplanan IC_{50} değerleri, hücreler üzerinde proliferasyonu inhibe edici ekstrakt konsantrasyonları hakkında fikir vermiştir (Tablo 1). PME, PSE'ye kıyasla sahip olduğu düşük IC_{50} değeri ile hücreler üzerinde daha yüksek sitotoksik etki gösteren uygulama olmuştur. Liken bileşenleri ile gerçekleştirilen konsantrasyona bağlı sitotoksikite çalışmaları bir hayli fazladır. Önemli bir liken metaboliti olan usnik asidin melanom, kolon kanseri [35], lösemi, serviks kanseri [36,37], mide, prostat, akciğer kanseri [38], beyne metastaz yapmış prostat kanseri, meme kanseri [39] hücreleri üzerinde antitümörojenik aktivite gösterdiği araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur.

Mevcut çalışmada, sitotoksik etkiye sebep olabilecek aktiviteler incelendiğinde LDH ve TOD aktiviteleri dikkat çekmektedir. *Hücre canlılığı-TOD* ve *hücre canlılığı-LDH* arasındaki korelasyon katsayıları $< -0,90$ olarak ölçülmüştür (Tablo 2 ve 3). Çalışma sonucu ile ilişkili olan yani liken bileşenlerinin sebep olduğu oksidatif stres indüklü sitotoksik aktivite ile ilgili birçok araştırma farklı bilim insanları tarafından bilim dünyasına duyurulmuştur. Usnik asit bileşiğinin bazı hücrelerde oksidatif strese neden olduğu ve bundan dolayı nekroz olayının gerçekleştiği fare hepatosit hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada görülmüştür [40]. Bazı hücreler üzerinde anlamlı derecede oksidatif strese neden olmayan liken bileşenleri de mevcuttur. Bununla ilgili, Demir vd. [41] diffraktik asit ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, test edilen metabolitin kan hücreleri üzerinde önemli derecede oksidatif stres oluşturmadığını tespit edilmişlerdir. Mevcut çalışmada, PME ve özellikle PSE'nin lenfositler üzerinde sebep olduğu LDH ve TOD aktivitelerinin kontrol'ye kıyasla istatistik açıdan farklılık ($p > 0,05$) göstermediği gözlenmiştir. Bu veri ile test edilen liken ekstraktlarının ki özellikle PSE'nin belli konsantrasyonlarının (< 25 mg/L) lenfositler üzerinde anlamlı derecede toksisiteye sebep olmadıkları kanısına varılmıştır (Şekil 2 ve 4).

Tablo 2. Lenfositler üzerinde PME 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	-0,98**	0,83**	1			
Oksidatif DNA Hasarı	-0,83**	0,92**	0,87**	1		
TAK	-0,68**	0,11	0,61**	0,29	1	
TOD	-0,93**	0,89**	0,97**	0,94**	0,48*	1

^a Pearson korelasyon katsayısı; * Korelasyon $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır; ** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 3. Lenfositler üzerinde PSE 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	-0,99**	0,81**	1			
Oksidatif DNA Hasarı	-0,67**	0,27	0,66**	1		
TAK	-0,48*	-0,02	0,45	0,66**	1	
TOD	-0,99**	0,84**	0,98**	0,63**	0,44	1

^a Pearson korelasyon katsayısı; * Korelasyon $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır; ** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

PME ve PSE ile muamele edilen lenfositler üzerindeki oksidatif DNA hasar düzeyleri hücrelerde ortaya çıkan 8-OH-dG oranı ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler, PME ve PSE uygulamaları tarafından ortaya çıkarılan 8-OH-dG miktarının birbirine çok yakın ve aynı zamanda pozitif kontrol değerinden çok uzakta olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, 25 mg/L'den düşük uygulamaların kontrol'ye kıyasla hücrelerdeki oksidatif DNA hasar seviyesini anlamlı derecede ($p > 0,05$) yükseltmediği belirlenmiştir (Şekil 5). Liken ekstraktları ve saf bileşenlerinin çeşitli hücrelere karşı genotoksik etkilerinin test edildiği çalışmalar rapor edilmiştir. (+)-Usnik asidin belli konsantrasyonlarının V79 hücre hatlarına karşı genotoksik etki gösterdiği comet analizi ile belirlenmiştir [42]. Aynı zamanda, likenlerin anti-genotoksik aktiviteleri de literatürde mevcuttur. Alpsoy vd. [43] *Evernia prunastri* ile gerçekleştirdikleri çalışmada, aflatoksin indüklü genotoksitenin metanol ekstraktı ile düşürüldüğünü ortaya çıkarmışlardır.

PME ve PSE ile muamele edilen lenfositlerin TAK seviyelerindeki değişimler incelendiğinde, tüm ekstrakt uygulamalarının kontrol'ye kıyasla TAK'yi anlamlı seviyede ($p < 0,05$) yükselttiği görülmektedir. Bununla beraber, hücrelerdeki en yüksek TAK oranlarına PSE'nin sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). TAK analizleri sonucunda, su ekstraktının metanole kıyasla çok daha yüksek seviyede antioksidan özellik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Literatür incelendiğinde, genellikle liken bileşiklerinin sahip oldukları fenolik içeriklerden kaynaklı antioksidan kapasiteleri üzerine meydana getirilen çalışmalar dikkat çekmektedir [44]. Bu kapsamda, antioksidan kapasitesinin varlığı defalarca çalışılmış olan önemli liken metaboliti usnik asittir. Usnik asidin hücreler üzerindeki TAK'yi artırıcı ve sahip olduğu antioksidan bileşenlerin varlığı üzerine çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir [35,45,46].

Sonuç olarak, mevcut çalışma sonucunda elde edilen veriler *P. glauca* likeninin doğal antioksidan kaynağı olduğunu göstermiştir. Özellikle, *P. glauca*'dan elde edilen su ekstraktının belli konsantrasyonlarda kullanıldığında, insan lenfositleri üzerinde oksidatif stres, genotoksisite gibi hasarlara neden olmadan

hücrelerde toplam antioksidan düzeyi artıracağı yönünde bilgi elde edilmiştir.

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.

Kaynakça

- [1] Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., Loguercio, C. 2007. Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Human Carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2381–2386.
- [2] Carrocho, M., Ferreira, I. C. F. R. 2013. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25.
- [3] Gago-Dominguez, M., Castela, J. E. 2006. Lipid Peroxidation and Renal Cell Carcinoma: Further Supportive Evidence and New Mechanistic Insights. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(4), 721–733.
- [4] Ray, P. D., Huang, B. W., Tsui, Y. 2012. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.
- [5] Poljsak, B., Suput, D., Milisav, I. 2013. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 956792.
- [6] Irshad, M., Chaudhuri, P. S. 2002. Oxidant-Antioxidant System: Role and Significance in Human Body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(11), 1233–1239.
- [7] Valenzuela, B. A., Sanhueza, J., Nieto, S. 2003. Natural Antioxidants in Functional Foods: From Food Safety to Health Benefits. *Grasas y Aceites*, 54(3), 295–303.

- [8] Ahmad, S. R., Gokulakrishnan, P., Giriprasad, R., Yattoo, M. A. 2015. Fruit-Based Natural Antioxidants in Meat and Meat Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1503–1513.
- [9] Moukette, B. M., Pieme, C. A., Njimou, J. R., Biapa, C. P. N., Marco, B., Ngogang, J. Y. 2015. *In Vitro* Antioxidant Properties, Free Radicals Scavenging Activities of Extracts and Polyphenol Composition of a Non-Timber Forest Product Used as Spice: *Monodora Myristica*. *Biological Research*, 48(1), 15.
- [10] Brodo, I. M., Sharnoff, S. D., Sharnoff, S. 2001. About the Lichens. *Lichens of North America*. ss 3–113. Yale University Press, New Haven & London.
- [11] Boustie, J., Grube, M. 2005. Lichens-A Promising Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273–287.
- [12] Grujičić, D., Stošić, I., Kosanić, M., Stanojković, T., Ranković, B., Milošević-Djordjević, O. 2014. Evaluation of *In Vitro* Antioxidant, Antimicrobial, Genotoxic and Anticancer Activities of Lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology*, 66(5), 803–813.
- [13] Karagöz, A., Aslan, A. 2005. Antiviral and Cytotoxic Activity of Some Lichen Extracts. *Biologia*, 60(3), 281–286.
- [14] Halici, M., Odabasoglu, F., Suleyman, H., Cakir, A., Aslan, A., Bayir, Y. 2005. Effects of Water Extract of *Usnea longissima* on Antioxidant Enzyme Activity and Mucosal Damage Caused by Indomethacin in Rats. *Phytomedicine*, 12(9), 656–662.
- [15] Emsen, B., Turkez, H., Togar, B., Aslan, A. 2017. Evaluation of Antioxidant and Cytotoxic Effects of Olivetoric and Physodic Acid in Cultured Human Amnion Fibroblasts. *Human & Experimental Toxicology*, 36(4), 376–385.
- [16] Ögmundsdóttir, H. M., Zoëga, G. M., Gissurason, S. R., Ingólfssdóttir, K. 1998. Anti-Proliferative Effects of Lichen-Derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on Malignant Cell-Lines and Mitogen-Stimulated Lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(1), 107–115.
- [17] Turkez, H., Geyikoglu, F., Aslan, A., Karagöz, Y., Turkez, O., Anar, M. 2010. Antimutagenic Effects of Lichen *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zoph. Extracts against the Mutagenicity of Aflatoxin B1 *In Vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 26(9), 625–631.
- [18] Vartia, K. O. 1973. Antibiotics in Lichens. The Lichens. ss 547. Ahmadian, V., Hale, M.E., ed. Academic Press, New York.
- [19] Dülger, B., Gücin, F., Aslan, A. 1998. Antimicrobial Activity of *Cetraria islandica* (L.) Ach Lichen. *Turkish Journal of Biology*, 22, 111–118.
- [20] Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Garbarino, J., Cardile, V. 2008. Lichen Metabolites Prevent UV Light and Nitric Oxide-Mediated Plasmid DNA Damage and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cells. *Life Sciences*, 83(13–14), 468–474.
- [21] Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., Boustie, J. 2003. Cytotoxic Activity of Some Lichen Extracts on Murine and Human Cancer Cell Lines. *Phytomedicine*, 10(6–7), 499–503.
- [22] Ghate, N. B., Chaudhuri, D., Sarkar, R., Sajem, A. L., Panja, S., Rout, J., Mandal, N. 2013. An Antioxidant Extract of Tropical Lichen, *Parmotrema reticulatum*, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Breast Carcinoma Cell Line MCF-7. *Plos One*, 8(12), e82293.
- [23] Singh, N., Nambiar, D., Kale, R. K., Singh, R. P. 2013. Usnic Acid Inhibits Growth and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Nutrition and Cancer*, 65(1), 36–43.
- [24] Emsen, B., Aslan, A., Togar, B., Turkez, H. 2016. *In Vitro* Antitumor Activities of the Lichen Compounds Olivetoric, Physodic and Psoromic Acid in Rat Neuron and Glioblastoma Cells. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1748–1762.
- [25] Wirth, V. 1995. Die Flechten Baden Württembergs. Ulmer, Stuttgart, 1006s.
- [26] Purvis, O. W., Coppins, B. J., Hawksworth, D. L., James, P. W., Moore, D. M. 1992. The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. Natural History Museum Publications in Association with the British Lichen Society, London, 710s.
- [27] Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. 2005. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152.
- [28] Haslam, G., Wyatt, D., Kitos, P. A. 2000. Estimating the Number of Viable Animal Cells in Multi-Well Cultures Based on Their Lactate Dehydrogenase Activities. *Cytotechnology*, 32(1), 63–75.
- [29] Erel, O. 2004. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285.
- [30] Erel, O. 2005. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
- [31] Gan, W., Nie, B., Shi, F., Xu, X. M., Qian, J. C., Takagi, Y., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, J. P. 2012. 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 Radical Biology & Medicine, 52(9), 1700–1707.
- [32] Behradmanesh, S., Derees, F., Rafieian-Kopaei, M. 2013. Effect of *Salvia officinalis* on Diabetic Patients. Journal of Renal Injury Prevention, 2(2), 51–54.
- [33] Khajehdehi, P. 2012. Turmeric: Reemerging of a Neglected Asian Traditional Remedy. Journal of Nephropathology, 1(1), 17–22.
- [34] Tavafi, M. 2013. Diabetic Nephropathy and Antioxidants. Journal of Nephropathology, 2(1), 20–27.
- [35] Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., Stanojković, T. 2012. Chemical Composition of Three Parmelia Lichens and Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Some Their Major Metabolites. Phytomedicine, 19(13), 1166–1172.
- [36] Schinkovitz, A., Kaur, A., Urban, E., Zehl, M., Páchniková, G., Wang, Y., Kretschmer, N., Slaninová, I., Pauli, G. F., Franzblau, S. G., Krupitza, G., Bauer, R., Kopp, B. 2014. Cytotoxic Constituents from *Lobaria scrobiculata* and a Comparison of Two Bioassays for Their Evaluation. Journal of Natural Products, 77(4), 1069–1073.
- [37] Brandao, L. F. G., Alcantara, G. B., Matos, M. D. F. C., Bogo, D., Freitas, D. D. S., Oyama, N. M., Honda, N. K. 2013. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 61(2), 176–183.
- [38] Nguyen, T. T., Yoon, S., Yang, Y., Lee, H. Bin, Oh, S., Jeong, M. H., Kim, J. J., Yee, S. T., Crişan, F., Moon, C., Lee, K. Y., Kim, K. K., Hur, J. S., Kim, H. 2014. Lichen Secondary Metabolites in *Flavocetraria cucullata* Exhibit Anti-Cancer Effects on Human Cancer Cells through the Induction of Apoptosis and Suppression of Tumorigenic Potentials. Plos One, 9(10), e111575.
- [39] Bazin, M. A., Le Lamer, A. C., Delcros, J. G., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J., Corbel, J. C., Tomasi, S. 2008. Synthesis and Cytotoxic Activities of Usnic Acid Derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16(14), 6860–6866.
- [40] Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., Kaplowitz, N. 2004. Usnic Acid-Induced Necrosis of Cultured Mouse Hepatocytes: Inhibition of Mitochondrial Function and Oxidative Stress. Biochemical Pharmacology, 67(3), 439–451.
- [41] Demir, L., Toğar, B., Hasan Türkez, Sozio, P., Aslan, A., Stefano, A. Di. 2015. The Investigation of Cytogenetic and Oxidative Effects of Diffraetaic Acid on Human Lymphocyte Cultures. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58(1), 75–81.
- [42] Leandro, L. F., Munari, C. C., Sato, V. L. F. L., Alves, J. M., de Oliveira, P. F., Mastrocola, D. F. P., Martins, S. de P. L., Moraes, T. da S., de Oliveira, A. I., Tozatti, M. G., Cunha, W. R., Tavares, D. C. 2013. Assessment of the Genotoxicity and Antigenotoxicity of (+)-Usnic Acid in V79 Cells and Swiss Mice by the Micronucleus and Comet Assays. Mutation Research, 753(2), 101–106.
- [43] Alpsoy, L., Orhan, F., Nardemir, G., Agar, G., Gulluce, M., Aslan, A. 2015. Antigenotoxic Potencies of a Lichen Species, *Evernia prunastri*. Toxicology and Industrial Health, 31(2), 153–161.
- [44] Fernández-Moriano, C., Gómez-Serranillos, M., Crespo, A. 2016. Antioxidant Potential of Lichen Species and Their Secondary Metabolites. A Systematic Review. Pharmaceutical Biology, 54(1), 1–17.
- [45] Pavithra, G. M., Vinayaka, K. S., Rakesh, K. N., Junaid, S., Dileep, N., Kekuda, P. T. R., Siddiqua, S., Naik, A. S. 2013. Antimicrobial and Antioxidant Activities of a Macrolichen *Usnea pictoides* G. Awasthi (Parmeliaceae). Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(8), 154–160.
- [46] Toledo Marante, F. J., García Castellano, a., Estévez Rosas, F., Quintana Aguiar, J., Bermejo Barrera, J. 2003. Identification and Quantitation of Allelochemicals from the Lichen *Lethariella canariensis*: Phytotoxicity and Antioxidative Activity. Journal of Chemical Ecology, 29(9), 2049–2071.