

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ



Bazı Karayosun Özütlerinin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması
Proje No:TSA-11-3564

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. DİLŞAD ONBAŞLI

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Araştırmacının Adı Soyadı

Doç. Dr. GÖKÇEN YUVALI ÇELİK

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Doç. Dr. ERGİN MURAT ALTUNER

Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü

Uzm. Bio. HATİCE BEKÇİ

Ocak 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR: Bu proje kapsamında ülkemiz için ekonomik anlamda öneme sahip bazı karayosunlarına ait özütlerin biyolojik aktivitelerini araştırmak üzere değişik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Böyle bir çalışmanın gerçekleştirilmesi için araştırmacılara maddi destek sağlayan ERÜ BAP Birimine, karayosunu teşhisini sağlayan Dr. Kerem CANLI' ya ve antioksidan çalışmaların da ki bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Belma ASLIM' a sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2-3
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	4-5
2. GENEL BİLGİLER	6-15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16-23
4. BULGULAR	24-27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	28-34
6. KAYNAKLAR	35-40

ÖZET

Tıbbi bitkilerin tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. Bugün mevcut ilaçların çoğunun bitkisel kaynaklı olduğu söylenebilir. Doğal farmasötik kaynak olarak yüksek bitkilerin kullanımlarının aksine bazı karayosunlarının da anti-enfeksiyon ve antioksidan özellikleri bakımından, biyolojik aktivitelerinin araştırılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda proje kapsamında bazı karayosunu türleri olan *Bryum capillare*, *Hypnum andoi*, *Plagiomnium undulatum*, *Bryum radiculosum*' un antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Karayosunu örnekleri Yaralıgöz Dağı, Çatören (Kastamonu, Türkiye) mevkiinden toplanmış ve kurutulduktan sonra etanol ile özüt edilmiştir. Karayosunu özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metoduna göre tanımlanmıştır. Özütlerin antimikrobiyal aktivitesi *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 04019 mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. *C. glabrata* üzerine tüm karayosunu türleri referans antibiyotiğin neden olduğu etkiden daha yüksek etki göstermişlerdir. *E. coli* üzerine *H. andoi* ve *B. radiculosum* özütleri referans antibiyotikten daha yüksek etki göstermiştir. *B. subtilis* ve *S. aureus* üzerine dört tür karayosununun da etki gösterdiği gözlenmiştir. Ancak gözlenen etki referans antibiyotiğinin neden olduğu etkiden çok düşüktür. Karayosunu özütlerinin antioksidan aktivitesi ise; üç konsantrasyonda ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ and $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$) DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini, demir iyonları üzerinde metal şelatlama aktivitesi ve plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu deneyleri ile tanımlanmıştır. Askorbik asit, tokoferol, ve toplam fenoller de dahil olmak üzere doğal olarak oluşan antioksidanlar etanolik özütlerde bulunmuştur. Toplam fenolik içeriği 24.99 mg.g^{-1} olarak *P. undulatum*'da en yüksek değer tespit edilmiştir. Askorbik asit ve α - tokoferol sadece *B.capillare* (sırasıyla, 1.87 , $<0.5 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$) özütünde az miktarda bulunmuştur. Ancak folik asit tespit edilememiştir. *B. radiculosum*, *B. capillare* ve *H. andoi* örneklerinin 1.0 mg.mL^{-1} konsantrasyondaki özütlerinin DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki sonuçları sırasıyla %38, %15 ve %5 olarak bulunmuştur. En yüksek metal şelatlama ve lipid peroksidasyon aktivitesi *B. radiculosum* özütünün tüm konsantrasyonlarında göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Bryum capillare*, *Hypnum andoi*, *Plagiomnium undulatum*, *Bryum radiculosum* karayosunu, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite.

ABSTRACT

The history of using plants to treat diseases is as old as the human history. Most of the medicines available today are estimated to be originally derived from plant sources. In contrast to the extensive utilisation of higher plants as a source of natural pharmaceuticals, only minute amount of the some bryophytes are screened in terms of their anti-infective and antioxidant properties until now. In this context antimicrobial and antioxidant activities of *Bryum capillare*, *Hypnum andoi*, *Plagiomnium undulatum*, *Bryum radiculosum*, bryophyte species were studied within the project. Bryophyte samples were collected from Yaralıgöz Mountain, Çatören (Kastamonu, TURKEY) and subjected to ethanol extraction after air drying. Antimicrobial activity of bryophyte extracts was identified by determining the disc diffusion method. Antimicrobial activities of the extracts were tested against *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 04019. The antioxidant activity of bryophyte extracts were tested in three concentrations (0,25 mg.mL⁻¹, 0,50 mg. mL⁻¹ and 1,00 mg.mL⁻¹) and total phenolic compounds in the extracts were determined. Antioxidant activities of the samples were identified by DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radical scavenging assay, metal chelating activity on ferrous ions and plasma lipid peroxidation inhibitory assays. As a result of the study, antimicrobial effects that is higher than the reference antibiotic, of all bryophyte samples were found against *C.glabrata*. In addition, *H. andoi* and *B. radiculosum* extracts showed inhibition that is higher than the reference antibiotic, against *E.coli*. all bryophyte samples inhibited *B. subtilis* and *S. aureus* strains but, these values are not more effective than reference antibiotic. Naturally occurring antioxidants, including ascorbic acid, tocopherols, and total phenols, were found in the ethanolic extract. Total phenolic compounds were determined as the highest value 24.99 mg.g⁻¹ for *P. undulatum* . Ascorbic acid and α -tocopherol were found in small amounts (1.87, <0.5 μ g.g⁻¹ respectively) in only *B.capillare* extract. However, folic acid was not detected. Therefore, total phenols might be responsible for the antioxidant properties studied. The results of DPPH radical scavenging activity were found to be 38%, 15% and 5% respectively for 1.0 mg.mL⁻¹ of *B. radiculosum*, *B. capillare* and *H. andoi* extracts. Metal chelating activity and lipid peroxidation showed the highest value for all concentrations of *B. radiculosum*. The present results suggest that all the tested bryophyte samples have antioxidant activity; therefore, further investigations are necessary to fully elucidate the in vivo behavior of the studied plant extracts.

Keywords: *Bryum capillare*, *Hypnum andoi*, *Plagiomnium undulatum*, *Bryum radiculosum*
bryophyte, antimicrobial activity, antioxidant activity.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler alemi yüz milyonlarca yıl süren evrimleşme süreci içerisinde inanılmaz sayıda ve çeşitlilikte cins ve türlerin var olmasına şahit olmuştur. Tıbbi bitkilerin tarihi insanlık kadar eskidir. Eski çağlarda hastalıkların tedavisi konusunda diğer canlıların davranışlarının incelenmesi ve taklit edilmesi ilaçların oluşumunda büyük önem taşımaktadır. Hayvanların çeşitli bitkileri kullanarak kendilerini tedavi etmeleri insanları da bitkilere yönlendirmiştir. Bitkilerin bu özelliklerinin kaynağı araştırılmış ve içeriğindeki çeşitli materyallerin bazı fizyolojik aktivitelere sahip olduğu gözlenmiştir. Bunlara örnek olarak; anti-mikrobiyal, anti-viral, analjezik, anksiyolitik, anti-depresan, anti-inflamatuar, anti-kolinesteraz, anti-oksidan, amoebisidal, anti leishmanial, anti-platelet, antiproliferatif, pro-apoptotik, akıl hastalıkları, diyabet, karaciğer koruyucu, HIV-1 integras inhibitörü aktiviteleri verilebilir (1).

Günümüzde bilim ve teknolojiye ilerlemelere rağmen doğal kaynakların bilinçsizce tüketimi ve karşılaşılan ekonomik güçlükler, doğal kaynakların birçok amaçta kullanımlarını zorunlu kılmıştır. Enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede bugüne kadar gerçekleştirilen doğal ve sentetik antibiyotiklerin mikroorganizmaların direnç kazanmaları sonucu etkisiz kalmaları ve çeşitli yan etkilerinin bulunması araştırmacıları yeni ve değişik antimikrobiyal maddeler keşfetmek için doğaya yöneltmiştir (2, 3). Bitkilerin bakteri ve funguslara karşı inhibisyon etkisi gösteren bazı kimyasal maddeler ürettikleri bilinmektedir (2). Karayosunları bilinen en eski kara bitkileridir. Karayosunlarının savunma mekanizmalarında antimikrobiyal aktivite özelliği olan ve sekonder metabolitler denilen kimyasal bariyerler rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalarda *Atrichum*, *Dicranum*, *Mnium*, *Polytrichum* ve *Sphagnum* gibi bazı karayosunu cinslerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bazı karayosunu türlerinin ise antibakteriyel, antifungal, antiviral aktiviteleride bilinmektedir (4-6).

Ayrıca karayosunlarının yaraların iyileşme sürecinde de etkili olduğu ve yaralarda enfeksiyon riskini azalttığı yüzyıllar öncesinden bilinmektedir. Çinliler ve Amerika yerlileri çeşitli karayosunu türlerini yaraları iyileştirmek için kullanmaktaydı. Örneğin; *Philonotis*, *Bryum*, *Mnium*, cinslerine ait bazı türler ezilerek bir çeşit macun hâline getiriliyor ve yaraların üzerine merhem olarak sürülüyordu. Hindistan'ın Himalaya bölgesinde karayosunu küllerinin karışımı, yağ ve bal ile karıştırılarak; kesikler, yanıklar ve yaralar üzerine sürülmekteydi.

Çinlilerin; tonsilit, bronşit, sistit, deri hastalıkları ve yanıkların tedavisi için yaklaşık 40 çeşit Karayosunu'ı kullandığı kayıtlarda bulunmaktadır (7).

Yukarıda da bahsedildiği gibi karayosunları antimikrobiyal, antiviral, analjezik ve antiinflamatuvar aktivitesine ek olarak içeriğinde bulundurduğu çeşitli biyolojik olarak aktif maddelerden dolayı antioksidan aktiviteye sahip olabileceği bakımından da umut vaatmektedir. Bu nedenle karayosunlarının antioksidan aktivitelerinin araştırılması gerekli hale gelmiştir.

Bu proje de bazı karayosunu özütlerinin patojen mikroorganizmaları inhibe etme gücü ve antioksidan özelliklerine bağlı olarak doğal ve yeni antibiyotiklerin üretilmesine yönelik kayda değer bir ön çalışma olması hedeflenmiştir. Mevcut antibiyotiklere hızla direnç kazanan patojen mikroorganizmalara yönelik yapılan yeni antibiyotiklerin keşfi ya da suni antibiyotiklerin üretilmesi artık tüm dünyada önem arz eden çalışmaların başında gelmektedir. Ayrıca pek çok canlı türü reaktif oksijenler tarafından oluşturulan oksidatif türlere karşı kendilerini korumak için savunma sistemi geliştirmiştir. Son çalışmalar, oksidatif yıkıma karşı savunmada ve kanser, damar tıkanıklığı farklı insan hastalıklarında ve yaşlanma sürecinden korunmada bitkilerin antioksidan özelliklerinin de etkin olacağını göstermektedir. Özellikle doğal kaynaklı antioksidan türlerin geliştirilmesi ve kullanılması günümüzde önemli araştırma konuları arasında yerini almıştır. Karayosunlarının bazı hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır kullanıldığı dikkate alınırsa, patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkiye ve antioksidan özelliğe sahip karayosunu türlerinin tespit edilip, etken maddelerinin saflaştırılarak analiz edilmesinin ilaç endüstrisine yönelik çalışmalar içerisinde önemli bir yer teşkil etmesi kaçınılmaz olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Karayosunları yaklaşık 15.000 türü kapsayarak Bryophyta içerisindeki en geniş bölümü teşkil etmektedir. Bu bölüm, familyaların %84'ünü oluştururken, türlerin ise yaklaşık olarak %98'ini oluşturmaktadır (8). Bryophyta bölümü, Hepaticopsida (Ciğerotları), Anthocerotopsida (Boynuzlu ciğerotları) ve Bryopsida (Karayosunları) olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (9).

Bryophyta bölümü altındaki bu üç sınıfın birbirinden genetik ve morfolojik olarak çok farklıdır. Bu nedenle her sınıfın ayrı bir bölüm olarak incelenmesi gerektiğinin daha doğru olduğu ortaya konmuştur (10). Ancak geleneksel kullanım, her üç grubun birbiri ile yakın ilişkisi ve birçok araştırmacının üç grubu paralel şekilde çalışıyor olması gibi sebeplerle *Bryophyta* bölümünün halen 3 grubu da temsil ettiği anlayışı kabul görmektedir (11).



Şekil 1. *Bryum* cinsine ait bir tür örneği

([http://www.kulak.ac.be/facult/wet/biologie/pb/kulakbiocampus/buiten-kulak/mossen/Bryum capillare- gedraaid knikmos/ Bryum capillare-gedraaid knikmos-01.jpg](http://www.kulak.ac.be/facult/wet/biologie/pb/kulakbiocampus/buiten-kulak/mossen/Bryum%20capillare-gedraaid%20knikmos/Bryum%20capillare-gedraaid%20knikmos-01.jpg), 2006)



Şekil 2. *Hypnum* cinsine ait bir tür örneği
(<http://de.wikipedia.org/wiki/Hypnum>)



Şekil 3. *Plagiomnium* cinsine ait bir tür örneği
(<http://bryophytes.plant.siu.edu/imPlagiomniumMedium.html>)

Karayosunları; bazen tamamen suya gömülü, ıslak zeminlerde, nemli ortamlarda, toprak ve kayalar üzerinde ve ağaç gövdelerinde bulunabilirler. Orman ve diğer ekosistemlerin önemli üyelerindendir. Yapraklı karayosunlarının çoğu son derece soğuğa ve ısıya dayanıklıdır. Kuru hava şartlarında önemli miktarda su kaybeden bazı yapraklı karayosunları, su bulunduğu zaman tekrar canlanabilme özelliğine sahiptir (12).

Karayosunları asitli karakterdeki bataklıklardan, alpin ve arktik bölgelerdeki toprak ve kayalara kadar çok geniş alanlar üzerinde yaşayabilirler. Orman yangınlarından sonraki ilk istilacılar olup, ortamda koloniler oluşturarak toprağın kalitesini ve nemini yükseltirler. Örneğin; *Funaria hygrometrica* Hedw. ve *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid gibi türler ilk istilacı oldukları ortama yerleşerek diğer bitkilerin yaşayabileceği uygun alanlar oluştururlar. Bu bakımdan orman ekosisteminin ayrılmaz bir parçasıdır (12).

Karayosunları kendi kuru ağırlığının yaklaşık 12 katı kadar su tutma kapasitesine sahip olduğundan, orman zemininin nemli kalmasını sağlarlar. Bu şekilde, üzerlerine düşen diğer bitki tohumlarının çimlenmesine yardımcı olarak, orman varlığının devamında önemli rol oynarlar. Ayrıca; mineral depo etmeleri, hayvanlar için besin kaynağı olmaları, birçok böcek türü için barınak ve yumurtlama ortamı oluşturmaları açısından da önemlidirler (12).

Karayosunları birçok toplum tarafından çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bu durum oluşturdıkları ve taşıdıkları çeşitli maddelerden kaynaklanmaktadır. Karayosunlarının kimyasal kompozisyonları türlerine göre değişebilmekte ve zengin bir çeşitlilik gösterebilmektedir. Bunların başlıca nedenleri arasında karayosununun yaşadığı bölge, mevsimsel değişiklikler, maruz kaldığı su ve nemin miktarı, çevreden aldığı maddeler sayılabilmektedir. Karayosunlarının primer metabolizmaları damarlı bitkilerinkine çok benzer. Hücre duvarlarında selüloz gibi esansiyel bileşikler, klorofil a, klorofil b, ana karotenoidler, nişasta, nükleik asitler, sekerler ve bazı lipidleri içerir. Karayosunlarıyla yapılan çalışmalarda, lignin benzeri aromatik bileşiklere, karbonhidratlara, aminoasitlere, rastlanmaktadır (13).

Karayosunları da diğer bitkiler gibi bol miktarda karbonhidrat ve protein içermektedirler. Bu nedenle karbon ve azot elementlerinin bu bitkilerde de bol miktarda bulunduğundan bahsedilebilmektedir (14).

Karayosunlarının bol miktarda karbonhidrat ve protein içermeleri besin zinciri açısından önemlerini vurgulamaktadır. Ayrıca karayosunları bol miktarda mum içerirler. Bu mumun görevi çevresiyle çok iyi etkileşen karayosununu aşırı su kaybı, aşırı güneş ışığı gibi zararlı etkenlerden korumaktır. Mumun yapısı bu etkenlerden ve çevreyi kirleten etkenlerden dolayı değişebilmektedir. Mum miktarı bitki yaşlandıkça artmakta ve yoğunlaşmaktadır. Genç

yapraklarda dağınık şekilde bulunan mum bitki yaşlandıkça daha yoğun bir görünüme kavuşmaktadır (15).

Mum tabakası GC/MS ile analiz edildiğinde 100'den fazla madde tespit edilmiş. Bu maddelerin çoğunluğu yağ asitleri ve çok uzun zincirli alkan, alkol ve esterlerden oluşmaktadır. Saptanan bileşiklerin %72'si yağ asitleri, %17'si çok uzun zincirli alkanlardan oluşmaktadır. En çok bulunan yağ asitleri; heksadekanoik asit (%35,71), oleik asit (%24,34), oktadekanoik asit (%16,31) ve bunlar 20'den daha az karbona sahip zincirlerden oluşmaktadır (15).

Karayosunları çok iyi biyomediyatör olduklarından dolayı yaşadıkları çevrede bulunan neredeyse bütün maddeleri organizmalarına almaktadırlar. Bu durum organizmada bulunan elementlerde ve bu elementlerin miktarlarında değişikliği neden olabilmektedir. Örneğin fabrika yakınında yetişen bir karayosununda havadan alabileceği ağır metallerin birikimi söz konusu olabilmektedir (13).

Pek çok karayosunu da kalitatif ve kantitatif olarak damarlı bitkilerde bulunandan farklı olmayan inorganik iyonlar bulunmuştur. Sık sık bazı karayosunlarının metal iyonların toksik düzeylerinin potansiyel toplayıcıları olduğu gözlenir. Bazı türler doğal çevrede bulunan metallerle özel tolerans gösterir (13). Spagnuolo ve arkadaşları tarafından 2009 yılında tarafından yapılan çalışmada kentsel, kentin dışından ve kente uzak mesafede bulunan karayosunları üzerinde yapılan çalışmada karayosunlarında biriken metallerin oranı aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Metallerin oranı tahmin edildiği üzere kırsala doğru gidildikçe azalmaktadır (16).

Karayosunlarının yapısında bulunan sekonder bileşikler arasında aromatik bileşikler, terpenoidler ve yağ asitleri bulunmaktadır (17). Terpenoidlerin yanında, aromatik bileşikler karayosunlarının en önemli sekonder ürünleridir. Karayosunlarında bulunan aromatik bileşikler benzoik ve sinamik asit türevleri, fenollerler, alkilfenoller, fenilglikozitler, bisbibenziller, bisbibenzildimerleri, stilbenler, fenantrenler, naftalenler, asetofenonlar, lignanlar, flavonoidler, kumarinler, isokumarinler, komestanlar, benzonaftoksantenonlar sayılabilir (13).

Karayosunları, sahip oldukları özellikler açısından pek çok alanda çok uzun zamandır kullanılmaktadır. Bitkilerden elde edilen ikinci metabolitler uzun zamandan beri ilaç olarak kullanılmaktadır ve bu doğal ürünlere talep gün geçtikçe artmaktadır. İnsanlar, yüksek bitkilerden elde edilen maddeleri geniş alanlarda değerlendirmelerine rağmen karayosunundan elde maddeler yüksek bitkiler kadar ilgi görmemiştir (18). Buna karşın Karayosunları medikal bitki olarak Çin, Avrupa, Kuzey Amerika'da kullanıldıkları kayıtlarda mevcuttur (19).

Çin, Avrupa ve Kuzey Amerika'da karayosunlarının tıbbi olarak kullanıldığını belirten birçok kaynak vardır (20). 400 yıl önce Çin'de *Fissidens* ve *Polytrichum* türleri diüretik ve saç büyütme amaçlı kullanılmıştır (19). Geleneksel tıpta 40 karayosunu türü; kardiyovasküler sistem, tonsillit, bronşit, orta kulak iltihabı, sistit, yanık, cilt hastalıklarında kullanılıyordu (7). Çin'de tarih boyunca kullanılan karayosunlu örnekler, *Rhadobryum roseum* kardiyovasküler ve nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde, *P. commune* enflamatuvar olarak, *Haplocladium microphyllum* bronşit tedavisinde kullanılmıştır (21). Bunlara ek olarak karayosunları Çin kültüründe göz hastalıkları için de kullanılmıştır (22).

Karayosunlarının Çin, Avrupa ve Kuzey Amerika'da bakteri, mantar, salyangoz, böcek ve yılan saldırılarına karşı kullanımına da rastlanmaktadır (23). *Sphagnum* cinsi karayosunu türleri dünya savaşları sırasında yaralı askerlerin kanamasını durdurma, mikroorganizmalara karşı antibiyotik aktivitesi olarak kullanılmıştır (24). *Mnium* türleri Çöl Hintlileri tarafından yanık ağrılarını hafifletmek için kullanılmıştır (25). Karayosunlarının külleri yağ ve bal ile karıştırılarak Himalaya bölgesinde kesikler, yanıklar ve yaralar için merhem olarak kullanılmıştır (26). Kuzeyde yaşayan Hintlilerinin karayosunlarını çıban, egzema, kesik, ısırma ve yanıklar için merhem olarak kullandıkları bilinmektedir (27). Karayosunları çürükler ve yaralar için, bir örtü olarak veya kırık kemiklerin düzeltilmesinde atel dolgusu olarak kullanılmıştır (20). Kuzey Amerika Kızılderilileri *Bryum*, *Mnium*, *Philonotis spp.* ve *Polytrichum juniperinum* türlerini yanıkların, eziklerin, yaraların tedavilerinde, Fransa'da ise *M.polymorpha* türleri idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır (19).

Karayosunlarının, mantar ve prokaryotik hücrelere karşı antibiyotik etkisi kabul edilmiştir (3). Karayosunları, basit arazi bitkileri olarak adlandırılan, anatomik engelleri daha az, sekonder metabolitleri antimikrobiyal etki gösteren savunma mekanizmasına sahip bitkilerdir (28).

Birçok karayosunu türünün çürümesinde bakterilerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bunun nedeni karayosunlarının üretmiş olduğu antibiyotiklerdir (20). *Sphagnum*'un antimikrobiyal etkisi nedeniyle yanıklarda ve böcek ısırıklarında kullanımı günümüzde dahi yaygındır. Yapılan bilimsel araştırmalar antimikrobiyal anlamda yoğun etkisi bulunan karayosunlarının *Atrichum*, *Dicranum*, *Mnium*, *Polytrichum* ve *Sphagnum* olduğu belirtilmiştir. Antiviral çalışmalarda göstermiş ki *Sphagnum* ve *Camptothecium* özütlerinin *Herpes simplex* ve *Poliovirus*lere karşı etkili olduğu bulunmuştur. Antifungal çalışmalar ise birçok karayosunu türünün antifungal etki gösterdiğini göstermekle birlikte, bu etkinin *H. cupressiforme*'de en yoğun olduğu gözlemlenmiştir (21).

Karayosunlarının aktif metabolit bakımından zengin olması, onun antibakteriyel etkisinin yanı sıra antioksidan olarak da kullanılmasını sağlamıştır. Karayosunlarının bünyesinde barındırdığı kendine özgü ve çok çeşitli metabolit grupları onların antioksidan ve diğer terapötik etkilerinden sorumludur. Farmakolojik araştırmalar farklı karayosunlarının sitotoksik, antifungal, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Karayosunlarında antioksidan aktiviteyi sağlayan sekonder metabolitlerin fenolik bileşikler, benzil, mono, di, tri, sekiterpenler ve flavonoidler oldukları düşünülmektedir (29).

Canlı mekanizmalarda oluşan serbest radikaller, proteinlere, nükleik asitlere, DNA'ya membran lipidlerine ve karbohidratlara etki ederek hücre ölümüne neden olmaktadır. Antioksidan bir madde, bu oksidasyonun çeşitli aşamalarında bazı mekanizmalar yoluyla koruyucu özelliklere sahip olan maddelerdir.

Oksijen, yaşam için vazgeçilmezdir ancak vücut içinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri ise metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyon başlatır. Bu nedenle canlı için bir tehdit unsuru halini alırlar (30). Reaktif oksijen türleri düşük dozlarda çeşitli stres tepkilerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda hücresel zarara yol açar (31). Oksidan ve mutajen özellikte olan bu maddeler DNA, protein ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücrenin ölümüne yol açarak kronik hastalıkları başlatır (32). Reaktif oksijen türleri şu şekilde sıralanmaktadır;

1. Radikaller

a. Süperoksit radikal (O_2^-)

b. Alkoksil radikal (LO^-)

- c. Peroksil radikal (LOO·)
- 2- Radikal olmayanlar
 - a. Hidrojen peroksit (H₂O₂)
 - b. Lipid hidroperoksid (LOOH)
 - c. Hipoklorik asit (HOCl)
- 3- Singlet oksijen

Bunların dışında nitrik oksit (NO·) ve nitrojen dioksit (NO₂·) de sayılmalıdır. İkisi de güçlü oksidanlardır. Nitrojen dioksit nitrik oksitin oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir ve oldukça toksiktir. NO₂' nin düşük konsantrasyonlarda bile araşidonik asit metabolizmasını büyük ölçüde artırdığı gözlenmiştir (33,34). 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 (33, 35, 36). Hemen hemen her aerobik hücrenin enerji metabolizmasında, oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucunda oksijen bir elektron alır ve serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelir. Ancak direkt olarak zarar vermez (37).

Özellikle yüksek oksijen kullanımı nedeniyle oksidatif strese karşı zayıf olan beyin, aynı zamanda yüksek düzeylerde Fe²⁺ ve diğer divalent katyonları içermekte ve oluşan Fenton-tip reaksiyonlar reaktif oksijen türleri üreterek nöronlara zarar vermektedir. Nispeten düşük antioksidan savunmasına sahip olan beyin dokusu aynı zamanda oksidatif zararlara karşı dokuyu zayıflatan çoklu doymamış yağ asitlerini de yüksek düzeyde içermektedir. Oksidatif strese maruz kalan beyin dokusunda oluşan hasarların beyin iskemisi, hafıza bulanıklığı, Alzheimer, Parkinson gibi birçok sinirsel bozuklukta önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (38).

Reaktif oksijen türleri, vücutta lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P- 450 gibi birçok enzimin aktivitesinin sonucu olarak da üretilmektedir (38).

Serbest radikal meydana getiren diğer olaylar ise; kontamine içme sularında bulunan, toksik etkili, halojenlenmiş hidrokarbonlar ve hava kirleticileri olarak bilinen azot oksitlerdir. Karbontetraklorür (CCl_4) ve bromotriklorometan (CBrCl_3) gibi hidrokarbonların oksidatif hasarın başlamasında etkili oldukları bildirilmektedir. Triklorometil, triklorometil peroksil radikalleri gibi oldukça reaktif türler, sitokrom P- 450 monooksijenaz enzim sisteminin çeşitli aminoasit ve doymamış yağlarla hızlı reaksiyonu sonucu CCl_4 'ün metabolizması sırasında üretilmekte ve bunun sonucunda protein denatürasyonları ve lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (39).

Serbest radikaller vücudumuzda fizyolojik olaylar sonucunda oluşan doğal ürünlerdir. Genellikle reaksiyonlarda ara ürün olarak ortaya çıkan serbest radikallerin oksijen ile etkileşmesi sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur. Bu nedenle başlıca sebep oksijenli solunum yapmamızdır. Hücre içinde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zincirinden sızıntıdır. Mitokondri iç zarına yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar (40).

Bir diğer önemli hücresel kaynak fagositik hücre membranının NADPH oksidaza bağlı serbest radikal üretimidir. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asit salımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile çeşitli serbest radikal araürünler meydana gelebilir. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine 'enzimatik lipid peroksidasyonu denir', diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise 'non-enzimatik lipid peroksidasyonu' adı verilir (40). Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipoksijenaz ve siklooksijenaz araşidonik asit metabolizmasında görev almaktadırlar (40-42). Aktive olmuş fagositler bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksit üretirler (43-45). Fagositte edilmiş bakteri solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında konak hücreye de zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynarlar (40).

Stres vücutta katekolamin düzeyinin artmasına sebep olur. Katekolaminlerin de otooksidasyonu ile serbest radikal miktarının artması kaçınılmazdır. Bu olay stresin hastalık

etkeni olarak rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olduğunu göstermesi bakımından önemlidir (46).

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Serbest radikal oluşumuna neden olan enzimler oksidatif enzimler olarak adlandırılırlar. Bunlar; ksantinoksidaz, indolamindioksigenaz, triptofandioksigenaz, galaktozoksidaz, siklooksigenaz, lipoksigenaz, monoaminoksidazdır (47).

Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda, örneğin bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürülmesi gibi, organizmaya yararlı olabilir. Bunun yanında fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (48).

Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (40, 49). Bu durum biyomoleküllerin yapılarına zarar vermektedir. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan oksidatif strese ve şiddetine bağlı olarak (46, 58), toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (48).

Serbest radikallerin en belirgin etkileri lipid peroksidasyonuna neden olarak, Diabetes Mellitus'un da aralarında bulunduğu bir dizi hastalığın ortaya çıkmasında rol oynamalarıdır. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenir ancak en hassas olan grup lipidlerdir (29). Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona neden olurlar (41, 43, 50). Bunun sonucunda membran akışkanlığında bozulma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelir (51).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelere antioksidanlar adı verilir (40, 52, 53, 54). Geçmişte yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar yerine günümüzde doğal antioksidanların kullanımı önem kazanmıştır. Özellikle, bu sentetik antioksidanların toksik etkilerinin saptanması ve maliyetlerinin yüksek olması, yeni ve ucuz doğal antioksidan

kaynakları arayışına itmiştir (55). Birçok bitki antioksidan aktiviteye sahip pek çok bileşeni içermektedirler. Bunlar arasında fenolik bileşikler, C vitamini (askorbik asit), E vitamini (tokoferoller ve toketrienoller), başta β -karoten ve likopen olmak üzere karotenoidler ve biyoaktif peptitler sayılabilir. Bitkisel bir materyalden uygun yöntemlerle antioksidan bileşenler etkin bir şekilde ayrılabilir. Çeşitli materyaller içinde antioksidan bileşenlerin varlığını nitel ve nicel olarak gösteren pek çok yöntem vardır. Son zamanlarda toplam antioksidan aktiviteyi belirlemede DPPH yöntemi ve β -karoten renk açılımı yöntemi bitki özütlerinin anlamlı bir şekilde değerlendirilmesinde önerilmektedir (56-58).

Karayosunlarının antioksidan aktivitesi birçok sebzedden yüksek olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda ciğerotlarının antioksidan etkisinin yüksek olması gelecekte ilaç ve kozmetik ürünlerin hazırlanmasında büyük önem arz eder. Geleneksel tıpta karayosunları cilt hastalıklarının tedavisinde, inflamasyon gidermede ve antiviral olarak kullanılmaktadır (56, 57).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Araştırmada Kullanılan Karayosunu Örnekleri

Bu araştırmada kullanılan *Bryum capillare*, *Hypnum andoi*, *Plagiomnium undulatum*, *Bryum radiculosum* karayosunu örnekleri Kastamonu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER tarafından temin edilmiştir. Teşhis işlemleri Dr. Kerem CANLI tarafından yapılmıştır. Arazi çalışması yapılan yerler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Arazi çalışması yapılan lokaliteler.

Karayosunu örnekleri	Arazi çalışması yapılan lokaliteler
<i>B. capillare</i>	Kastamonu, Yaralıgöz Dağı
<i>H. andoi</i>	Kastamonu, Yaralıgöz Dağı
<i>P. undulatum</i>	Kastamonu, Yaralıgöz Dağı
<i>B. radiculosum</i>	Kastamonu, Yaralıgöz Dağı

3.1.2. Karayosunu Örneklerinin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

Bu aşamada kullanılan örnek maddenin çözücüye oranı 1:10 (mL. mg⁻¹) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bileşenin adı	Miktarı
Etanol	100 rpm

3.1.3. Mikroorganizmaların İnokulasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Broth (Merck)

Bileşenin adı	Miktarı
Nutrient Broth (Merck)	13,0 g
Distile Su	1000 mL

Besiyeri 2. Nutrient Agar (Merck)

Bileşenin adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	28,0 g
Distile Su	1000 mL

Ticari olarak alınan besiyerinin 28 g 1000 mL distile su içinde çözüldükten sonra 121⁰C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bakteriyel organizmalar için kullanılmıştır.

Besiyeri 3.

Bileşenin adı	Miktarı
YPD Broth (Merck)	50,0 g
Distile Su	1000 mL

Besiyeri 4.

Bileşenin adı	Miktarı
Yeast Extract Agar (Merck)	65,0 g
Distile Su	1000 mL

Ticari olarak alınan besiyerinin 65 g 1000 mL distile su içinde çözüldükten sonra 121⁰C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Mayalar için kullanılmıştır.

3.1.4. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), Tween 40, dimethylsulphoxide (DMSO), ethyl acetate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), β -carotene, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulphonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine), iron (II) chloride (FeCl₂), gallic acid, butylated hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), α -tocopherol and linoleic acid (Sigma).

3.2. METOT

3.2.1. KARAYOSUNU ÖRNEKLERİNİN EKSTRAKSİYONU

Örnekler toplandıktan ve Dr. Kerem Canlı tarafından teşhis edildikten sonra açık havada kurutuldu ve kuru örnekler havan ile dövüldü. Ekstraksiyon çözücüsü olarak Etanol (Merck, Germany) kullanıldı. Örnekler 100 rpm’de 3 gün oda sıcaklığında etanol içinde çalkalandı. 3 günün sonunda özütler Whatman No.1 ile filtre edildi ve evaporatörde (Heidolph Hei-Vap Value HL/HB-G1) 30°C’de uçurma işlemi yapıldı. Evaporasyon sonrası kalıntılar biriktirilerek örnek maddenin çözücüye oranı 1:10 (mL. mg⁻¹) olacak şekilde ayarlandı.

3.2.2. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

Bitki özütlerinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri Klinik Laboratuar Standartları Ulusal Komitesi’ne göre disk difüzyon metodu ile test edilmiştir (NCCLS, 1997) (59). Denemeler sonrası çıkan sonuçlar referans diskleri ile karşılaştırılmıştır.

Deneylerde *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 04019 suşları kullanılmıştır.

3.2.2.1. Özütlerin disklere emdirilmesi

6 mm’lik boş, steril antibiyotik disklerine 20 µL özüt emdirilmiştir. Emdirilen örnek miktarının kontrolü için değişik miktarlarda özütler disklere emdirilmeye çalışılmıştır. Disklerin 30 µL üzerindeki örneği ememediği, örneklerin bir kısmının disklerin dışına taşıdığı ve burada kuruduğu gözlenmiştir. Diskler, 30 µL üzerinde özütü uygun bir şekilde ememediği için bu miktarın kullanılması uygun olmamıştır. Ayrıca yapılan karşılaştırmada 30 µL emdirilmeye çalışılan diskler ile 20 µL emdirilmiş diskler arasında etki bakımından çok fazla bir fark olmadığı gözlemlendiği için disklere 20 µL özüt emdirilmesine karar verilmiştir. Özütlerin emdirildiği diskler antimikrobiyal etkiyi etkileyecek çözücülerin diskler üzerinde kalmaması için bir gün kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2.2. Mikroorganizmaların standardize edilmesi

Disk difüzyon yöntemi kullanmadan önce, bakteri örnekleri 0,5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak standardize edilmiştir. Bakteri kültürleri öncelikle izole koloniler elde etmek amacıyla agar ortamına ekilmiş, 37 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra 4-5 tane iyi izole olmuş koloni, öze yardımıyla % 0,9’luk serum fizyolojik içine alınmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu, daha önce hazırlanmış olan 0,5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak süspansiyonun bulanıklığı ayarlanmıştır.

3.2.2.3. Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin test edilmesi ve Besi yerlerinin inokülasyonu

Besi yerine mikroorganizma inokülasyonu için mikroorganizma süspansiyonuna steril eküvyon batırıldıktan sonra, besi yerinin her yerine eküvyonla süspansiyon yayılmıştır. Mikroorganizma süspansiyonu yayılan petriler, diskler uygulanmadan önce 5 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra, diskler besi yerinin üzerine 10 dakika içinde uygulanmıştır.

3.2.2.3.1. Disklerin yerleştirilmesi

Etken maddeleri içeren diskler, besi yerinin üzerine iyice yerleştirilmiştir. Disklerin tamamının agar üzerine dokunmuş olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmada 120 mm’lik steril petri kapları kullanılmıştır ve bu petri kaplarına toplam 1’er adet antibiyotik diski konmuştur.

3.2.2.3.2. İnkübasyon

Diskler uygulanmış petri kapları, inokülasyonu takip eden 15. dakikada inkübe edilmeye başlanmıştır. Bakteriler 37 °C’de 24 saat süre ile, mayalar ise 30 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir.

3.2.2.3.3. İnhibisyon zonlarının ölçümü

İnkübasyon süresi sonucunda oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçülerek zon çapları mm (milimetre) olarak kaydedilmiştir. Petri kapları + 4 °C’de saklanmıştır.

Negatif kontrol olarak dimetil sülfoksit (DMSO) emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Bu disklerin bütün bakteriler üzerine etkisi incelenmiş; sonuç olarak, çözücü emdirilmiş disklerden çözücüler buharlaştırıldıktan sonra disklerin mikroorganizmalar üzerine etki göstermediği gözlenmiştir. Ayrıca, boş antibiyotik disklerinin de mikroorganizmalar üzerine etkisi olmadığı yapılan denemeler sonucunda gözlenmiştir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan Eritromisin ve Nistatin antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

3.2.3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

3.2.3.1. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri Blois (1958) metodu (60) kullanılarak spektrofotometrik olarak DPPH serbest radikali üzerinden tayin edilmiştir. % 0,004metanol içerisinde hazırlanmış örnek çözeltisi üzerine DPPH çözeltisi ilave edilerek vortexde karıştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm de absorbans değerleri okunmuştur. DPPH standartı kullanılarak hazırlanmış olan aşağıdaki kalibrasyon denklemi kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (I%) hesaplanmıştır.

$$I\% = ([A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}] / A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

Testler üç paralel çalışılmış ve BHA, sentetik antioksidanlar olup pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Sonuçlar IC₅₀ değeri olarak µg. mL⁻¹ cinsinden verilmiştir.

3.2.3.2. Total Fenol Miktar Tayini

Karayosunu özütlerinin toplam fenolik içeriği Singleton and Rossi (1965) prosedürü temel alınıp modifiye edilen Folin Ciocaltaeu metoduna göre belirlenmiştir (61). Çalışmanın bu bölümünde, standart olarak kullanılan gallik asit ve diğer numunelerin (karayosunu özütleri)

çözeltileri hazırlanırken, çözücü olarak % 70'lik metanol kullanılmıştır. 0,1 mL numune 100 mL'lik dereceli kapaklı erlene konur ve hacmi distile su ile 46 mL'ye tamamlanır. Daha sonra 0,2 mL %50'lik Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edildikten 3 dakika sonra 1 mL % 2'lik Na₂CO₃'ın sulu çözeltisi ilave edilir ve karıştırıcıda oda sıcaklığında 45 dakika karıştırılır. Bu süre sonunda numunelerin absorbensları 760 nm'de ölçülmüştür. Gallik asit çözeltilerinin absorbens değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak, her numunenin toplam fenolik madde içeriği mg gallik asite eşdeğer olacak biçimde belirlenmiştir.

3.2.3.3. Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesi Decker ve Welch metodu bazı modifikasyonlar kullanılarak tayin edilmiştir (62). Kısaca, 0,5 mL karayosunu özütü 0,05 mL 2 mM FeCl₂ ve 1 mL 0,5 mM ferrozin ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 562 nm'de absorbens değerleri ölçülmüştür.

Ferrozin- Fe²⁺ kompleksinin inhibe yüzdesi aşağıdaki formüle kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = ([A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}] / A_{\text{Kontrol}}) \times 100$$

3.2.3.4. Lipid Peroksidasyon İnhibisyonu

Plasma lipid peroksidasyonu Rodriguez ve Ruis-Torres metodu kullanılarak analiz edilmiştir (63). Kan plasma örneği (0,4 mL), 0,1 mL 0,5 mM FeSO₄, 0,1 mL H₂O₂ 0,5 mM ve 0,2 mL karayosunu ekstraksiyonu (2 mg. mL⁻¹) karıştırılıp 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışıma 375 µl trikloro asetik asit (%4) ve 75 µL BHT ilave edilerek buz içinde 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 5000 rpm'de 15 dakikalık santrifüj sonrası 0,2 mL % 6'luk TBA ilave edilmiştir. Bu karışım 95°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Karışım ile aynı hacimde 1-butanol ilave edilmiş ve 517 nm'de ölçümler yapılmıştır.

3.2.4. Kimyasal Kompozisyon Belirleme

Karayosunu örnekleri kimyasal bileşimleri (nem, protein, yağ, karbohidrat ve kül) AOAC prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir (64). Nem içeriğinin tespiti; öncelikle cam petri kapları 105°C’de sabit tartıma getirilmiştir. Kuru örnekler tartıldıktan sonra (0,1 mg duyarlılıkla) sıcak hava fırınında 105°C’de 6 saat bekletilmiştir. 6 saatin sonunda desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Sabit ağırlık tespit edilene kadar ısıtma ve soğutma işlemleri tekrarlanmıştır.

Kül miktarı tayini; porselen krozeler sabit tartıma getirildikten sonra kuru örnekler tartılmıştır ve krozelerde bulunan örnekler kül fırınında 600 °C’de 2 saat bekletilmiştir. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra sabit tartıma gelene kadar tekrar tartılmıştır.

Organik Madde = Kuru Madde - Ham Kül

Ham protein tespiti; Kjeldahl Metodu ile organik azot miktarının belirlenmesi analizi yapılmıştır. Kuru örnek tartılmıştır. 10 mL saf su ve H₂SO₄ eklenerek 15 dk ısıtılmıştır. Soğuduktan sonra fenolftalein indikatörü damlatılarak % 8’lik NaOH’dan renk pembe oluncaya kadar ilaveler yapılarak nötrleşme sağlanmıştır. İşlem sırasında amonyanın uçmaması için çözelti çalkalanmamıştır. Bir erlende 0,1 M HCl içine damıtılmıştır. Kabarcık bitene kadar ısıtmaya devam edilmiştir. 0,1 M NaOH ile fenolftalein indikatörü damlatılarak titrasyon yapılmıştır. Sarfiyat hesaplanmıştır.

Ham yağ tespiti; Eter, kloroform, benzen, toluen gibi organik çözücüler kullanılarak özüte edilmesiyle belirlenir. Özütten eter ve su arındırıldıktan sonra kalan kısım örnekteki ham yağı verir. Yağın yanında yağda eriyen vitaminler, organik asitler, klorofil, lesitinler, alkaloidler, mumlar, reçineler, sterinler ve fosfatidleri de içerdiğinden ham yağ adını alır. Ham yağ tayininde Soxhlet cihazı ve çözücü olarak eter kullanılmıştır. 60 °C’de sabit tartıma getirilmiş 250 mL’lik bir balon kullanılmıştır. Kuru örnekler eter ile soxlet cihazında ekstrakte edildikten sonra çözücü 60 °C’de uçurulmuştur.

Ham karbohidrat tespiti; kuru örnekler asit ve baz ile dilüe edildikten sonra sıcak hava fırınında 105 °C’de bekletilmiştir. Desikatörde soğutulduktan sonra son ağırlığı tespit edilmiştir (65).

4. BULGULAR

1. Antimikrobiyal Aktivite

Yapılan deneyler sonucunda *Bryum capillare*, *Hypnum andoi*, *Plagiomnium undulatum*, *Bryum radiculosum* özütlerine ait disk difüzyon değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Tablo 1. Karayosunu özütlerinin antimikrobiyal testi sonuçları (mm, inhibisyon zon çapı)

Şuşlar	Karayosunları				Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol
	<i>B. capillare</i>	<i>H. andoi</i>	<i>P. undulatum</i>	<i>B. radiculosum</i>	Nistatin	Eritromisin	DMSO
<i>B. subtilis</i>	12 ±3	12 ±2	16 ±3	10 ±0,5	ND	36	NI
<i>S. enteritidis</i>	11 ±1	NI	NI	NI	ND	42	NI
<i>E. coli</i>	NI	14,5 ±1,5	NI	14 ±0,5	ND	9	NI
<i>S. aureus</i>	10 ±1	10 ± 1	10 ±0,5	10 ±1	ND	20	NI
<i>C. albicans</i>	13 ±1	NI	NI	NI	10	ND	NI
<i>C. glabrata</i>	12,5 ±0,5	11 ±1	17,5 ±4,5	17 ±6	9	ND	NI

NI: İnhibisyon yoktur.

ND: Çalışılmamıştır

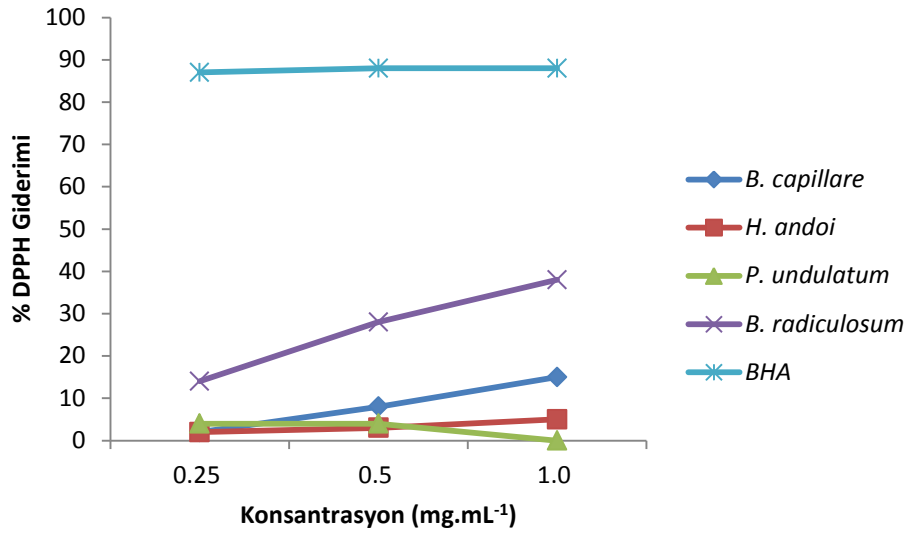
2. Antioksidan Aktivite

Yapılan deneyler sonucunda *B. capillare*, *H. andoi*, *P. undulatum*, *B. radiculosum* özütlerine ait serbest radikal süpürücü etkileri, total fenol miktarı, metal şelatlama aktivitesi ve lipid peroksidasyon inhibisyonuna ait değerleri aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Tablo 2. Karayosunu fraksiyonlarının DPPH radikali üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri

Karayosunları	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	% DPPH Giderimi		
		0,25 mg.mL ⁻¹	0,5 mg.mL ⁻¹	1,0 mg.mL ⁻¹
<i>B. capillare</i>	8,41	2	8	15
<i>H. andoi</i>	33,11	2	3	5
<i>P. undulatum</i>	46,00	4	4	—*
<i>B. radiculosum</i>	4,08	14	23	38
BHA	0,3	87	88	88

* Örnek az olduğu için 1,0 mg.mL⁻¹ konsantrasyonu çalışılmamıştır.



Şekil 2. Karayosunu fraksiyonlarının DPPH radikali üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri

Tablo 3. Karayosunu türlerinin toplam fenol, askorbik asit, α tokoferol ve folik asit miktarı

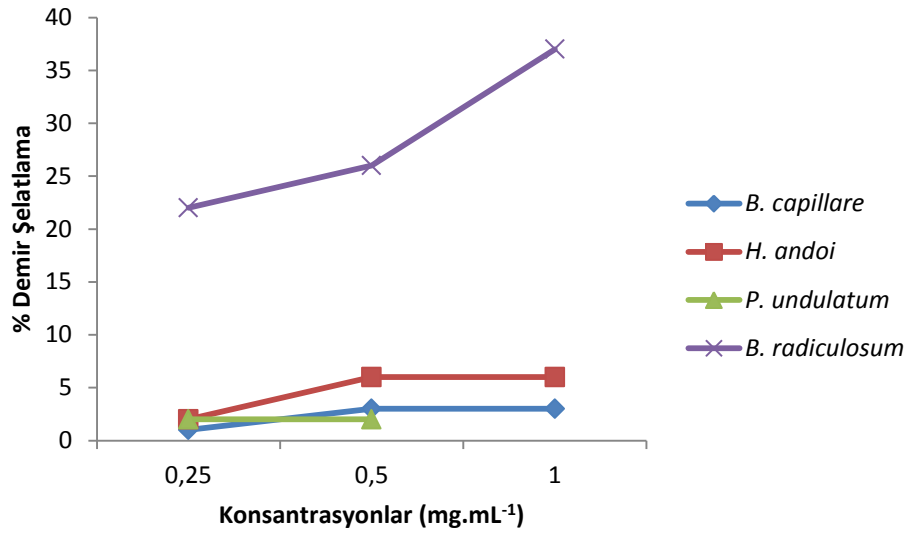
Karayosunları	Total Fenol (mg.g ⁻¹)	Ascorbik Asit (µg.mL ⁻¹)	α tokoferol (µg.mL ⁻¹)	Folik Asit (µg.mL ⁻¹)
<i>B. capillare</i>	23,26	1,87	<0,5	_*
<i>H. andoi</i>	15,39	_*	_*	_*
<i>P. undulatum</i>	24,99	_*	_*	_*
<i>B. radiculosum</i>	20,33	_*	_*	_*

* Örnek az olduğu için çalışılmamıştır.

Tablo 4. Karayosunu türlerinin metal şelatlama aktivitesi

Karayosunları	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	%Demir Şelatlama		
		0,25 mg.mL ⁻¹	0,5 mg.mL ⁻¹	1,0 mg.mL ⁻¹
<i>B. capillare</i>	49,67	1	3	3
<i>H. andoi</i>	24,67	2	6	6
<i>P. undulatum</i>	52,00	2	2	_*
<i>B. radiculosum</i>	4,89	22	26	37

* Örnek az olduğu için 1,0 mg.mL⁻¹ konsantrasyonu çalışılmamıştır.

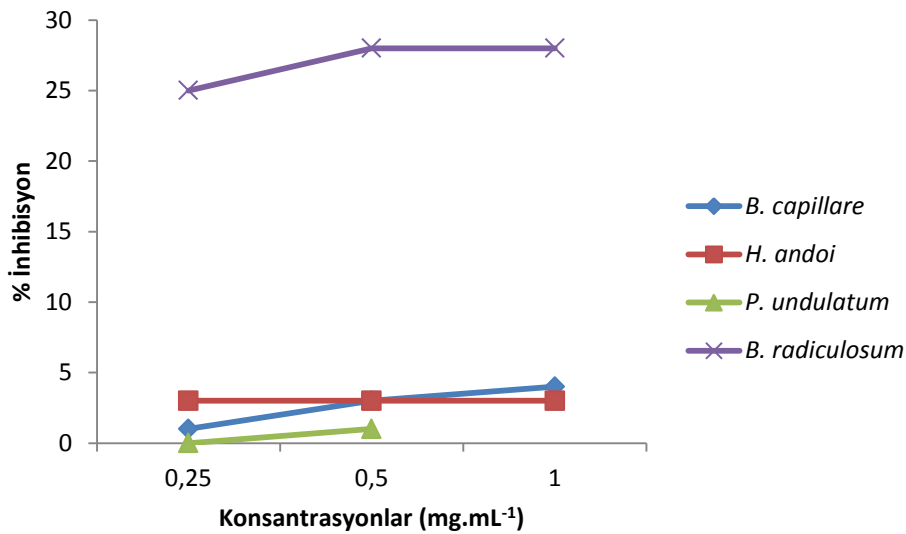


Şekil 3. Karayosunu fraksiyonlarının metal şelatlama etkileri

Tablo 5. Karayosunu türlerinin lipid peroksidasyon inhibisyonu

Karayosunları	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	% İnhibisyon		
		0,25 mg.mL ⁻¹	0,5 mg.mL ⁻¹	1,0 mg.mL ⁻¹
<i>B. capillare</i>	33,56	1	3	4
<i>H. andoi</i>	47,00	3	3	3
<i>P. undulatum</i>	50,33	0	1	—*
<i>B. radiculosum</i>	17,33	25	28	28

* Örnek az olduğu için 1,0 mg.mL⁻¹ konsantrasyonu çalışılmamıştır.



Şekil 4. Karayosunu fraksiyonlarının lipid peroksidasyon inhibisyonu

3. Kimyasal Kompozisyon Analizi

Yapılan deneyler sonucunda *B. capillare*, *H. andoi*, *P. undulatum*, *B. radiculosum* özütlerine ait kimyasal bileşenlerine ait değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Table 6. Karayosunu türlerinin kimyasal kompozisyonu (% dry weight)

Bileşenler	<i>B. capillare</i>	<i>H. andoi</i>	<i>P. undulatum</i>	<i>B. radiculosum</i>
Nem içeriği	10,1±0,03	11,2±,01	11,5±0,03	11,5±0,01
Ham protein	7,1±0,02	5,3±0,02	4,6±0,01	7,8±0,01
Ham yağ	2,3±0,01	2,2±0,01	1,7±0,01	1,4±0,03
Kül miktarı	1,5±0,01	0,8±0,03	1,0±0,01	1,2±0,01
Total karbohidrat	6,2±0,02	3,3±0,01	3,2±0,02	7,1±0,02

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, *Bryum capillare*, *Hypnum andoi*, *Plagiomnium undulatum*, *Bryum radiculosum* özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidan etkisinin ve kimyasal kompozisyonunun incelenmesidir. Bu amaçla antimikrobiyal aktivite için önce disk difüzyon testi uygulanmıştır. Bu testte, özütler steril ve boş antibiyotik disklerine emdirildikten sonra diskler, mikroorganizma kültürleri üzerinde denenmiştir. Mikroorganizma üzerinde etki gösteren özütler, besi yerlerinde inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu inhibisyon zonlarının çapı milimetre olarak kaydedilmiştir ve sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre *C. albicans* üzerine çalışılan karayosunlarından yalnızca *B. capillare* etki gösterirken *C. glabrata* üzerine tüm karayosunu türleri referans antibiyotiğin neden olduğu etkiden daha yüksek etki göstermişlerdir. *E. coli* üzerine *H. andoi* ve *B. radiculosum* özütleri referans antibiyotikten daha yüksek etki göstermiştir. *B. subtilis* ve *S. aureus* üzerine dört tür karayosununun da etki gösterdiği gözlenmiştir. Ancak gözlenen etki referans antibiyotiğinin neden olduğu etkiden çok düşüktür.

Antimikrobiyal maddeler, bakteri ve mantarları öldürücü (letal) veya bunların üremesini baskılayıcı etki gösterirler. Yapılan çalışmada sonuçlar standart antibiyotik testleri ile karşılaştırılmıştır. Karayosunu özütlerinin etki gösterdiği mikroorganizmalara karşı standart antibiyotik testlerinin etkisine ait veriler de Tablo 1'de bulunmaktadır. Ayrıca, yapılan testler sonucunda, negatif kontrollerin (DMSO ve steril boş disk) herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Elibol (2010)'da yapmış olduğu bir çalışmada çalışmış olduğu mayalardan *C. albicans*'ın karayosunu özütlerine karşı dirençli iken *S. cerevisiae*'nın karayosunu özütlerine karşı daha duyarlı olduğunu görmüştür. Yaptığı çalışmalar sonucunda karayosunu türü olan *Orthotrichum rupestre*, *B. capillare*, *Syntrichia ruralis* ve *Tortella turtuosa*, *Grimmia anadon*'nın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu görmüştür. En düşük antimikrobiyal aktivite gösteren *T. turtuosa*'nın ise *C. albicans* suşuna karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur (4).

Çolak (2010) yaptığı bir çalışmada *H. cupressiforme* karayosunu türünün *C. albicans* referans mayasına etki ederken, etil alkol özütü *E. coli* referans bakterisine etki göstermiş olup en fazla kloroform özütünde antimikrobiyal aktiviteye rastlanmıştır. *H. sericeum* türünde ise en yüksek antimikrobiyal etki aseton özütüyle *P. aeruginosa* 'ya karşı gözlenmiştir (2).

Russell ve Ellis (2007)'in yaptıkları çalışmada etanol ve metanolde hazırlanan *Sphagnum palustre*, *Bartramia porniformis*, *Leucolepsis acanthoneuron*, *H. splendens*, *Atricum selwynii*, *Polytrichostrium alpinum* isimli karayosunu türlerinin antimikrobiyal aktivitesi *E. coli*, *B. subtilis* ve *Klebsiella pneumoniae* ' ye karşı değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda etanol ekstraksiyonu kullanıldığında karayosunlarının % 65' i antibiyotik aktivitesi gösterirken metanol ekstraksiyonunda karayosunlarının % 43'i aktivite gösterdiği görülmüştür (66).

Singh ve arkadaşları (2007)'nin yaptıkları bir çalışmada *Sphagnum junghuhnionum*, *Barbula javanica*, *Brachythacium rutabulum*, *Macrothamnium submacrocarpum*, *Trachypodopsis serrulata*, *Crataneuron filicinum*, *Mnium marginatum*, *Entodon pulchellus*, *Entodon rubicundus*, *Physcomitrium pulchellum*, *Barbula arcuata*, *Thuidium cymbifolium* ve *Anoetangium stracheyonum* karayosunu türleri etanolde özüte edilip antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri 19 adet mikroorganizma için mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda *S. junghuhnionum*, *B. Javanica*, *B.arcuata*, *B.rutabulum*, *M. marginatum* ve *E. Rubicundus* türlerinin tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal olarak en aktif tür olduğu bulunmuştur (67).

Başaran ve arkadaşları (2011)'nin yaptıkları bir çalışmada *G. pulvinata*, *Tortula subulata*, *Wersia controversa*, *Leucodon sciuroides*, *H. cupressiforme*, *Homalothecium sericum*, *Neckera complanata* ve *Mnium undulatum* karayosunu türlerinin disk difüzyon yöntemiyle çeşitli gr (-) bakteri, gr (+) bakteri ve 3 zararlı mantara karşı antimikrobiyal aktivitesi ölçüldüğünde karayosunlarının metanol özütleri zayıf bir antifungal etki gösterip gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı çoğunlukla orta derece antibiyotik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. En duyarlı mikroorganizmaların gram pozitif *B.subtilis* ve gram negatif *P. aeruginosa* olduğu bulunmuştur (68).

Yapılan birçok yeni araştırmada karayosunlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Karayosunlarının aktif metabolit bakımından zengin olması, onun antibakteriyel

etkisinin yanı sıra antioksidan olarak da kullanılmasını sağlamıştır. Karayosunlarının bünyesinde barındırdığı kendine özgü ve çok çeşitli metabolit grupları onların antioksidan ve diğer terapötik etkilerinden sorumludur. Farmakolojik araştırmalar farklı karayosunlarının sitotoksik, antifungal, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Karayosunlarında antioksidan aktiviteyi sağlayan sekonder metabolitlerin fenolik bileşikler, benzil, mono, di, tri, sekiterpenler ve flavonoidler oldukları düşünülmektedir (29).

Çalışmamızda antioksidan aktivitenin tespiti için karayosunu özütlerinin serbest radikal süpürücü etkileri, total fenol miktarı, metal şelatlama aktivitesi ve lipid peroksidasyon inhibisyonu test edilmiştir.

Etanolik fraksiyonlar ve standart (BHA)'ın serbest radikal süpürücü etkileri stabil bir serbest radikal olan DPPH üzerinde test edilmiştir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. 515 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda, örneğin bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürülmesi gibi, organizmaya yararlı olabilir. Bunun yanında fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (48). Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (40, 49). Bu durum biyomoleküllerin yapılarına zarar vermektedir. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan oksidatif strese ve şiddetine bağlı olarak , toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (41, 48). Serbest radikal süpürücü etki sonuçları 30 dakika içerisinde DPPH'nin %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olarak (IC_{50}) hesaplanmıştır. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir (57). Bu çalışmada test edilen fraksiyonların ve standartların DPPH üzerinden hesaplanan IC_{50} değerleri ve serbest radikal süpürücü etki arasındaki ilişki Tablo 2'de görülmektedir. Tüm fraksiyonlarda sentetik antioksidan olan BHA'ya göre daha düşük oranda serbest radikal süpürücü etki gözlenmiştir. Buna göre çalışılan karayosunu türlerinden en düşük IC_{50} değeri ile standarta en yakın değer *B. radiculosum* özütünde bulunmuş olup bu değer en yüksek antioksidan aktiviteye sahip karayosunu olduğunu ifade eder.

Fenol ve flavonoidler: antioksidatif aktivitelerini oksidatif enzimleri inhibe ederek, metal iyonlarıyla şelat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek ve serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler (25). Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde kullanılan standart bileşik gallik asittir. Toplam fenol miktarı yüksek olan fraksiyonlarda antioksidan aktivite de yüksek olarak bulunmuştur. En yüksek toplam fenolik içeriğe sahip *P. undulatum* türünün serbest radikal süpürücü etkisi sentetik bir antioksidan olan BHA 'den çok daha düşüktür. Buna göre çalışmamızda elde ettiğimiz değerler IC₅₀ değeri ile fenolik içerik arasında bir korelasyon olduğunu göstermemektedir (Tablo 3).

Demir ve bakır gibi geçiş metalleri serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar. Demir oksidatif reaksiyonları teşvik etmede daha etkilidir (50). Tablo 4'de de görüldüğü gibi *B. radiculosum* türü en düşük IC₅₀ değerine ve en yüksek % demir şelatlama aktivitesi göstererek en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Konsantrasyon miktarı arttıkça demir şelatlama kabiliyetide artmıştır.

Peroksidasyon bir metilen grubundan bir hidrojen atomunu yerinden çıkaran herhangi bir radikal tarafından başlatılabilir. Oksijen peroksil radikalini oluşturmak için karbon radikaline eklenir ve sonuçta diğer lipid molekülünden bir H atomunu çıkararak lipid hidroksili oluşturur. Bu yeniden düzenleme ile endoperoksitler daha ileri derecede oksidasyon sonucunda ise melandialdehit oluşabilir (11, 63). Melandialdehit hücre membranlarında iyon alışverişine etki ederek bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitelerinin değişimi gibi olumsuz sonuçlar meydana gelir (63). Tablo 5'de de görüldüğü gibi her üç antioksidan testte en iyi sonuç *B. radiculosum* karayosunundan alınmış ve testler birbirini destekler özellikte olmuştur. Tablo 5 'e göre en yüksek lipid peroksidasyon inhibisyonu *B. radiculosum* türünde gözlenmiş ve en düşük IC₅₀ değerine sahip olması da bunu desteklemiştir.

Diğer karayosunu türlerinden elde edilen sonuçlar birbirini desteklememiştir. Halbuki antioksidan aktiviteyi tespit edebilmek için en az üç antioksidan test sonuçları birbirini desteklemeli ve sonuçlar standartlar ile karşılaştırılmalıdır (39). Bu açıdan, bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre *B. radiculosum* türünün antioksidan kapasitesi; diğer karayosunu türlerinden daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Chobot ve arkadaşları tarafından 2006 yılında beş karayosunu türünün antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Bu araştırmada karayosunlarının toplam fenolik içeriği ve antioksidan etkisi arasında ilişki bulunup bulunmadığı in vitro ortamda incelenmiştir. Bu çalışmada *Ceratodonpurpureus* (Hedw.) Brid. (Dicronaceae), *Dicranumpolysetum* Sw., *Dicranumscaparium* Hedw. (Dicronaceae), *Leucobryumglaucum* (Hedw.) Angstr. (Leucobryaceae) ve *Mnium marginatum* (With.) P. Beauu. (Mniaceae) karayosunu türleri kullanılmıştır. Antioksidan aktivite ölçmeden önce tespit edilen karayosunu türlerinin bileşimi bulunmuştur. Çalışma sonucunda *C.purpureus*'da; lipidler flavonoidler, *D.polysetum*'da; lipidler ve asetlenik asit, *D.scaparium*'da; lipidler, asetlenik asit ve flavonoidler, *L.glaucum*'da steroller, *M.marginatum*'da ise terpenler bulunmuştur. Antioksidan aktivite ile karayosunun fenolik içeriği arasında ilişkiyi belirlemek için Folin-Ciocalteau reaktifi kullanılmıştır. Antioksidan aktiviteyi bulmak için kafeik asit pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır. Deney sonuçları incelendiğinde karayosunlarının incelenen tüm türlerinin kafeik aside oranla antioksidan aktivitesinin düşük çıktığı gözlenmiştir. Ancak kafeik asitten düşükte olsa antioksidan aktivite bulunmuştur. *C. purpureus* ve *D. polysetum* özleri çalışılan konsantrasyon aralığında hidroksil radikallerinin bozulması üzerine herhangi bir etki göstermemiştir. Çalışma sonucunda karayosunu özlerinin incelenen etkilerinin önemli ölçüde toplam fenolik içeriği ile ilişkili olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte araştırmacılar çeşitli bileşenlerin sinerjik ve ya antagonistik etkilerinin antioksidan aktiviteyi değiştirebileceğini önemle vurgulamıştır (69).

Basile ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan araştırmada karayosunu türü olan *Leptodictyum riparium*' un doku ve hücrelerinde ağır metallerin lokalizasyonunu görmeleri karayosunun antioksidan aktivitesinin olabileceğini düşündürmüştür. Daha öncesinde *Pleurochate squarrosa* üzerinden yapılan araştırmalarda bu karayosunu türünün aseton özütünün antioksidan etkisinin ortaya çıkması *Leptodictyum riparium*'un antioksidan etkisinin araştırma yapılmasını sağlamıştır. *Leptodictyum riparium*'un aseton özütünün insan kan lökositlerinde antioksidan etkisi araştırılmış ve bu araştırmada CL (Chemiluminescence tahminleri) tekniği ile belirlenmiştir. Bu tekniğin seçilme nedeni hızlı ve hassasiyetinin yüksek olmasıdır. Bileşiklerin antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi belirlenirken insan kan fagositlerinin oksidatif metabolizması üzerinde özütlerin etkileri araştırıldı. Bu çalışmada *Leptodictyum riparium*'un seçilme nedeni bakteri filtrasyonu kötü metalurjik kökenli bir

ortamda yetişmiş tür olmasıydı. Çalışmada karayosununun antioksidan aktivitesi üzerinde iki ağır metal kurşun ve kadmiyum, tuzluluk, ısının etkisi ve farklı streslere karşı dirençleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda karayosunlarının çevresel faktörlere dirençli ve reaktif oksijen bileşiklerine karşı etkili olduğu görülmüştür (5).

Karayosunlarının doğada bol miktarda bulunmasına rağmen kimyasal kompozisyonlarına yönelik özellikle karbohidrat, lignin, protein, lipid ve diğer temel yapı elementlerinin tespit çalışmaları oldukça düşüktür. Yapılan bazı çalışmalarda lignin miktarı düşük iken karbohidrat içeriğinin önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (70-72).

Klavina ve arkadaşlarının 2012 yılında FT-IR ve GC/MS ile bazı karayosunu türlerinin kimyasal kompozisyonunu belirlemişlerdir. İkincil metabolitlerin belirlenmesine yönelik olan bu çalışmada Spagnum türleri arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Buna göre baskın bileşikler olarak düşük molekül ağırlıklı, karbohidrat ve polifenolik yapıda alifatik bileşikler olan fenol ve 4-ethenylphenol ve 1,6-anhidro-β-D-glukopiranoz tespit edilmiştir (73).

Bu çalışmada, karayosunlarının ortalama kül, nem, total karbohidrat, ham yağ ve ham protein miktarları tespit edilmiştir. Sonuçlara göre en yüksek ham protein ve total karbohidrat içeriği sırasıyla % 7,8 ve % 7,1 olarak *B. radiculatum* türüne ait özütlerden elde edilmiştir. En yüksek ham yağ ve mineral içeriğinin bir göstergesi olan kül miktarı *B. capillare* türüne ait özütlerden sırasıyla % 2,3 ve % 1,5 olarak elde edilmiştir. genel olarak besin değerleri incelenen karayosunu türleri arasında büyük oranda farklılık göstermemiştir. Mevcut sonuçlara göre, bu çalışmadaki karayosunu türleri tüketim için iyi bir kaynak olarak önerilebilir.

Bu çalışma göstermektedir ki, gelecekte karayosunu özütlerindeki etkin maddeler tespit edildiği takdirde, günümüzün büyük problemi olan mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı dirençliliğine çözüm olarak karayosunlarını da antimikrobiyal ilaç üretiminde iyi ve yeni kaynaklar olarak karşımıza çıkarabilir. Ayrıca günümüzde kanser hastalığı ve kanser riski arttıkça doğal antioksidanlara olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Araştırmalarda karayosunlarında antioksidan aktivitenin bulunması ve doğal antioksidan arayışı karayosunlarına olan ilgiyi arttırmaktadır. Daha ileride karayosunları ile yapılacak olan pek çok araştırma doğal antioksidan bileşiklerinin saptanması ve saf olarak eldesi ile bu

bileşiklerin ilaç, kozmetik ve gıda sektöründe kullanılması, böylelikle hücrel savunmayı artırıcı yeni ve daha etkili bileşikler elde edilebilmesini olanaklı kılacaktır. Sonuç olarak karayosunları birçok hastalığın oluşumu, ilerlemesi ve tedavisinde umut verici olabilir ve yaşlanma etkeni olan oksidatif stres baskılanarak yaşlanma süreci yavaşlatılarak daha uzun ve daha sağlıklı bir yaşam mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

1. Aydın E. Bazı *Salvia* Genusu Üyelerinin *Acanthamoeba Castellanii* Tedavisindeki Kullanım Potansiyelleri ve Sitotoksik Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas 2008
2. Çolak E., Bazı Pleurokarpik Karayosunlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde 2010.
3. Yiğit D, Aktaş N, Özgen E..Ceviz (*Juglans regia* L.)'in Antimikrobiyal Aktivitesi, Türk Mikrobiyal Cemiyeti Dergisi 2009; 1-2: 7-11.
4. Elibol B. Bazı Akrokarpik Karayosunlarının Antifungal ve Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde 2010.
5. Basile A, Giardano S, Lopez-Sa'ez JA, Cobianchini CR. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 1999; 52: 1479-1482.
6. Glime JM, Saxena DK. Uses of Bryophytes. Today and Tomorrow Printers and Publishers, New Delhi, India 1990.
7. Dülger B, Hacıoğlu N, Uyar G. Evaluation of antimicrobial activity of some mosses from Turkey. *Asian Journal of Chemistry* 2009; 5 (21):4093-4096.
8. Ezer T. Guney Amanos dağları (Musa dağı) karayosunu florası ve epifitik karayosunu vejetasyonunun araştırılması, Doktora tezi, Cukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2008.
9. Schofield WB. Introduction to bryology, The Blackburn Press, 431, 2001.
10. Heinrichs J, Gradstein SR, Wilson R, Schneider H. Towards A Natural Classification Of Liverworts (Marchantiophyta) Based On The Chloroplast Gene Rbcl, *Cryptogamie Bryologie*, 2005; 2 (26): 131-150.
11. Canlı K, Şimşek Ö, Ursavaş S, Çetin B. Karagöl (Çubuk, Ankara) Mesire Alanının Karayosunu (Bryophyta) Florası, *Makufebed*. 2011; 4: 38-49
12. Alves TMD, Silva AF, Brandao M, Grandi TSM, Smania EDA, Junior AS and Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2000; 95:367-373.

13. Heinrichs J, Anton H, Gradstein SR, Mues R. Systematics Of Plagiochila Sect. Glaucescens Carl (Hepaticae) From Tropical America, A Morphological And Chemotaxonomical Approach, 200: 220, 1-2
14. Davey MC. The Elemental And Biochemical Composition Of Bryophytes From The Maritime Antarctic, Antarctic Science, 1999; 11 (2): 157-159
15. Xu SJ, Jiang PA, Wang ZW, Wang Y. Crystal Structures And Chemical Composition Of Leaf Surface Wax Depositions On The Desert Moss *Syntrichia Caninervis*, Biochemical Systematics And Ecology 2009; 37: 723–730
16. Spagnuolo V, Terracciano S, Giordano S. Trace Element Content And Molecular Biodiversity in The Epiphytic Moss *Leptodon Smithii*: Two Independent Tracers Of Human Disturbance, Chemosphere, 2009; 74:1158-1164
17. Serin Ç. Zonguldak Ve Çevresinde Bulunan İki Bitki Türünde Biyolojik Aktif Bileşiklerin Taranması, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak 2007
18. Basile A, Vvotta MT., Giardona S, Cobianchi RC. Antibiotic effects of *Lunalaria cruciata*(Bryophyta) extract, Pharmaceutical Biology 1998; 1:28-36.
19. Basile A, Vvotta MT, Ielpo MTL, Moscatiello V, Ricciardi L, Giardano S, Cobianchi CR. Antibacterial activity in *Rhynchostegium riparioides*(Hedw.) Card.Extract(Bryophyta), Phytoterapy Research 1998; 12:146-148.
20. Altuner EM. Bazı Karayosunu Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2008.
21. Canlı K. Karayosunlarının Kullanım Alanları, Orman Mühendisliği Dergisi 2009; 6:41-44.
22. Ando H. China Proc Bryol Soc Jpn 1983;3:124.
23. Asakawa Y. Biologically active substance from Bryophytes. In: Chopra RN, Bhatla SC, editors. Bryophyte development: physiology and biochemistry. Boston: CRC Press; 1900.
24. Karunen P. The acyl lipids of Bryophytes. Bryophytes, Zinsmeister HD, Mutes R. editors. Their chemistry and chemical taxonomy, Oxford University; 1990:121.
25. Chobat V, Kubicova L, Nabbout S, Jahodar L, Vytlačilova J, Antioxidant and free radical scavenging activities of five moss species, Fitoterapia 2006; 77:598- 600.
26. Pant G, Tewari S, Pargaien MC, Bisht LS. Bryol Times, Fitoterapia 1986; 29:2.
27. Schutze-Motel W. Advances in bryology, Vol.2, Germany 7 Cramer- Vaduz; 1984:224.

28. Harborne JB. Introduction to ecological biochemistry(3rd ed.), London, Academic Press,1988.
29. Dey A, De NJ. Antioxidativepotential Of Bryophytes: Stresstoleranceand Commercial Perspectives: A Review Pharmacologia 2012; 3 (6): 151-159
30. Gökpınar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz Y. Algol Antioksidanlar, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 2006; 23: 85-89
31. Martin KR, Barret JC. Reaktif Oksijen Species As Double-Edged Swords İn Cellular Processes:Low-Dose Cell Signaling Versus High-Dose Toxicity, Hum.Exp.Toxicol.2002: 21: 71-75
32. Kamer D. Biryofitlerin Ekolojisi, Lisans Bitirme Tezi Ankara Üniversitesi Çankırı Orman Fakültesi, Çankırı 2006.
33. Aslan R, Dünder Y. Bir Fizyolojik Eleman Ve Radikal Olarak Azot Oksit. Hayvancılık Arastırma Dergisi 1998; 8: 34–38.
34. Robison T, Murphy J, Beyer L, Richters A, Forman H. Depression Of Stimulated Arachidonate Metabolism And Superoxide Production İn Rat Alveolar Macrophages Following İn Vivo Exposure To 0.5 Ppm No2. J. Toxicol. Environ. Health 1993; 38: 273–92.
35. Gutteridge J. Lipid Peroxidation And Antioxidants As Biomarkers Of Tissue Damage. Clin. Chem 1995; 41/12:1819–1828
36. Lohinai Z, Szabo C. Role Of Nitric Oxide İn Physiology And Patophysiology Of Periodontal Tissues. Med. Sci. Monit 1998; 4: 1089–1095.
37. Song O. Oxidative Stress: A Theoretical Model Or Biological Reality. C.R. Biologies. 2004; 327: 649-662.
38. Meydani M. Antioxidants And Cognitive Function. IIsı. Nutrition Reviews,2011; 59(8): 75-82.
39. Chen H. And Tappel, A.L. Protection Of Multiple Antioxidants Against Heme Protein Oxidation And Lipid Peroxidation İnduced By Cbrcl3 İn Liver, Lung, Kidney, Heart, And Spleen. J. Agric. Food Chem.1996; 44(3): 854-858.
40. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
41. Freeman B, Crapo J. Free Radicals And Tissue İnjury. Lab Invest, 1982; 47:412 425.
42. Huysal K. Tip Iı Diabetlilerde Eritrosit Glutasyon Redüktaz, Glutasyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, Katalaz Aktiviteleri, Hemoglobin Glikozilasyonu Ve Lipid

- Peroksidasyonunun İncelenmesi. Atatürk Üni. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum 1999, 81
43. Weiss J, Lobuglio A. Phagocyte-Generated Oxygen Metabolites And Sellüler Injury. Lab. Invest. 1982; 47: 5–16.
44. Panes J, Grander D. Neutrophils Generate Oxygen Free Radicals İn Rat Mesenteric Microcirculation After Abdominal İrradiation. Gastroenterology 1996; 111: 981–989.
45. Smith S, Holm-Rutili L, Michael A. Et al. Role Of Neutrophils İn Hemorrhagic Shock-İnduced Gastric Mucosal Injury İn The Rat. Gastroenterology 1987; 93: 466–471.
46. Karakus AB. Deneysel Olarak Ülser Oluşturulan Ratlarda Lobar_A Pulmonar_A (L.) Hoffm. SMI LiKenden Elde EdiLen Metanol Ekstrelerinin antioksidan enzim aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi Erzurum, 2007.
47. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi,1997; 3-4: 92-95.
48. Nordberg J. And Arnér, E.S.J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, And The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biol. Med.2001; 31: 1287–1312.
49. Cheeseman K, Slater T. An İntroduction To Free Radical Biochemistry. Br Med Bull. Jul 1993 ;49(3) :481-93.
50. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role Of Free Radicals And Catalytic Metal İons İn Human Disease. Methods Enzymol.1990: 186: 1-85.
51. Kavas GÖ. Serbest Radikaller Ve Organizma Üzerine Etkileri. Türkiye Klinikleri,1989; 9: 1-8.
52. Yanbeyi S. Aspirin Ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole’ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz Ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun 1999: 88.
53. Dikici İ. Akut Viral Hepatitlerle İnterferon Tedavisi Görmüş Kronik Viral Hepatitlerde Oksidatif Stresin Araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya 1999: 73.
54. Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM. Oxidants, Antioxidants, And The Degenerative Diseases Of Aging. Proc. Natl. Acad. Sci., Sep 1, 1993; 90(17): 7915-7922.

55. Akıllıoğlu HG, Yalcın E. Tahıl protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri. *Gıda* 2010;35 (3): 227-233.
56. Dapkevicius A, Venskotonis R, Van Beek TA, Linssen, JPH. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, *J. Sci. Food Agric.*, 1998; 77: 140-146.
57. Burits M, Asros K, Bucar F. The antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*, *Phytother. Res.*, 2001; 15: 103-108.
58. Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, De Groot A, Estatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochem. Anal.*, 2002; 13: 8-17.
59. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test. (VIth ed.). Wayne PA. Approved Standard, 1997.
60. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200, 1958.
61. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol.Vit.* 1965; 16: 144–158.
62. Decker EA, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem.* 1990; 38: 674–677.
63. Rodriguez-Martinez MA, Ruiz-Torres A: Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev* 1992; 66:213-222.
64. Official methods of analysis, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, 1995.
65. Prabakaran JJ and Dhanapal S. Analysis of proximate composition and aflatoxins of some poultry feeds. *Asian Journal of Biotechnology*, 2009, ISSN 1996-0700.
66. Russell MD., Antibiotic activity of extracts from some Bryophytes in South Western British Columbia, MSJA, 2000; Volume 2:9-14.
67. Singh M. Rewat AKS, Govindarajan R. Antimicrobial activity of some Indian mosses, *Fitoterapia* 2007; 78:156-158.
68. Dülger B, Yayıntaş ÖT, Gonuz A. Antimicrobial activity of some mosses from Turkey, *Fitoterapia* 2005;76; 730-732.

69. Chobot V, Kubiceval L, Nabbout S, Jahodarand L, Vytlačilova J, Antioksidant and free radical scavenging activities of Fivemoss species. *Fitoterapia*, 2006; 77: 598-600
70. Ballance S, Kristiansen KA, Holt J, Christensen BE. Interactions of polysaccharides extracted by mild acid hydrolysis from the leaves of *Sphagnum papillosum* with either phenylhydrazine, o-phenylenediamine and its oxidation products or collagen. *Carbohydr. Polym.* 2008; 71: 550–558.
71. Erickson M, Miksche GE. On the occurrence of lignin or polyphenols in some mosses and liverworts. *Phytochemistry* 1974; 13: 2295–2299
72. Zinsmeister HD, Mues R. *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy*. Oxford University Press: Oxford, 1990, 488 p.
73. Kļaviņa L, Bikovens O, Šteinberga I, Maksimova V, Eglīte L. Characterization of chemical composition of some bryophytes common in Latvia, *Environmental and Experimental Biology* 2012; 10: 27–34.