



## Investigation the Effects of Lichen's Total Extract Produced From *Usnea Longissima* Ach. on Motility of Rat Ileum In Vitro

Aslıhan ATASEVER<sup>1</sup> Ali ÇINAR<sup>1</sup> Volkan GELEN<sup>2</sup> Emin ŞENGÜL<sup>1</sup> Fikret ÇELEBİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Erzurum, Turkey

<sup>2</sup> Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Kars, Turkey

Received: 14.03.2016

Accepted: 18.05.2016

### SUMMARY

Although, nowadays there are many studies about their features, the metabolic effects of lichens are not exactly explained. Especially in the recent years has been increasing more and more the therapeutic use of lichens along with many studies in the field of alternative medicine. In this research was aimed that of the extract obtained from *Usnea longissima* Ach. lichen species investigate the effect on rat motility in vitro. In this study was used twenty four piece adult male Sprague Dawley rats. The rats were euthanized by cervical dislocation method under anesthetized. Ileum was isolated by opening abdomen. After the dissection of the ileum, muscle strips were placed 20 ml organ bath that contained Krebs solution. To tissue was applied 1 g tension and incubated for 1 hour period. At the end of the incubation period, acetylcholine (ACh;  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M), potassium chloride (KCl; 20, 40, 60, 80, 100 mM) and the various doses of *Usnea longissima* Ach. extract (0.012, 0.12, 1.2, 12, 120 µg/ml) were applied to bath according to the protocol. The obtained data were evaluated with Turkey test the one-way ANOVA. It was determined that different doses of *Usnea longissima* Ach. were inhibited to smooth muscle contractility of the rats ileum which was induced by ACh and KCl. It is thought that of the inhibitory effect to ACh responses of *Usnea longissima* Ach. may be through muscarinic mechanism and also of the inhibitory effect to KCl responses may be through L-type voltage-sensitive calcium ( $Ca^{2+}$ ) channels.

**Key Words:** ACh, Ileum, KCl, Lichen, Rat, *Usnea longissima* Ach

### ÖZET

## *Usnea Longissima* Ach. Liken Türünden Elde Edilen Total Ekstraktın İn Vitro Ortamda Rat İleum Motilitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Günümüzde likenlerin özellikleri ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen metabolik etkileri tam olarak ortaya konulamamıştır. Özellikle son yıllarda alternatif tıp alanında yapılan birçok çalışmayla beraber likenlerin terapötik kullanımları gittikçe artmaktadır. Bu çalışmada *Usnea longissima* Ach. liken türünden elde edilen ekstraktın in vitro rat ileum motilitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu çalışmada 24 adet erkek ergin Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar anestezi altında servikal dislokasyon metodu ile ötenazi edildi. Ratların abdomenleri açılarak ileum izole edildi. İleumun temizliği yapıldıktan sonra hazırlanan kas şeritleri, içerisinde Krebs solüsyonu bulunan 20 ml'lik organ banyosuna yerleştirildi. Dokuya 1 gram (g) gerim uygulanarak 1 saatlik inkübasyon periyoduna bırakıldı. İnkübasyon periyodu sonunda banyoya asetilkolin (ACh,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M), potasyum klorür (KCl, 20, 40, 60, 80, 100 mM) ve *Usnea longissima* Ach. ekstraktı çeşitli dozlarda (0.012, 0.12, 1.2, 12, 120 µg/ml) bir protokol çerçevesinde uygulandı. Elde edilen değerler one way ANOVA'da Tukey testi ile değerlendirildi. *Usnea longissima* Ach.'nın farklı dozlarının, ACh ve KCl ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraktilitesini inhibe ettiği belirlendi. *Usnea longissima* Ach.'nın ACh cevaplarını baskılayıcı etkisinin muskarinik mekanizma üzerinden, KCl cevaplarını baskılayıcı etkisinin ise voltaja duyarlı L tipi kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) kanalları üzerinden olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** ACh, İleum, KCl, Liken, Rat, *Usnea longissima* Ach

### GİRİŞ

Likenler genellikle mantarlar, algler ve bazen de ciyanobakteriler ile birleşerek morfolojik ve fizyolojik bir

bütün halinde meydana getirdikleri simbiyotik (ortak yaşam) birliklerdir (Güner 1986; Aslan ve Öztürk 1994; Blasco ve ark. 2011). Likenlerin çok çeşitli alanlarda değişik kullanım potansiyelleri vardır (Tutel 1986; Aslan

ve Çelebi 2014). Likenlerin günümüzde tıbbi olarak antibakteriyel (Vartia 1950; Aslan ve ark. 1999), antiviral (Neamati ve ark. 1997), antitümoral (Yamamoto ve ark. 1995), antiprotozoal (Fournet ve ark. 1997), antioksidan (Atalay ve ark. 2011), antienflamatuvar, analjezik, antipiretik (Okuyama ve ark. 1995; Vijayakumar ve ark. 2000), antiproliferatif (Huneck 1999), antiülserojenik (Halici ve ark. 2005) gibi birçok etkilerinin olduğu ifade edilmektedir. Bunların yanı sıra halk arasında likenlerden soğuk algınlıkları, bağırsak kurtlarının düşürülmesi, alerji, ateşli hastalıklar, sarılık, cilt hastalıkları, humma nöbetleri, boğmaca, öksürük ve solunum yolu hastalıkları ve kemik kırıklarının tedavi edilmesinde istifade edilmiştir (Huneck 1999; Brodo ve ark. 2001). Alternatif tıpta ve halk arasında kullanılan liken türlerinden birisi de *Usnea longissima* Ach.'dır. *Usnea longissima* Ach.'nın halk arasında balgam söktürücü ve mide koruyucu etkisinin bilinmesinin yanı sıra, mide ülseri, kemik kırıkları ve deri döküntülerinin tedavisinde de kullanılan bir liken türü olduğu bildirilmektedir (Tokat 2004). Gastrointestinal sistem üzerine koruyucu ve mide ülserlerini iyileştirici etkileri olan *Usnea longissima* Ach.'nın bu etki mekanizmasının klasik yara iyileştirilmesi süreci ile ilgili olarak birtakım antioksidan sistemler üzerinden etkili olduğu ifade edilmektedir (Chopra ve ark. 1958). Gastrointestinal sistem üzerinde bu tür etkileri olan *Usnea longissima* Ach.'nın gastrointestinal sistemdeki düz kasların motilitesi üzerine etkileri ile alakalı herhangi bir literatür bilgiye rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmada, *Usnea longissima* Ach. aköz ekstraktının ratlarda in vitro ileum motilitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.02.2014 tarih ve 36643897-53 sayılı yazısında belirtilen Etik Kurul Raporunun 255 nolu kararı ile onaylandı. Çalışmanın tüm deneysel uygulamaları ve aşamaları Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen ortalama 220-250 g ağırlığında, 3-4 aylık, 24 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. Tüm hayvanlar standart bakım ve besleme kurallarına uygun şartlarda barındırıldı. Deneyler süresince Etik Kurul koşullarına riayet edildi.

*Usnea longissima* Ach. yabancı bitki ve otlardan arındırılarak temizlendikten sonra oda sıcaklığında kurutulup öğütücü yardımı ile toz haline getirildi (Aslan 2000). Toz haline getirilen liken örneğinden 20 g alındı, Soxholet cihazına ekstraksiyon kapları içerisine yerleştirildi, metanol çözeltisi ile ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen ekstre evaporate edildi. Elde edilen pelte kıvamındaki total ekstre +4°C'ta muhafaza edildi. Temin edilen ekstraktın final konsantrasyonu 0.012, 0.12, 1.2, 12 ve 120 µg/ml olacak şekilde beş farklı dozu dimetil sülfoksitte (DMSO) çözdürülerek hazırlandı.

### Rat İleum Dokusunun İzole Organ Preparatı Olarak Hazırlanması

Standart şartlarda bakım ve beslemesi yapılan ratlar ketamine hydrochloride (Ketalar: 75 mg/kg) ve xylazine (Rompun: 15 mg/kg) eşliğinde anestezide alınarak servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi. Ratların abdominali median hat boyunca açılarak ileumdan 5 cm uzunluğunda bir bölüm izole edildi. İzole edilen ileum dokusu, içerisinde soğuk krebs solüsyonu (NaCl 119 mM;

KCl 4.75 mM; CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; MgSO<sub>4</sub> 1.5 mM; glucose 11 mM; pH 7.4) (Borrelli ve ark. 2009) bulunan petriye alınarak çevresinde bulunan bağ doku, kan damarları ve ileumun lümen içeriği temizlendi. Temizlik işlemi tamamlanan ileumdan 1-1.5 cm (Sağmanlıgil ve ark. 1994; Borrelli ve ark. 2009) uzunluğunda kesitler alınarak iki veya üç kas şeridi hazırlandı. Hazırlanan düz kas şeritleri pH'sı 7.4 ve sıcaklığı 37°C olan, % 95 O<sub>2</sub> ve % 5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılan (Rigano ve ark. 2013) krebs solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyosuna yerleştirilerek alt ucu banyo tabanındaki çelik çengele üst ucu ise bir çelik tel ile transdüsere (EL-S045C-EMKA-R04003 ve R04004) bağlandı. Dokuya 1 g gerim uygulanarak 1 saatlik inkübasyon periyoduna tabi tutuldu (Verspohl ve ark. 2013) ve bu süre zarfında her 15 dk'da bir banyo yıkanarak yeni krebs solüsyonu ile dolduruldu. İnkübasyon periyodu bitiminde ileum düz kas kontraksiyonları Ach (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> M) ve KCl (20, 40, 60, 80, 100 mM)'nin farklı dozları ile kümülatif olarak indüklendi. Kümülatif doz cevap eğrileri belirlendikten sonra dokular yıkanıp dinlendirilerek bu işlem üç kez tekrar edildi. Daha sonra *Usnea longissima* Ach.'nın 0.012 µg/ml dozu banyoya verildi ve 6 dk'lık maruziyet süresi sonunda Ach ve KCl'nin belirlenen dozları banyoya kümülatif uygulanarak kontraksiyonlar indüklendi ve *Usnea longissima* Ach.'nın 0.012 µg/ml dozunun etkisi belirlendi. Bu protokol *Usnea longissima* Ach.'nın 0.12 µg/ml, 1.2 µg/ml, 12 µg/ml ve 120 µg/ml dozları ile de yapıldı.

### İstatistiksel Analiz

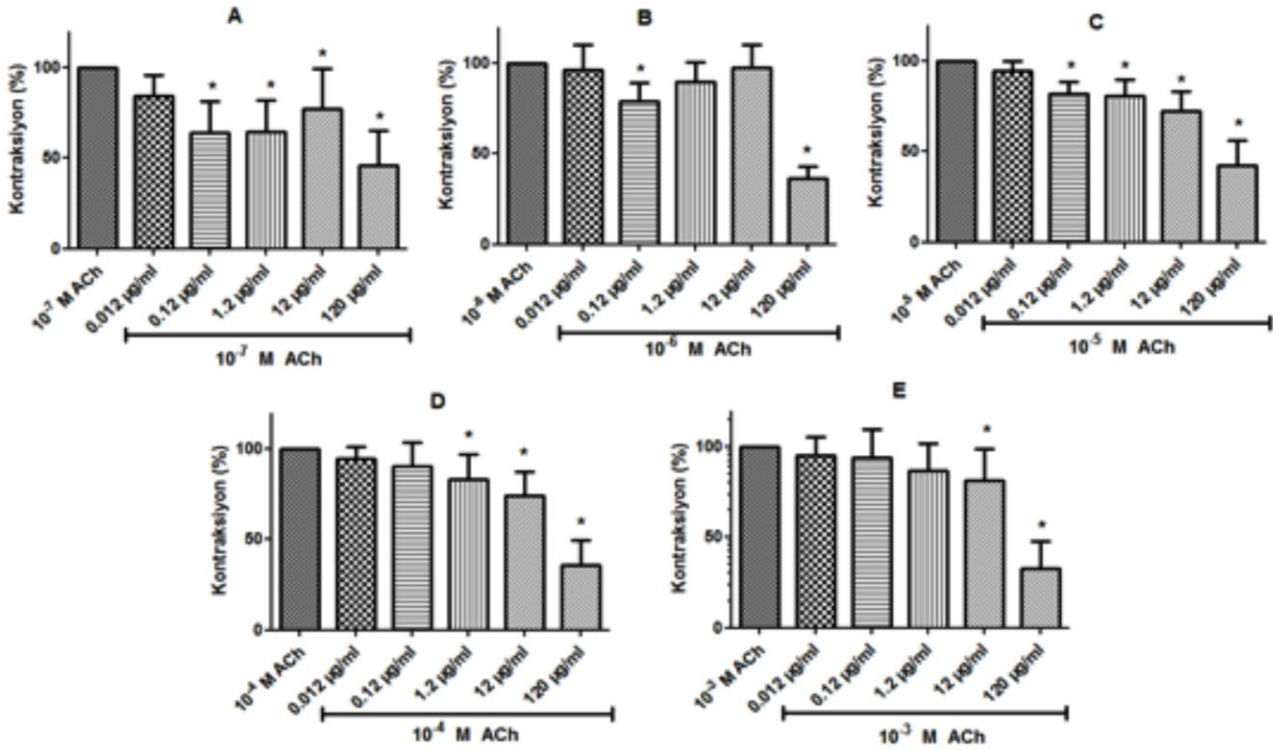
Çalışmamızdan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS20 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde One Way ANOVA'da Tukey testi uygulandı. Değerler, ortalama ( $\bar{x}$ )±Standard sapma (SD) olarak verildi. P<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmada Ach (10<sup>-7</sup> -10<sup>-3</sup> M) ve KCl (20, 40, 60, 80 ve 100 mM)'nin kümülatif dozları ile indüklene in vitro rat ileum düz kas kontraktilitesi üzerine *Usnea longissima* Ach.'nın beş farklı dozunun (0.012, 0.12, 1.2, 12 ve 120 µg/ml) etkileri Şekil 1, 2, 3 ve 4'te görülmektedir.

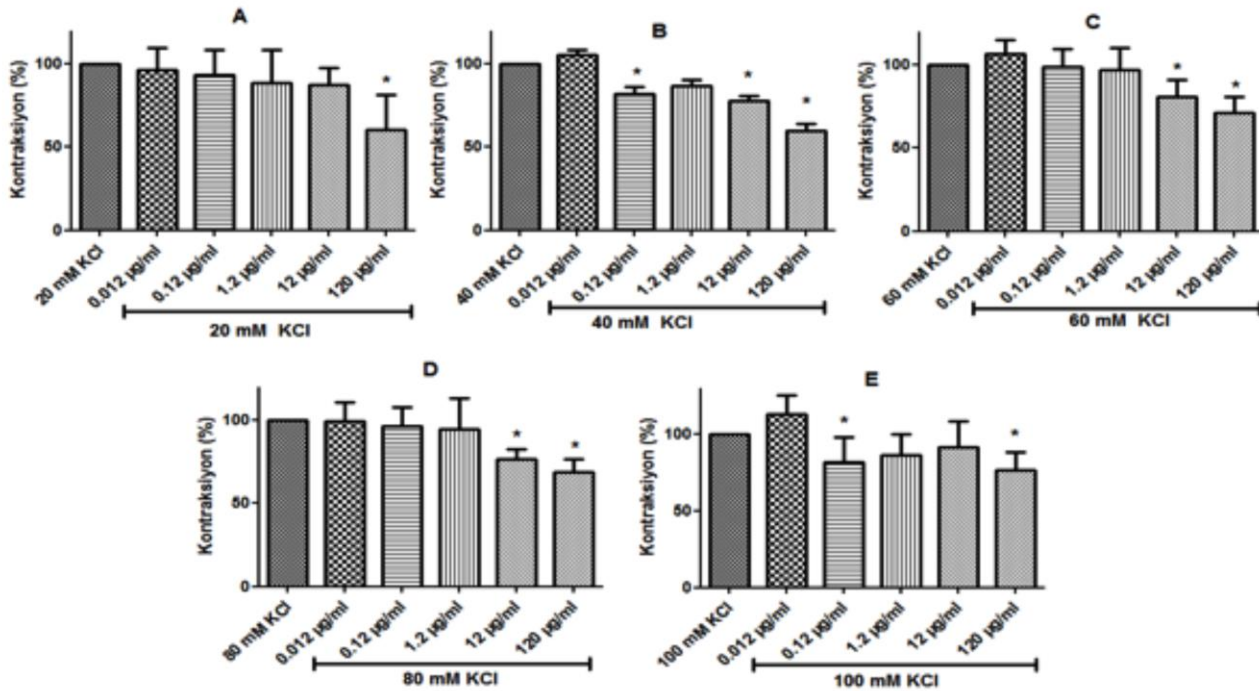
## TARTIŞMA ve SONUÇ

Antiinflamatuvar, anti-ülserojenik ve antioksidan rollerinden dolayı *Usnea longissima* Ach. liken türü üzerinde yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. *Usnea longissima* Ach.'nin metanol ekstresinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Odabasoglu ve ark. 2004). Ratlarda indometazin ile oluşturulan mukozal hasar ve antioksidant enzim aktivitesi üzerine *Usnea longissima* Ach.'nın sulu ekstraktının indometasin kaynaklı ülserlerde koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Halici ve ark. 2005). Ayrıca *Usnea longissima* Ach.'dan elde edilen diffraktik asidin indometasin ile indüklene mide lezyonlarında gastroprotektif etkisinin antioksidan savunma sistemleri üzerindeki etkilerine bağlı olduğu belirlenmiştir (Bayir ve ark. 2006). Bir diğer çalışmada *Usnea longissima* Ach.'dan izole edilen usnik asidin 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarının, sıçanlarda indometazin kaynaklı mide ülserini önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Odabasoglu ve ark. 2006).



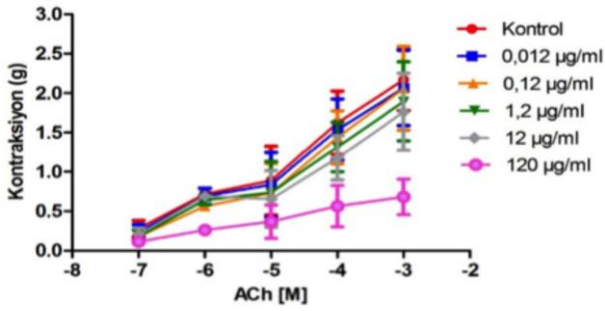
Şekil 1. Ach'nın 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> M logaritmik dozları ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraktilesi üzerine *Usnea longissima* Ach.'nın 5 farklı dozunun yüzde olarak etkileri.

Figure 1. The effects as the percentage of *Usnea longissima* Ach. 5 different doses on in vitro rat ileum smooth muscle contractility with induced 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> M logarithmic doses of ACh.



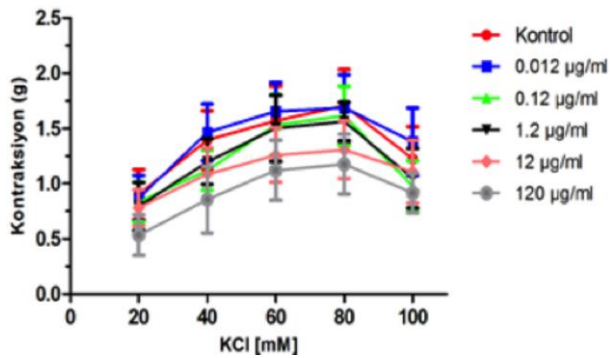
Şekil 3. KCl'nin 20-100 mM dozları ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraktilesi üzerine *Usnea longissima* Ach.'nın 5 farklı dozunun yüzde olarak etkileri.

Figure 3. The effects as the percentage of *Usnea longissima* Ach. 5 different doses on in vitro rat ileum smooth muscle contractility with induced 20-100 mM doses of KCl.



**Şekil 2.**  $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M ACh'nin logaritmik dozları ileindüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraktilitesi üzerine *Usnea longissima* Ach.'nın 5 farklı dozunun gram olarak etkisi.

**Figure 2.** The effects as the gram of *Usnea longissima* Ach. 5 different doses on in vitro rat ileum smooth muscle contractility with induced  $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M logarithmic doses of ACh.



**Şekil 4.** 20-100 mM KCl dozları ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraktilitesi üzerine *Usnea longissima* Ach.'nın 5 farklı dozunun gram olarak etkisi.

**Figure 4.** The effects as the gram of *Usnea longissima* Ach. 5 different doses on in vitro rat ileum smooth muscle contractility with induced 20-100 mM doses of KCl.

Yapılan literatür taramalarında *Usnea longissima*'nın gastrointestinal sistemdeki düz kas kontraktilitesi üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada gastrointestinal sistemin önemli bir bölümünü ihtiva eden ince bağırsakların ileum kısmını oluşturan kas dokusunun miyojenik aktiviteleri üzerine *Usnea longissima* Ach.'nın 5 farklı dozunun ACh ve KCl ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraktilitesi üzerine etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada, KCl'nin 20, 40, 60, 80 ve 100 mM dozları banyoya kümülatif uygulanarak, bu dozlarla indüklenen rat ileum düz kas kontraksiyonlarının doz cevap eğrisi elde edildi. Deney sonuçlarına göre, banyoda *Usnea longissima* Ach.'nın 0.012 ve 1.2 µg/ml dozlarının varlığında, KCl dozlarının cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ,  $n=12$ , Şekil 3 ve 4). *Usnea longissima* Ach.'nın 12 µg/ml dozu, KCl'nin 40, 60, 80 mM dozları ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını baskıladığı görüldü ( $p < 0.05$ ,  $n=12$ , Şekil 3 ve 4). *Usnea longissima* Ach.'nın 120 µg/ml dozu ise, KCl'nin 20, 40, 60, 80 ve 100 mM dozları ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını baskıladığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ,  $n=12$ , Şekil 3 ve 4).

*Usnea longissima* Ach.'nın farklı dozlarının KCl ile indüklenen ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını baskılayıcı etkisinin voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden olduğu düşünülmektedir. Çünkü düz kas kontraksiyonları KCl ile indüklendiği zaman ortamda potasyum ( $K^+$ ) yoğunluğunun artmasına bağlı olarak kas hücrelerinde depolarizasyon meydana gelir. Kas fibrillerinde meydana gelen depolarizasyon voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının açılmasına sebep olur. Voltaja duyarlı  $Ca^{2+}$  kanallarının açılması aracılığı ile de ekstrasellüler alandan hücre içine  $Ca^{2+}$  girişi meydana gelmektedir (Boustie J ve Grube M 2005). Ayrıca hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarındaki  $Ca^{2+}$  serbest bırakılmaktadır (Anderson 1993). Bu olaylar sonucunda düz kasta kasılma meydana gelmektedir.

Bu çalışmada, ACh'nin  $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M logaritmik doz aralığı banyoya kümülatif uygulanarak, bu dozlarla indüklenen rat ileum düz kas kontraksiyonlarının doz cevap eğrisi elde edildi. Deney sonuçlarına göre banyoda *Usnea longissima* Ach.'nın en düşük dozu olarak kullandığımız 0.012 µg/ml dozunun, ACh dozlarının cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ,  $n=12$ , Şekil 1 ve 2). *Usnea longissima* Ach.'nın 12 µg/ml dozu ise, ACh'nin  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  ve  $10^{-3}$  M dozları ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraksiyonlarını baskıladığı gözlemlendi ( $p < 0.05$ ,  $n=12$ , Şekil 1 ve 2). Çalışmamızda, *Usnea longissima* Ach.'nın 120 µg/ml dozunun doza bağımlı olarak ACh  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını baskıladığı saptandı ( $p < 0.05$ ,  $n=12$ , Şekil 1 ve 2).

Düz kas kontraksiyonları ACh ile indüklendiğinde, ACh  $M_3$  reseptörlerine bağlanır ve fosfolipaz C aktive olarak inozitol trifosfat (IP3) oluşumuna neden olmaktadır. IP3 ise endoplazmik retikulumdan  $Ca^{2+}$  salınımını uyararak kalmodulinin konformasyonel değişime uğramasına yol açmaktadır ve bunun sonucunda da düz kasta kasılma meydana gelmektedir. Ayrıca ACh  $M_3$  reseptörlerine bağlandığı zaman, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarından hücre içine  $Ca^{2+}$  girişini artırarak, düz kasın kasılmasını sağlamaktadır (Andersson ve Wein 2004). *Usnea longissima* Ach.'nın farklı dozlarının ACh cevaplarını baskılayıcı etkisi üç mekanizma üzerinden olabilir. İlk olarak, *Usnea longissima* Ach.'nın  $M_3$  reseptör yolağını kapatması sonucunda ACh'nin etkisi azalabilir. İkinci olarak, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarını bloke ederek ekstrasellüler bölgeden hücre içine  $Ca^{2+}$  girişini engellemesi sonucunda baskılayıcı etki gösterebilir. Üçüncü yol olarak, her iki yolağı bloke ederek ACh'nin etkisini azaltmış olabilir. Bu çalışma, *Usnea longissima* Ach.'nın voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden de etkili olabileceğini hatıra getirmektedir. *Usnea longissima* Ach.'nın ACh ile indüklenen ileum düz kas kontraktıl cevaplarını baskılayıcı etkisinin, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının yanı sıra  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden de olup olmadığı farklı bir çalışma konusu olarak  $M_3$  reseptör blokörü varlığında *Usnea longissima* Ach.'nın dozlarının etkileri araştırılarak belirlenebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada; *Usnea longissima* Ach.'nın 12 ve 120 µg/ml dozlarının, ACh ve KCl'nin farklı dozları ile indüklenen in vitro rat ileum düz kas kontraksiyonlarını inhibe edici etkisinin varlığı belirlendi.

**KAYNAKLAR**

- Anderson K (1993)**. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev*, 45, 253-308.
- Andersson KE, Wein AJ (2004)**. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev*, 56, 581-631.
- Aslan A, Öztürk A (1994)**. Oltu (Erzurum) yöresine ait liken florası üzerine çalışmalar. *Türk J Bot*, 18, 103-6.
- Aslan A, Güllüce M, Ögütçü H (1999)**. Bazı likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bir araştırma. *Biyoteknoloji (Kükem) Derg*, 22, 19-26.
- Aslan A (2000)**. Lichens from the regions of Artvin, Erzurum, and Kars (Turkey). *Isr J Plant Sci*, 48, 143-155.
- Aslan T, Çelebi F (2014)**. *Usnea longissima* ach. liken türünün metanol ekstresinin in vitro sıçan midesinde mide asit sekresyonu üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Atalay Y, Halici MB, Mavi A, Cakir A, Odabasoglu F, Kazaz C, Aslan A, Kufrevioglu OI (2011)**. Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. *Türk J Chem*, 35, 647-61.
- Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C (2006)**. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 13, 584-90.
- Blasco M, Domeno C, Lopez P, Nerin C (2011)**. Behaviour of different lichen species as biomonitors of air pollution by PAHs in natural ecosystems. *J Environ Monit*, 13, 2588-96.
- Borrelli F, Borbone N, Capasso R, Montesano D, De Marino S, Aviello G, Aprea G, Masone S, Izzo AA (2009)**. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatus* extract in the rat and human ileum. *J Ethnopharmacol*, 122, 434-38.
- Boustie J, Grube M (2005)**. Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources- Characterization and Utilization*, 3, 273-87.
- Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S (2001)**. Lichens of North America. 23. Baskı 795. Yale University Press, Connecticut, USA.
- Chopra R, Chopra I, Handa K, Kapur L (1958)**. Indigenous Drugs of India (2nd Ed) 426, Calcutta, India.
- Fournet A, Ferreira ME, Arias AR, Ortiz ST, Inchausti A, Yalaff G, Quilhot W, Fernandez E, Hidalgo ME (1997)**. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp Biochem Phys C*, 116, 51-4.
- Güner H (1986)**. Likenlerin biyolojisi ve Ege Bölgesi'nde bulunan bazı liken türleri. *EÜ Fen Fak Yayınları*, 92.
- 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, 656-62.
- Huneck S (1999)**. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86, 559-70.
- Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, Milne GW, Proksa B, Pommier Y (1997)**. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J Med Chem*, 40, 942-51.
- Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Halici M, Bayir Y (2004)**. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytother Res*, 18, 938-41.
- Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C (2006)**. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*, 103, 59-65.
- Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y (1995)**. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of empty. *Planta Med*, 61, 113-5.
- Rigano D, Formisano C, Senatore F, Piacente S, Pagano E, Capasso R, Borrelli F, Izzo AA (2013)**. Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. italicum and chemical identification of the active ingredients. *J Ethnopharmacol*, 150, 901-6.
- Sağmanlıgil V, Emre B, Çelebi F (1994)**. Aç ve tok farelerde medial jejunum, proksimal ve distal ileumda asetilkolinin oluşturduğu kasılmalar ile elde edilen non-kümülatif cevap eğrileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 41, 463-75.
- Tokat Z (2004)**. Ankara bölgesi likenlerinin antimikrobiyal aktiviteleri. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Tutel B (1986)**. Liken biyolojisi ve faydaları. *Marmara Üniversitesi Eczacılık Dergisi*, 2, 185-94.
- Vartia K (1950)**. On antibiotic effects of lichens and lichen substances. *Ann Med Exp Biol Fenn*, 7, 1-82.
- Verspohl EJ, Fujii H, Homma K, Buchwald-Werner S (2013)**. Testing of *Perilla frutescens* extract and Vicenin 2 for their antispasmodic effect. *Phytomedicine*, 20, 427-31.
- Vijayakumar C, Viswanathan S, Kannappa Reddy M, Parvatharthini S, Kundu A, Sukumar E (2000)**. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, 71, 564-6.
- Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K (1995)**. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chem Pharm Bull*, 43, 1388-90.