

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

İZMİR KÖRFEZİNDEN (URLA) TOPLANAN
KAHVERENGİ (*HALOPTERIS SCOPARIA*
SAUVAGEAU), YEŞİL (*ENTEROMORPHA LINZA*
J.AGARDH) VE KIRMIZI ALG (*GRACILARIA*
GRACILIS M.STEENTOFT, L.M.IRVINE &
W.F.FARNHAM) TÜRLERİNİN HEKZAN,
KLOROFORM VE METANOL EKSTRELERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE PROTEKTİF
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Adem GÜNER

Danışman: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 23.05.2017

Bornova – İzmir

2017

Adem GÜNER tarafından Doktora tezi olarak sunulan “İzmir Körfezinden (Urla) toplanan kahverengi (*Halopteris scoparia Sauvageau*), yeşil(*Enteromorpha linza J.Agardh*) ve kırmızı alg (*Gracilaria gracilis M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham*) türlerinin hekzan, kloroform ve metanol ekstratlarının biyolojik aktiviteleri ve protektif etkilerinin incelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 23.05.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri :

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Raportör Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Üye : Prof. Dr. Atakan SUKATAR

Üye : Doç. Dr. Şüra BAYKAN

Üye : Doç. Dr. Levent ŞİK





**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ETİK
KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “ *İzmir Körfezinden (Urla) toplanan kahverengi (Halopteris scoparia (Linnaeus) Sauvageau), yeşil (Enteromorpha linza J.Agardh) ve kırmızı alg (Gracilaria gracilis M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham) türlerinin hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının biyolojik aktiviteleri ve protektif etkilerinin incelenmesi*” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

23.05.2017



Adem GÜNER



ÖZET

İZMİR KÖRFEZİNDEN (URLA) TOPLANAN KAHVERENGİ (*HALOPTERIS SCOPARIA* (LİNNAEUS) SAUVAGEAU), YEŞİL (*ENTEROMORPHA LINZA* J.AGARDH) VE KIRMIZI ALG (*GRACILARIA GRACILIS* M.STEENTOFT, L.M.IRVINE & W.F.FARNHAM) TÜRLERİNİN HEKZAN, KLOROFORM VE METANOL EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE PROTEKTİF ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

GÜNER, Adem

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
Mayıs 2017, 212 sayfa

Makroalglerde pek çok stratejik görevi üstlenen sekonder metabolitlerin aktiviteleri günümüze kadar pekçok çalışmaya konu olmuştur. Mevcut çalışmamızda, Ege kıyılarında zengin dağılışı gösteren farklı karakteristikteki alg ekstrelerine ait biyolojik aktivitelerin (antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik, antianjiyogenik, antimutajenik ve protektif etki) ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda, İzmir kıyılarından toplanan alg örnekleri yıkayıp kurutulduktan sonra hekzan, kloroform ve metanol solvanları yardımıyla ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri, DPPH ve ABTS⁺ yöntemleri ile total fenolik ve flavonoid içerikleri ise Folin-Ciocalteu ve Alüminyum klorür yöntemleri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Özellikle yeşil alglerde tespit edilen antimikrobiyal aktive MIC metoduyla tayin edilmiştir. MCF-7, CaCo-2 ve HeLa kanser hücre ile HEK-293 sağlıklı hücre hatlarında özellikle *H.scoparia* ekstrelerinin daha geniş bir spektrumda sitotoksik etkinlikleri gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda mevcut antikanser etkilerin apoptotik yollar üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için, “Real Time Ready Human Apoptosis Panel” ile yaklaşık 84 genin ekspresyon profilleri incelenmiştir. Antianjiyogenik etkiler ise *in vivo* HET CAM ile *in vitro* Wound Healing yöntemleri kullanılarak tespit edilmiş ve nispeten kırmızı alg *G.gracilis*'in metanol ve kloroform ekstreleri etkili bulunmuştur. Antimutajenik etkiler ise Ames MPFTM kiti ve TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanılarak -S9'suz ve +S9'lu ortamda gerçekleştirilmiş ve ekstrelerin zayıf etkinlikler gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm test yöntemlerinde ekstreler arasındaki farklılığa neden olan metabolitlerin tespiti için ise HPLC ile kimyasal

içerik analizi yapılmıştır. Yürütölen denemeler sonucunda daha geniş spektrumda etkili olduğunu düşündüğümüz *H.scoparia*'nın farede kadmiyumun yol açtığı genotoksik hasara karşı protektif etkileri KA ve MN testleriyle ortaya konulmuş ve her iki deneme yönteminde de artan doza bağılı olarak protektif etkiler sergilediğı gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Algler, Antianjiyogenik, Antikanser, Antimikrobiyal, Antimutajenik, Antioksidan, Apoptozis, Mikronukleus.



ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HEXANE, CHLOROFORM AND METHANOL EXTRACTS OF BROWN ALGAE (*HALOPTERIS SCOPARIA* (LINNAEUS) SAUVAGEAU), GREEN (*ENTEROMORPHA LINZA* J.AGARDH) AND RED (*GRACILARIA GRACILIS* M.STEENTOFT, L.M.IRVINE & W.F.FARNHAM) COLLECTED FROM IZMIR GULF (URLA)**

GÜNER, Adem

Ph.D. in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

2017 May, 212 pages

The activities of the secondary metabolites which have undertaken many strategic tasks in macroalgae have been the subject of much work until today. The present study, it was aimed to reveal the biological activities such as antioxidant, antimicrobial, antimutagenic, antiangiogenic, antimutagenic and protective effect of different characteristic algae extracts showing rich distribution on the Aegean coast.

In this direction, alga samples collected from İzmir coast were washed and dried and then extracted with hexane, chloroform and methanol solvans. Antioxidant activities of extracts were determined spectrophotometrically by DPPH and ABTS⁺ methods, while total phenolic and flavonoid contents were determined by Folin-Ciocalteu and Aluminium chloride methods. Especially the antimicrobial activity detected in green algae was determined by MIC method. Cytotoxic activities of extracts were determined using MCF-7, CaCo-2 and HeLa cancer cell lines and HEK-293 healthy cell lines, and *H.scoparia* extracts appeared to cause a broader spectrum of inhibition. At the same time, approximately 84 genomic expression profiles were examined with the "Real Time Ready Human Apoptosis Panel" to evaluate the effect of existing anticancer effects on apoptotic pathways. Antigenogenic effects were determined by using Wound Healing and HET-CAM and methanol and chloroform extracts of relatively *G. gracilis* were found to be effective. Antimutagenic effects were determined using Ames MPFTM kit and TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suş in -S9 and +S9, and the extracts showed weak activity. HPLC content analysis was carried out to determine the chemical content of metabolite causing the

source of the difference between the extracts. The protective effects of *H. scoparia* which are thought to be effective in a broader spectrum as a result of the carried out experiments against the genotoxic damage caused by cadmium in mice were demonstrated by KA and MN tests, and It has been observed that it exhibits protective effects, in a manner dose-dependent.

Key Words: Algae, Antiangiogenic, Anticancer, Antimicrobial, Antimutagenic, Antioxidant, Apoptosis, Micronucleus.



TEŞEKKÜR

Değerli danıőmanım Sayın Prof. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOğLU'na doktora süresince rehberlik ve teőviklerinin yanısıra meraklı zihni, uzlaşma yeteneği ve paralel birçok farklı araőtırmayı yürütebilecek geniş bilgi birikimiyle hayat boyu örnek olacağı için sonsuz teőekkürler...

Akademik ve laboratuvar süreçlerinde her zaman destek olan Sayın Doç. Dr. Ayőe NALBANTSOY ve Sayın Dr. Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM'a teőekkürler. Ayrıca doktora çalışmalarının gerçekleştirilmesine katkıda bulunup, gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı'na ve 2013/FEN/015 nolu proje ile Ege Üniversitesi Araőtıma Fon Saymanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve doktora süresince sevgilerini ve desteğini esirgemeyen sevgili eőim Özlem GÜNER ve oğlum Ali Eymen GÜNER'e, destek ve teővikleriyle bugünlere gelmem de en büyük pay sahibi olan babam Aziz GÜNER, annem Ayőegül GÜNER ve kardeőlerime sonsuz teőekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Alglerin Genel Özellikleri.....	2
1.1.1. Yeşil alglerin genel özellikleri.....	5
1.1.2. Kahverengi alglerin genel özellikleri	5
1.1.3. Kırmızı alglerin genel özellikleri.....	6
1.2. Alglerin Biyolojik Aktiviteleri ve Ekonomik Önemi	7
1.2.1. Alg sekonder metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri	7
1.2.2. Alglerin ekonomik önemi.....	31
2. MATERYAL VE METOT	37
2.1. Alg (Makroalg) Materyali.....	37

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.1.1. <i>Halopteris scoparia</i> (Linnaeus) Sauvageau'nın sınıflandırılması ve genel özellikleri.....	37
2.1.2. <i>Enteromorpha linza</i> var. <i>lanceolata</i> (Linnaeus) J. Agardh sınıflandırması ve genel özellikleri	38
2.1.3. <i>Gracilaria gracilis</i> M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham sınıflandırması ve genel özellikleri	39
2.2. Alg örneklerinin temini	40
2.3. Kullanılan kimyasallar ve kitler	41
2.4. Deney hayvanları.....	41
2.5. Kullanılacak Deneysel Yöntemler.....	42
2.5.1. Ekstrelerin hazırlanması	42
2.5.2. Alg ekstralarının içerik tayini	43
2.5.3. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi	45
2.5.4. Antimikrobiyal aktivite testi (Mikrodilüsyon Testi).....	47
2.5.5. Antikanser etkilerin belirlenmesi	47
2.5.6. Anjiyo/Anti-anjiyogenik aktivitenin belirlenmesi	59

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5.7. Mutajenik potansiyelin belirlenmesi (AMES) Testi.....	62
2.5.8 In vivo protektif etkilerin belirlenmesi (Mikronukleus (MN) ve Kromozom Aberrasyon (KA) yöntemi).....	65
2.6. İstatiksel Değerlendirme	69
3. BULGULAR.....	70
3.1. Kuru Örneklerin Ekstraksiyon Verimi.....	70
3.2. Alg Ekstrelerinin İçerik Tayini	70
3.2.1. Total fenol ve flavonoit içerik sonuçları	70
3.2.2. HPLC yöntemi ile içerik Tayini	71
3.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	76
3.3.1. DPPH aktivite sonuçları	76
3.3.2. ABTS ⁺ aktivite sonuçları	78
3.4. Antimikrobiyal Aktivite.....	79
3.5. Antikanser Aktivite Sonuçları.....	81
3.5.1. Sitotoksite sonuçları	81
3.5.2. Apoptotik potansiyel sonuçları.....	87

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6. Anjiyo/Anti-anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi	98
3.6.1. <i>In vitro</i> hücre migrasyon denemesi - yara iyileşme modeli.....	98
3.6.2. <i>In vivo</i> antianjiyogenik aktivite sonuçları	103
3.7. Antimutajenite aktivite sonuçları	113
3.8. <i>In vivo</i> test sonuçları.....	138
3.8.1. Total vücut ve organ ağırlıkları ile ilgili bulgular.....	138
3.8.2. Mikronukleus (MN) ve kromozom aberrasyon (KA) yöntemi.....	139
4.TARTIŞMA	142
5.SONUÇ	172
KAYNAKLAR DİZİNİ	173
ÖZGEÇMİŞ	212

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Primer ve sekonder metabolitlerin başlıca biyosentez yolları	10
1.2 FAO 2012 yılı raporunda en fazla alg üretimi yapan ülkeler	33
2.1 <i>Halopteris scoparia</i> genel görünümü.	37
2.2 <i>Enteromorpha linza</i> genel görünümü.	38
2.3 <i>Gracilaria gracilis</i> genel görünümü.	39
2.4 Alg ekstraktlarının toplanması ve ekstraksiyon aşamaları	40
2.5 Deney hayvanlarının barınma alanı	41
2.6 Antioksidan aktivitenin tayin edilmesi.	46
2.7 Deney hayvanlarından kemik iliğinin çıkarılma işlemi.	68
3.1 Alg örneklerine ait Hex ekstraktlarının α - tokoferol'a karşı içerik analizleri... .	73
3.2 Farklı alg ekstraktlarının HPLC içerik analizleri.....	74
3.3 İçerik tespiti yapılamayan alg ekstraktları	75
3.4 DPPH serbest radikal çözüntüsünün kalibrasyon grafiği.....	76
3.5 HEK 293 hücre hatlarında alg ekstraktlarının etkileri A;Hs-Hex, B; Hs-Chl, C; Hs-Met, D; El-Hex, E; El-Chl; F; Gg-Hex, G; Gg-Met, H; DMSO kontrol.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6 HeLa hücre hatlarında alg ekstrlerinin etkileri A;Hs-Hex, B; Hs-Chl, C; Hs-Met, D; El-Hex, E; El-Chl; F, Gg-Hex, G; Gg-Met, H; DMSO kontrol	84
3.7 CaCo-2 hücre hatlarında alg ekstrlerinin etkileri. A;Hs-Hex, B; Hs-Met, C; El-Hex, D; El-Chl; E; DMSO kontrol.....	85
3.8 MCF-7 hücre hatlarında alg ekstrlerinin etkileri A;Hs-Chl, B; Hs-Met, C; El Chl, D;DMSO kontrol.....	86
3.9 Alg ekstrlerinin kanser hücre hatları üzerinde proapoptotik gen profili	95
3.10 Alg ekstrlerinin kanser hücre hatları üzerinde antiapoptotik gen profili	97
3.11 Kontrol gubu yara kapanma potansiyeli. A:24h, A1;48h-Giems, A2;48h-DAPI.....	98
3.12 <i>H.scoparia</i> alg ekstrlerinin yara kapatma potansiyeli. B(Hex):24h, B1;48h-Giems, B2;48h-DAPI. C(Chl):24h, C1;48h-Giems, C2;48h-DAPI. D(Met):24h, D1;48h-Giems, D2;48h-DAPI.....	99
3.13 <i>E.linza</i> alg ekstrlerinin yara kapatma potansiyeli. E(Hex):24h, E1;48h-Giems, E2;48h-DAPI. F(Chl):24h, F1;48h-Giems, F2;48h-DAPI. G(Met):24h, G1;48h-Giems, G2;48h-DAPI.....	100
3.14 <i>G.gracilis</i> alg ekstrlerinin yara kapatma potansiyeli. H(Hex):24h, H1;48h-Giems, H2;48h-DAPI. I(Chl):24h, I1;48h-Giems, I2;48h-DAPI. J(Met):24h,J1;48h-Giems,J2;48h DAPI.....	101
3.15 <i>H. scoparia</i> hekzan ekstrlerinin 300 mg/kg <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama	103

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.16 <i>H. scoparia</i> klorform ekstrelerinin <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg	104
3.17 <i>H. scoparia</i> metanol ekstrelerinin <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg	105
3.18 <i>E.linza hekzan</i> ekstrelerinin 300mg/kg'da <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama	105
3.19 <i>E.linza</i> klorform ekstrelerinin <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg	106
3.20 <i>E.linza</i> metanol ekstrelerinin <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg	107
3.21 <i>G.gracilis</i> hekzan ekstrelerinin <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg	108
3.22 <i>G.gracilis</i> klorform ekstrelerinin <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg	109
3.23 <i>G.gracilis</i> metanol ekstrelerinin <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg.....	110
3.24 Pozitif (0.1N NaOH), negatif kontrol (0.9% NaCl) ve DMSO (300 µL) gruplarının <i>in vivo</i> antianjiyogenik uygulamaları.....	111
3.25 <i>H.scoparia</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 98 Suşları (- S9)(+S9).....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.26 <i>H.scoparia</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 100 Suşları (-S9)(+S9).....	117
3.27 <i>H.scoparia</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Suşlar (-S9)(+S9).....	119
3.28 <i>H.scoparia</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 1537 Suşları (-S9)(+S9).....	121
3.29 <i>E.linza</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 98 Suşları (-S9)(+S9).....	123
3.30 <i>E.linza</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 100 Suşları (-S9)(+S9).....	125
3.31 <i>E.linza</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Suşları (-S9)(+S9).....	127
3.32 <i>E.linza</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Suşları (-S9)(+S9).....	129
3.33 <i>G.gracilis</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 98 Suşları (-S9)(+S9).....	130
3.34 <i>G.gracilis</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 100 Suşları (-S9)(+S9).....	132
3.35 <i>G.gracilis</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Suşları (-S9)(+S9).....	135

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.36 <i>G.gracilis</i> Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin <i>S. typhimurium</i> TA 1537 Suşları (-S9)(+S9).....	137
3.37 Farelerin kemik iliği hücrelerinde görülen MN'lu (C, D, E ve F) ve MN'suz (A ve B) hücreler.....	140
3.38 Farelerin kemik iliğinde KA. A, Normal; B, (F); C, (F, R); D, (Disentrik, Aneuploidi); E, (KK, G, R); F, (F ve KK); G, (R, G); H, (Kromozom pulverizasyon). F:Fragment, R:Ring, KK: Kromatid kırığı, G:Gap.....	141
4.1 Alg ekstrelerinin farklı yolaklar üzerinden apoptotik etkileri	157

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Alglerin bileşimi ve genel kullanım alanları.....	4
1.2 Alg ekstrelerinde biyolojik olarak aktif bileşiklerin özellikleri.....	11
1.3 Alglerden elde edilen bileşiklerin antioksidan özellikleri.....	15
2.1 HPLC Cihazının Özellikleri.....	45
2.2 Alg ekstrelerinin Maruziyet Dozları	50
2.3 Template-Primer Karışımının Hazırlanması.....	53
2.4 Revers Transkriptaz (RT) Karışımının Hazırlanması	53
2.5 İnsan Apoptotik Panel Analizinde Kullanılan Plaka Şablonu	54
2.6 İnsan Apoptotik Panel İçerik Detayı.....	55
2.7 PCR Karışımının Hazırlanması.....	57
2.8 LightCycler® 480 Cihaz Çalışma Protokolü	58
2.9 $\Delta\Delta$ CT ve Fold Change Değerlerinin Belirlenmesi.....	59
2.10 Yara İyileşme Modeli İşlem Basamakları.....	60
2.11 HET-CAM Değerlendirilmesinde Kullanılan Skor Değerleri	61
2.12 Salmonella typhimurium Suşlarının Genotipleri ve Özellikleri	62
2.13 Kofaktör Çözeltilerinin Hazırlanışları	64

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.14 Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	65
3.1 Alg örneklerinden ekstraksiyon sonrası elde edilen miktarlar	66
3.2 Alg örneklerinin metanol ekstraktlarının toplam fenol ve flavonoid miktarları.	71
3.3 Hex ekstraktlarına ait α - tokoferol alıkonma ve alan dağılımları	72
3.4 Alg ekstraktlarında yer alan bileşiklerin alıkonma ve alan dağılımları	72
3.5 Alglerin ortamdaki DPPH serbest radikallerinin % inhibisyon oranları	77
3.6 Alg ekstraktlarının ABTS+ serbest radikallerinin % inhibisyon oranları	78
3.7 <i>Halopteris scoparia</i> 'nın antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	79
3.8 <i>Enteromorpha linza</i> 'nın antimikrobiyal aktivite sonuçları	80
3.9 <i>Gracilaria gracilis</i> 'in antimikrobiyal aktivite sonuçları....	80
3.10 <i>H.scoparia</i> , <i>E.linza</i> ve <i>G.gracilis</i> alglerinin Hex, Chl ve Met ekstraktlarının hücre hatlarındaki IC50 değerleri ($\mu\text{g/mL}$)	82
3.11 Hücre Hatlarının Total RNA İzolasyon Sonuçları	87
3.12 Alg uygulamaları sonrası hücre hatlarındaki fold change değişimleri	92
3.13 Alg Ekstraktlarının Yara Alanı Kapatma Yüzdeleri.....	102
3.14 HET CAM uygulamaları sonucunda elde edilen irritasyon skorları	112

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.15 <i>H.scoparia Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 98 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları	114
3.16 <i>H.scoparia Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 100 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları	116
3.17 <i>H.scoparia Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 1535 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları	118
3.18 <i>H.scoparia Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 1537 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları	120
3.19 <i>E.linza Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 98 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları.....	122
3.20 <i>E.linza Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 100 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları.....	124
3.21 <i>E.linza Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 1535 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları	126

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.22 <i>E.linza Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 1537 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları	128
3.23 <i>G.gracilis Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 98 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları	130
3.24 <i>G.gracilis Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 100 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları.....	132
3.25 <i>G.gracilis Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 1535 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları.....	134
3.26 <i>G.gracilis Salmonella typhimurium</i> /Mikrozom Mutajenite Denemesinde TA 1537 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları.....	136
3.27 Farelerin total vücut ağırlığı ortalamaları	138
3.28 <i>H.scoparia</i> 'nın farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş dişi fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen MN ve KA sayıları.....	139



1. GİRİŞ

Deniz ekosistemi kimyasal ve biyolojik farklılıklarından dolayı geçmişten günümüze kadar birçok alanda ilgi odağı haline gelmiştir. Bununla birlikte, deniz fauna ve florasındaki yeni keşifler ve doğal olarak kullanımı çeşitli hastalıklara karşı mücadelede ve beslenmede anahtar rol üstlemiştir (Chapman, 1970).

Fotosentetik organizma olarak algler, zengin biyolojik çeşitliliğe sahip sucul ortamların özellikle de denizel ortamların primer üreticileri konumundadır. Aynı zamanda dünyaki tüm denizel kaynaklarda ve göllerde oldukça geniş bir dağılım gösterip ortamdaki diğer canlıların beslenmesi, üremesi, yumurtlaması ve korunması içinde yaşamsal faaliyet sürdürdüğünden hem ekolojik hem de biyolojik açıdan oldukça önemlidirler (Lee, 2008). Uzun bir fosil geçmişe sahip olan algler, karasal bitkilerden farklı olarak yaşadıkları ortam bakımından yüksek ve düşük sıcaklık, ışık, UV, tuzluluk ve ani ısı değişimleri gibi pekçok çevresel olaya karşı yüksek mukavemet özelliği göstererek hayatlarını sürdürebilme yeteneğine sahiptirler. Bu benzersiz özellikleriyle sayısız çalışmaya konu olmuş ve yapısındaki aminoasit, vitamin, protein, terpenoidler, yağ asitleri, mineraller, sterol, fenolik bileşikler ve halojene ketonlar gibi önemli pekçok metabolit ortaya çıkarılmıştır. Bu metabolitlerin güçlü antioksidan içeriğinin yanısıra antibakteriyel, antiviral (Ray, 2004; Fıtton, 2006), antifungal (Zinedine et al., 2004; Haliki et al., 2005), antihipertansif, antitümör (Harada et al., 1997) ve özellikle antikanser (Güner et al., 2015) ajan olarak kullanılabilceği ortaya konulmuş ve başta Çin, Japonya ve Hindistan olmak üzere pekçok ülkede geniş bir alanda kullanıma sunulmuştur. Son yıllarda doğal ürün temelli besin ve ilaçlara olan ilgi gittikçe artmasına paralel olarak zengin içeriğe sahip alglerde bu konuda hak ettiği yeri almaya başlamıştır. Özellikle kanser tedavilerin de uygulanan klasik tedavilerin yan etkileri, bağışıklık kazanımı ve toksik etkileri göz önüne alındığında yüksek antioksidan içerikli, daha etkin ve nispeten az toksik özellikli alglerin bu alanda alternatif uygulamalar olarak kullanılma fırsatı doğmuştur.

Algler, sahip oldukları karakteristik özelliklere göre özellikle kahverengi, kırmızı ve yeşil alglerin oluşturduğu makroalgler ile mikroalgler olarak hem birer doğal ürün hem de sentetik moleküllerin yapımında yapısal birer ajan olarak da

rol almaktadırlar (Guiry and Nic, 2001). Ekolojik önemlerinin yanısıra endüstrinin birçok alanında da ham madde olarak kullanılmaya başlanarak gıda, tarım, eczacılık, kozmetik ve tıp gibi birçok alanda hizmete sunulmuştur.

Dünyada bu derece yoğun kullanıma sahip alg gruplarının ülkemizde yeterince ilgi görmemesi ve araştırmaların sınırlı alanda kalması bu çalışmanın temelini oluşturmakla birlikte, bu çalışmada İzmir kıyı şeridinde dağılım gösteren ve ekonomik öneme sahip olan *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau, *Enteromorpha linza* J.Agardh ve *Gracilaria gracilis* M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham deniz makroalglerinin n-Hekzan, kloroform ve metanol ekstraktlarının kimyasal içerik analizi yapılmıştır. Bununla birlikte, alglerin antioksidan, antimutajenik, sitotoksik ve pro/antiapoptotik, yara iyileştirici ve antianjiyogenik aktiviteleri ile *in vivo* protektif potansiyeli farklı sekonder metabolite sahip alg gruplarının karşılaştırılması yapılarak gelecekteki gıda veya tıbbi kullanımlarına yön verilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Alglerin Genel Özellikleri

Algler kök, gövde ve yaprak farklılaşması olmaksızın klorofil içeren çok veya tek hücreli canlıların oluşturduğu yeryüzünde hemen her yerde bulunabilen fotosentetik canlı grubudur. Güneş ışığından aldıkları enerjiyi fotosentez sürecinde kimyasal enerji olarak depo ederek canlılar için gerekli olan oksijenin kaynağını oluştururlar (Field et al., 1998). 3.8 milyon yıllık geçmişe sahip olan alglerin yaklaşık olarak 280.000 türe sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu türlerin boyları 70 m ile 3-5 µm arasında değişmekte olup günlük 50 cm'e kadar büyüeyebilen türleri de mevcuttur (Bold and Wynne, 1985; Anbuhezian and Karupiah, 2015).

Algler buldukları ortamda büyümeyi sürdürmek için pH (7-9), tuzluluk, besin miktarı ve kalitesi, sıcaklık, ışık, makro- (nitrat, fosfat ve silikat) ve mikronutrientler (iz metaller, biotin, siyanokobalamin) gibi faktörlere ihtiyaç duymaktadırlar (Lee, 2008). Dış görünüşleri tek hücreli ve iplikli formlardan karışık olarak gelişmiş türlere kadar değişik şekillerde görülebilmektedirler (Round, 1973). Bu bitki grubunun üremesi vejetatif, eşeyli ve eşeysiz şeklinde gerçekleşmektedir. Alglerde en yaygın vejetatif üreme görülmektedir.

Fragmentasyon, hormogonia, akinet, bulbil ve tuber gibi değişik şekillerde gerçekleşebilen vejetatif üreme genellikle hücrelerin büyüyerek koloni oluşturmaya ve bunların daha sonra normal büyüme sonucu bölünmesine dayanır (Cyanophyceae, Diatoms, Ulotrichales). Eşeysiz üreme doğrudan doğruya çoğalabilme kabiliyetine sahip farklılaşmış veya özelleşmiş spor denilen hücrelerin birer birey oluşturarak ana hücreden ayrılmalarıyla gerçekleşmektedir (Cladophora, Chlorella, Rhodophyceae). Eşeyli üreme ise, alglerin genel bir özelliği olmayıp aynı veya farklı iki bireyden oluşan, eşey bakımından farklı olan iki üreme hücresi veya nukleusun birleşip gelişmesiyle olur (Spirogyra, Volvox, Fucus) (Güner, 1991).

Algler daha çok kıyı şeridini işgal eden makroalgler ile fitoplankton olarak okyanus tabanında, bentik ve kıyı şeridinde yerleşim gösteren mikroalgler (siyanobakteriler ile ökaryotik mikroalgler) olmak üzere iki büyük grupta sınıflandırılır (Garson, 1989; Borowitzka, 2013). Boyutları göz önüne alındığında (prokaryotik mikroalgden ökaryotik makroalge kadar) çok çeşitli sınıflandırma yapılabilmektedir (Plaza et al., 2008). Algler için sınıflandırmanın temeli sahip oldukları renk pigmentlerine göre yapılır: yeşil (*Chlorophyceae*), kırmızı (*Rhodophyceae*) ve kahverengi (*Phaeophyceae*). Bu farklılıklar sadece pigmentasyonla ilişkili olmayıp aynı zamanda depo materyali ile hücre duvar polisakkarit bileşenleriyle de ilişkilidir (Alves et al., 2013; Balboa et al., 2013).

Birçok türe sahip olan ve oldukça geniş bir dağılım gösteren alg ailesi yaşadıkları ortamda herhangi bir etkenle maruz kaldıkları uyarılara karşı (UV, sıcaklık, pH, ısı, savunma vb.) sahip oldukları aktif kimyasal ajanlarla (sekonder metabolitler) karşı koyma yeteneği gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı başta eczacılık alanında ilaç hammadesi olmak üzere antikanser, antitümör, antimitojenik, antianjiyogenik ve antioksidan olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Aynı zamanda yüksek oranda vitamin, mineral ve doymamış yağ asidi içerikleri ve düşük yağ içeriklerinden dolayı insanlık tarihi boyunca besin maddesi olarak tüketilmektedir (Fujihara et al., 1984; Tseng and Chang, 1984) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Alglerin bileşimi ve genel kullanım alanları (Barbot et al., 2016)

Bileşik	Yeşil Alg	Kırmızı Alg	Kahverengi Alg
Su içeriği	70%–85%	70%–80%	79%–90%
Kül	18%–53%	26%–48%	33%–55%
Toplam organik madde	47%–82%	52%–74%	44%–66%
Karbonhidrat	25%–50%	30%–60%	30%–50%
Polisakkarit	Aljinat Selüloz Mannan Nişasta Ulvan	Agar Alginat Karrajen Selüloz Lignin	Agar Alginat Karrajen Selüloz Fukoidan Laminarin Mannitol
Protein	12%–13%	10%–16%	7%–12%
Lipit	2%–3%	0%–3%	0%–2%
Endüstriyel Ekstreler	Sülfatlanmış galaktan, Vitaminler, Antiviral ve Antikoagülan ajanlar	Sülfatlı galaktanlar, vitaminler, mineral besleyiciler (Iyot), agar, Fikobiliproteinler	Fukoidan, fukan hidrokolloidleri (Alginat, karaginan, Agar-agar) polifenoller, mineral, pigmentler
Endüstriyel Kullanım	İnsan gıdası, takviye besin, tıbbi kullanım	İnsan gıdası, hayvan yemi, koyulaştırıcı, emülgatör ve jelleştirici madde, endüstriyel ve laboratuvar kullanımı ve kozmetik	İnsan gıdası, hayvan yemi, Tekstil baskısı için alginat, Tıbbi elyaf, kağıt endüstrisi, Kozmetik, laksatif olarak agar İlaç endüstrisi, Fermentatif üretim Organik asitler

1.1.1. Yeşil alglerin genel özellikleri

Fotosentetik alglerin en eski atalarından olan yeşil algler 900 ile 500 milyon öncesine dayanan bir geçmişe sahiptir. Trebouxiophyceae (çoğunlukla karasal ve tatlı su), Chlorophyceae (çoğunlukla tatlı su), Bryopsidophyceae, Dasycladophyceae, Siphoncladophyceae ve Ulvophyceae sınıflarıyla temsil edilen yeşil algler deniz, tatlı su ve karasal yaşamda bulunan formlarıyla yaklaşık 7000'den fazla türe sahiptir. Ulvophyceae diğer sınıflara nazaran hücresel, morfolojik ve çeşitliliği açısından daha fazla değişkenlik göstermektedir (Guiry, 2012).

Tek hücreli ya da koloni oluşturan çok hücreli türlere kadar, dallanmış ya da dallanmamış ipliksi, farklılaşmış talluslarla karakteristik örnekler sahiptir. Hücrelerinde çekirdek, kloroplast ve klorofil a, b ve çeşitli karotenoidleri (karotin, lutein, ksantofil ve pirenoidler) içermekte olup fotosentez ürünü nişasta ve yağlardır. Hücre çeperi selüloz içeren polisakkaritlerden meydana gelmektedir. Yeşil alg grubundan yaklaşık 15 farklı alg türü aktif olarak tanımlanmıştır. Üremeleri fisyon (yarma), tomurcuklanma, parçalanma veya zoospor (hareketli sporlar) şeklinde eşeysiz üreme ile izogami (gametler hareketli ve aynı boyutta), anizogami (hareketli ve farklı boyutta) veya oogami (dişi hareketsiz, erkek hareketli) ile eşeyli üreme şeklindedir (Pickett-Heaps, 1975; Lewis and McCourt, 2004) Aynı zamanda mantarlar ile birliktelik yapıp likenleri oluşturmaktadırlar (Güner ve Aysel., 2009).

1.1.2. Kahverengi alglerin genel özellikleri

Kahverengi algler yaklaşık 1800 tür ile temsil edilen, uzunluğu 60 m bulabilen kompleks morfolojiye ve gelişmiş anatomiye sahip gruptur. Bu alg ailesinde ksantofil pigmenti fucoksantin, beta-karoten, klorofil a, c (klorofil b yoktur) ve diğer pigmentleri maskelediğinden renkleri koyu zeytin yeşilinden kahverengiye kadar değişmektedir. Gıda rezervleri genellikle karmaşık polisakkaritler, şekerler ve yüksek alkollerdir. Temel karbonhidrat rezervleri laminarindir ve gerçek nişasta (yeşil algler ile karşılaştırıldığında) yoktur. Hücre duvarları selüloz, aljinik asit ve uzun zincirli heteropolisakkaritten oluşmaktadır

(Dawes, 1998; Van den Hoek et al., 1995). Hücreleri bir tane çekirdeğe sahip olup, nukleusları belirgindir ve hareketli hücreleri iki kamçı taşımaktadır (Sharma, 1986).

Bilinen tek hücreli veya koloniyal temsilcileri olmayıp; en basit formu tek dallı ve iplikli talluslara sahip olanlardır ve çok hücreli alglerin büyük kısmını oluşturan bu grup protista şubesine aittir (Raven et al., 2005). Eşeyli üreme pek çok kahverengi alg türünde haploid ve diploid olarak değişiklik göstermekle birlikte isogami, anisogami veya oogami şeklindedir (Thomas, 2002). Gelgit sıçrama bölgesi, kaya havuzları, intertidal bölge ve nispeten derin kıyıya yakın sular gibi geniş bir yelpazede yaşam alanına sahipken sadece bazı türler tatlı sularda yaşamaktadır (Lee, 2008). Değerli bileşiklere sahip sekonder metabolitler çoğunlukla Dictyotales, Fucales ve Laminariales sınıfa ait 53 türden rapor edilmiştir. Ekonomik olarak yenilebilir türlerinin olmasının yanısıra özellikle ticari alanda geniş kullanıma sahip alginat üretiminde bu alg grubunu ön planda tutmaktadır.

1.1.3. Kırmızı alglerin genel özellikleri

Rhodophyceae kelime olarak Rhodo: Kırmızı, Phykos: Yosun, Phyta: Bitki anlamına gelmektedir. Alglerin en gelişmiş grubunu teşkil eden kırmızı algler, tropikal, ılıman ve soğuk su bölgelerinin kıyı ve kıta sahanlığı alanlarının boyunca baskın olarak yaşayan yaklaşık 5000-6000 türe sahiptir (Woelkerling, 1990).

Rhodophyta (kırmızı algler), fikobilizomlarda fikoeritrin, fikosiyanin ve allofikosiyanin gibi fotosentetik renk pigmentlerinin yanı sıra, kamçı ve sentriyollerin yokluğuyla karakterize olmuş ökaryotik alglerin en eski ve en büyük gruplarından birisidir. Sahip oldukları bu pigmentler kırmızı ışık yansıtma ve mavi ışığı emme özelliğine sahiptir. Mavi ışık diğer uzun dalga boylarındaki ışıklardan daha büyük bir derinliğe kadar nüfuz ettiği için, kırmızı alglerdeki fotosentetik pigmentler diğer birçok yosundan biraz daha büyük derinliklerde yaşama şansı tanır. Bazı kırmızı alglerde çok az fikoeritrine sahip olduğundan klorofil ve mevcut diğer pigmentlerden dolayı yeşil veya mavimsi görünebilir (Dixon Peter, 1977; Viola et al., 2001). Sitoplazmalarında uzun dallanmış amilopektinden oluşan florida nişastasını depo ederler.

Pekçok kırmızı alg, çok hücreli, makroskopik, denizel ve eşeyli üreme ile karakterizedir. Bu alg grubu çift hücre duvarlarına sahiptir. Dış tabaka agar eldesinde kullanılan agaropektin ve agaroz polisakaritler içerirken, iç duvarları daha çok selülozdan oluşmaktadır (Fritsch, 1945). Karmaşık yaşam döngülerinin hiçbir evresinde hareketli hücreler ve taşıyıcı hücreler görülmediğinden dışı organın gametlere ulaşması için su akıntılarını kullanmaktadırlar. Aynı zamanda iki yerine üç nesilden oluşan hayat devresi görülmektedir. Kırmızı algler dışı organları bakımından *Coleochaeta*'ya (yeşil alg) yakın oldukları düşünülürken, sahip oldukları fikoeritrin ile fikosiyanın pigmentlerden dolayı Cyanophyta'ya yakın oldukları düşünülmektedir (Ercan, 1995).

Kırmızı algler, agar maddesi içermelerinden dolayı büyük bir ekonomik değere sahipken, yüksek içerikli protein ve vitaminden dolayı özellikle Ortadoğu'da besin olarak tüketilmektedir. Hızlı büyüme özelliklerinden *Gracilaria* ve *Gelidium* türleri kültürasyonda ve hammadde bakımından önemli kaynak sağlarlar (Kadan, 1994).

1.2. Alglerin Biyolojik Aktiviteleri ve Ekonomik Önemi

1.2.1. Alg sekonder metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri

Bitki sekonder metabolitleri primer metabolitler dışında bir organizmanın yaşamsal aktiviteleri sürecine direkt dahil olmayan, biyolojik dağılımı sınırlı, genellikle türe özgü ve çoğunlukla çevre etkileşimleri sırasında müdahale için üretilen aktif kimyasal bileşenlerdir. Sekonder metabolitler mikrobiyal patojenlere ve predatörlere karşı savunmada, abiyotik streslere karşı savunmada (kuraklık, tuzluluk, UV-B maruziyeti), diğer organizmalar ile iletişimde ve diğer ekolojik işlevlerde önemli görevler üstlenmektedirler (Williams et al., 1989).

Sekonder metabolitler, bitkilerin strese maruz kaldığı durumlarda, hücrelerde lokalize olan inaktif haldeki ana bileşiklerden enzimatik olarak meydana gelmektedir (Croteau et al., 2000). Alg türleri arasında sekonder bileşiklerin dağılımı ve konsantrasyonundaki farklılıkları ortaya koymak için yürütülen çalışmalarda bu ürünlerin kalıtsal olarak aktif oldukları ileri sürülmüştür (Wright et al., 2004). Biyoaktivite bir liganda bir iyon veya molekül

bağlanmasıyla downstream kaskadlanmayla sonuçlanan fiziksel bir süreçtir. (Vining and Taber, 1979; Williams et al., 1989).

Proteinler ve enzimler yüzeylerinde bol miktarda fonksiyonel gruplar oluşturarak moleküler etkileşimler için olanak sağlarlar. Sekonder metabolitlerin bağlanması moleküller arası iyonik bağlar, hidrojen bağları, π -stacking etkileşimleri ve van der waals bağlarının etkileşimleri ile etkilenmektedir. Ekolojik etkileşimin reseptörleri, bunları kodlayan genler ve çoğunun üretim yolları henüz keşfedilmemiştir (Pawlik, 1993; Oskay ve Oskay, 2009). Alglerde enzimleri kodlayan spesifik genlerin moleküler karakterizasyonu, sekonder metabolitlerin yollardaki dağılımlarını ortaya koymaya çalışan yardımcı tekniklerden biridir. Bu mikroskala teknikleri, alglerde moleküler switchleri (biyokimyasal ve çevresel gen ifadesinin regülatörler) tanımlamak ve genetik düzenlemedeki ilişkileri belirlemede kolaylık sağlamaktadır. Sekonder metabolitler tüvlandıkları biyosentetik yollara göre sınıflandırılmaktadır. Bu yollar bu aktif ajanlar için bir çerçeve oluşturursa da onların asıl eşsizliği sahip oldukları özelleştirilmiş enzimlere bağlıdır. Aynı zamanda alkol grupları eklenmesi, halojenleme, oksidasyon, indirgeme, stereokimyasal manipülasyon ya da siklizasyon buna katkı sağlamaktadır (Clardy and Walsh, 2004; Maschek and Baker, 2008). Bitki sekonder metabolitlerin temelde şikimat yolağı (fenol, fenilpropan ve flavonoid), mevalonat yolağı (izopren ve terpen) ve asetat yolağı (Burja et al., 2001) olarak 3 metabolit yolağı üzerinden sınıflandırılma yapılmıştır.

Şikimatlar: Pekçok aromatik metabolitleri temsil eden fenilalanin, tirozin, triptofan ve bunların tüvleri ile *Sargassum* kahverengi alglerinde bulunan hidrokinonlarda (Segawa ve Shirahama, 1987) dahil olmak üzere temsil edilmektedir. İzoflavonoidlerin ve neoflavonoidler dahil olmak üzere bitkilerde bulunan flavonoidler şikimatların yapısal bir sınıfıdır (Knaggs, 2003).

Mevalonat yolağı: 5-C isopentanoit birimlerinden oluşan terpenler, birçok otobura karşı önleyici ve toksinlerdir. Makroalglerden elde edilen sekonder metabolitlerin yarısından fazlasını izoprenoidler oluşturmaktadır. Terpenler, steroidler, karotenoidler, prenile kinonlar ve hidrokinonlar mevalonat bağımlı

veya bağımsız yolağıyla aktive olan isoprenoit sınıfının elemanlarıdır (Gershenzon and Croteau, 1991; Stratmann et al., 1992).

Mevalonat yolağı: Asetil-CoA'nın 3 molekülünden oluşmuş olup, asetat yolğından daha farklı bileşikleri (terpenoidler, steroidler ve karotenoidler) asetat kannalarına gönderir (Buhaescu and Izzedine, 2007).

Alglerde ise bazı kaynaklarda özelleşmiş sekonder metabolit üretiminden yola çıkılarak 5 farklı biyokimyasal yolak sınıflandırılması görülmektedir. vardır (Clardy and Walsh, 2004; Mazid et al., 2011) (Şekil 1.1).

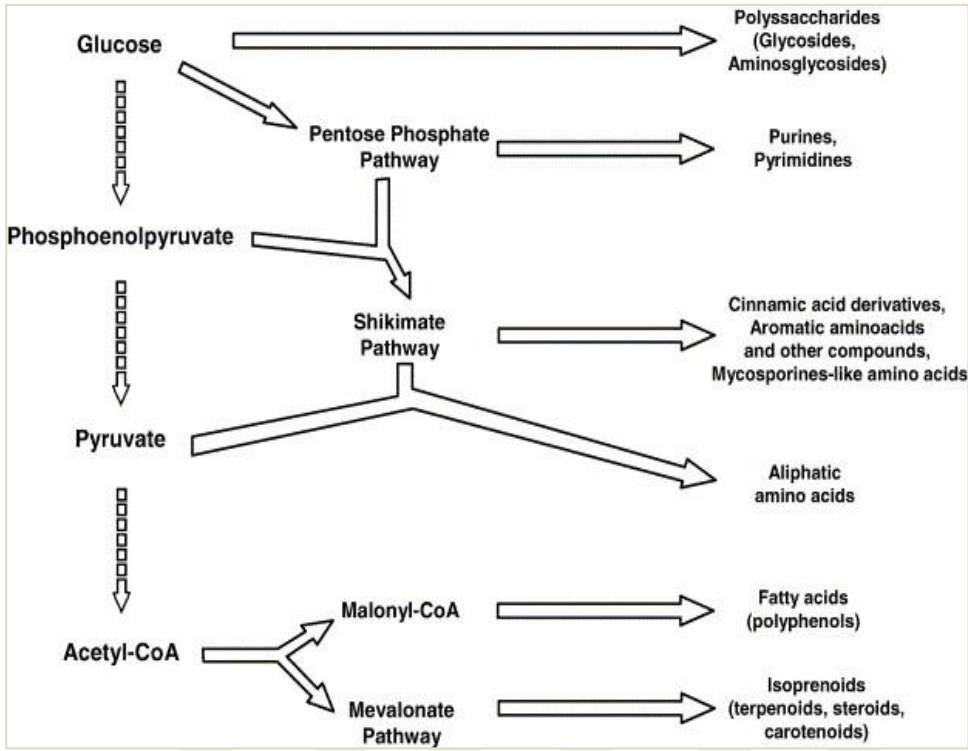
Eikosanoid yolağı: Bu yolak alglerde çok sayıda oksilipin (potansiyel sinyaller), çoklu doymamış aldehitler (potansiyel olarak defansif) ve gamet cezbedicilerin (hormonlar) oluşumundan sorumludur (Pohnert and Boland 2002; Potin et al., 2002).

İzopronoid yolağı: Bu yolağın dağılımı değışkendir ve alglerin evrimsel tarihi ilişkin bilgi sağlayabilir. Hemen tüm canlı hücrelerinde görülen bir metabolik yolaktır. Bu reaksiyonlar zinciri sonunda oluşan hidrofobik moleküllerin hücre zarı bakımı, hormon üretimi, proteinlerin zarlara tutturulması, ve N-glikasyon gibi çeşitli görevleri vardır (Schwender et al., 1997; Holstein and Hohl, 2004).

Şikimat yolağı: Aromatik amino asitlerin üretimi ve birçok bitki sekonder metabolit prekürsörü ile fenilalanin yapımından sorumludurlar. Yeşil ve kırmızı alglerde bu yolağın tüm detayları aydınlatılmıştır (Richards et al., 2006).

Fenilpropanoid yolağı: Deniz alglerinde bu yolağın günümüzdeki tek kanıtı *C. crispus* kırmızı alginde fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enziminin en önemli uyarımı olmasıdır (Bouarab et al., 2004).

Poliketid yolağı: Zehirli alg türleri ve siyanobakteriler tarafından salgılanan toksinlerin pekçoğı bu yolak üzerinden aktive olmaktadır (Dittmann and Wiegand, 2006; Hertweck et al., 2007).



Şekil 1.1 Primer ve sekonder metabolitlerin başlıca biyosentez yolları (Burja et al., 2001)

19. yüzyıldan itibaren denizel ve karasal kaynaklı sekonder metabolitlere olan ilginin artmasıyla birlikte, makroalgler de denizel alandan bildirilen bileşiklerin yaklaşık % 20'sine tekabül edecek şekilde 3.000'den fazla doğal ürün ile önemli bir yer edinmiştir (Blunt et al. 2007). 1960'lı yıllarda dünya genelinde kurulmuş olan deniz doğal ürün laboratuvarları ile yıllık olarak önceki yılın %50'si kadar yeni sekonder metabolit tanımlanmış olup, 2000'li yıllardan sonra ise eczacılık (sülfatlı polisakaridler, kahalalid) ve antifouling (fimbrolides) alanlarında makroalg kaynaklı yeni metabolitlerin arayışına hız verilmiştir (Smit, 2004; Bhadury and Wright, 2004). Makroalglerin ürettiği bu aktif kimyasalların insan sağlığı için yararlı birçok biyolojik etkinliğe, antiviral, antimikrobiyal, antitrombik, antikoagülant ve hücre büyümesini inhibe edici etkileri olduğu ortaya konulmuştur (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Alg ekstrlerinde biyolojik olarak aktif bileşiklerin özellikleri.

Alg ekstrleri	Antioksidatif	Protein, Polisakkarit, PUFAs Micosporin benzeri a.a. Glutasyon, Polifenol, Karotenoid, Tokoferol, Askorbat
	Antitümör	Polifenol, Karotenoid, Polisakkarit
	Antibakteriyel	Protein, Polisakkarit, Polifenol, Pigment, PUFAs
	Antifungal	Pigment, PUFAs, fenol, terpen
	Antiinflamatuvar	Protein, Polisakkarit, Karotenoid Sterol, Polifenol
	Antiviral	Protein, Polisakkarit, Polifenol, Diterpen, Karotenoid

Bu alandaki araştırmalar incelendiğine, biyolojik ve eczacılık etkili doğal ürünlerin ağırlıklı olarak denizel kahverengi (Phaeophyceae), kırmızı (Rhodophyta) ve yeşil makroalgler (Chlorophyta)'e ait türlerde olduğu anlaşılmaktadır (Bhadury and Wright, 2004). 1500'den fazla bileşiğe sahip kırmızı algler diğer alg gruplarından daha fazla çeşitliliğe ve verimliliğe sahiptir. Bu alg grubunda isoprenoit, asetojenin türevleri, amino asit, şikimat ve nükleik asit türevleri yer alır. Aynı zamanda halojenli bileşiklerin önemli üreticileri olup % 90 brom veya klor ihtiva ettiği ortaya konulmuştur (Harper et al., 2001; Munro and Blunt 2005). Rhodophyta'dan rapor edilen kimyasalların yarısından fazlası (% 57) Rhodomelaceae familiasına ait olup ve bunlardan büyük çoğunluğu (% 85) Laurencia cinsinden elde edilmektedir (Sims et al., 1971). Kahverengi alg grubundan yaklaşık 1.140 sekonder metabolit rapor edilmiş olup, diterpenler, florotannins, çok küçük halojenler ile küçük C₁₁ asetogeninler bu grubun karakteristik bileşikleridir (Blunt et al., 2007). Florotanninler veya polifenoller, kahverengi alglerde özel bulunan poliketitlerin yapısal sınıflardır. Yaygın kolorimetrik yöntemler ile kolaylıkla miktar tayini yapılabilen florotanninler, antialgal ve antifungal etkilerinin yanısıra yara iyileşmesi, herbivorlara karşı savunma, mikrobiyal enfeksiyon, metal iyonu şelasyonu ve UV koruması gibi ekolojik roller oynadığı ortaya konulmuştur (Targett and Arnold, 1998; Amsler and Fairhead, 2006). Yeşil algler yaklaşık 300 sekonder metabolit ile makroalg ailesi içinde en az metabolik ürüne sahip grubu oluşturmaktadır (Blunt et al., 2007). Yeşil algler di- ve seskiterpenlerce zengin gruplardır ve kırmızı alglerden

farklı olarak yaygın halojenik bileşiklerce fakirdir. Chlorophyta karakteristik bileşiği birçok yeşil alg terpenlerinde bulunan "1,4-diaseokbütadien dienolate esterin" varlığıdır.

1.2.1.1. Alglerin antioksidan aktiviteleri

Serbest radikaller normal hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak canlı hücreler tarafından üretilen, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren ve diğer biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girme potansiyeli olan oluşumlardır (Gilbert and Colton, 2002).

Belli bir seviyedeki serbest radikaller hücrenin sinyal iletiminde, hücre adezyonu, hücrel immün yanıt, apoptoz ve hücre canlılığı gibi hayatsal faaliyetlerde gereklidir (Mittler et al., 2011). Normal şartlar altında reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller antioksidan savunma sistemiyle elemine edilir. Fakat hücrel oksidasyon (süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil radikali ($\bullet OH$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve LPO (lipit peroksit) kaynaklı endojen veya sigara, radyasyon ve pestisit kaynaklı eksojen maruziyetinde ROS eliminasyonu ve üretimi arasındaki denge bozulur. Böylece serbest radikallerin toksik etkileri stres oluşturarak kanser, kardiyovasküler hastalık, karaciğer hastalıklar, diyabet, böbrek yetmezliği ve beyin hasarı gibi pekçok hastalığın patogenezinine yol açar (Halliwell, 1994).

ROS'a karşı savunmaya destek veren antioksidan sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan olarak 2'ye ayrılır. Enzimatik antioksidan sistemi, doğrudan veya dolaylı ROS'a karşı savunmaya katkıda bulunur. Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz başlıca enzimleri olup bu enzimlerin fonksiyonu için eser elementlere (bakır, çinko ve selenyum) ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimatik olmayan sistemler ise vitaminler (A, C, E ve K), enzim kofaktörleri (S10), mineraller (Zn, Se ve benzeri), β -karoten, organokükürt bileşikleri (allium ve allium sülfür), azot bileşikleri (ürik asit), peptidler (glutation) ve polifenoller (flavonoitler ve fenolik asit) gibi düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerden oluşur (Fang et al., 2002; Mehta ve Gowder, 2015).

Fizyolojik antioksidan sistemler birkaç farklı hattan savunmayı gerçekleştirmektedirler (Niki et al., 2014). Scavenging (süpürme etkisi) mekanizmada glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimlerle peroksidanları daha kararsız moleküle dönüştürerek elemine etmektedir. Quenching (söndürme etkisi) sisteminde vitamin ve flavanoidler ile oksidasyona bir hidrojen aktararak etkisizleştirmektedir. Chain breaking (zincir kırma) reaksiyonlarında mineral ve hemoglobin gibi bileşiklerle serbest radikalleri kendine bağlayarak daha kararlı hale getirirken; Repair (tamir etkisi) mekanizmasında ise okside molekülleri DNA enzimleri ve proteolitik enzimler yardımıyla tamir ederek savunma sistemine katkıda bulunurlar.

Vücudun antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin yan etkilerini elemine edebilme yeteneğine sahipken, bunların aşırı üretiminde bağışıklık sistemi yetersiz kalabilmektedir. Bu durumu ortadan kaldırmak için antioksidanca zengin doğal veya sentetik ürünlerin dışarıdan takviyesine gerek duyulmaktadır. Butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitolüen (BHT), propilgalat (PG) ve butilhidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanların ticari olarak kullanımı mevcuttur. Fakat bazı sentetik antioksidanlar karsinojenik etkilerinin yanısıra böbrek ve diğer organlarda sebep oldukları patolojik zararlardan dolayı kullanımı sınırlandırılmıştır (Farvin ve Jacobsen, 2015). Bu sebeplerden dolayı pek çok araştırmacı yan etkileri yok veya az olan gıda ve ilaç bileşimi olarak etkili oksidasyon inhibitörü olabilecek doğal ürün arayışına yönelmiştir.

Dünyanın hemen her yerinde dağılıma sahip olan makroalgler, diğer canlı türlerinden farklı olarak, özellikle kıyı şeridi algleri, UV, rüzgar, gelgitler, ani ısı değişimleri, denizel kirlilik ve sudaki canlılar gibi pekçok faktöre karşı hayatta kalması için üstün bir korunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bu mekanizma sırasında ortaya çıkardıkları sekonder metabolitler birer antioksidan kaynağı olarak kullanılabilceği fikrini doğurmuştur. Yapılan sayısız çalışmalarla alglerin antioksidan bir kaynak olarak kullanılarak serbest radikalleri engelleme, erteleme veya uzaklaştırma yoluyla sisteme katkıda bulunabileceği ortaya konulmuştur (Cornish and Garbary, 2010).

Algler, glutatyon ve askorbat gibi reaktif antioksidan moleküllerinin yanısıra karotenoidler (α - ve β -karoten, fukoksantin, astaksantin), mikosporin

benzeri amino asitler (mikosporin glisin), kateşinler, gallat, florotanninler (örneğin, floroglukinol), eckol ve tokoferoller gibi sekonder metabolitlerce zengin bitki gruplarıdır (Yuan et al., 2005). Bu alanda yapılan çalışmalarda, *Cystoseira crinita* esmer alginden elde edilen pireniltolukininlerin potansiyel radikal süpürücü etkiye sahip olduğu (Fisch et al., 2003), *Ecklonia stolonifera*'dan elde edilen florotanninler ise DEPP radikal süpürücü etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Kang et al., 2003).

Kumar et al., (2008) *Sargassum marginatum*, *Padina tetrastomatica* ve *Turbinaria conoides* kahverengi alg türlerinin antioksidan kapasitesini değerlendirdikleri çalışmada, *Sargassum marginatum* etil asetat fraksiyonlarının 39.62 mg askorbik asit equivalent/g ekstre en yüksek aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. *Euchema kappaphycus*, *Gracilaria edulis* ve *Acanthophora spicifera* kırmızı alglerinin antioksidan aktivitelerinin incelendiği başka bir çalışmada, *Acanthophora spicifera* etanol ekstrelerinin 32.01 mg askorbik asit equivalent/g değerliyle en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ganesan et al., 2008).

Qi ve ark., (2005) yeşil alg *Ulva pertusa*'dan elde edilen sülfat polisakkaritlerinin antioksidan aktiviteleriyle ilgili yürüttükleri çalışmada, ulvanın süperoksit ($IC_{50}=22.1 \mu g mL^{-1}$) ve hidroksil radikallerini ($IC_{50}=2.8 mg mL^{-1}$) önemli ölçüde inhibe ettiğini ve dolayısıyla bu alg türünün güçlü bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Kırmızı alglerin sahip olduğu fenolik içerikleriyle antioksidan kapasite arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalarda, özellikle *Ulva*, *Entoromorpha* ve *Chaetomorpha* türlerinde flavanoidlerin antioksidan kapasiteyle ilişkili olduğu (Cho et al., 2010) ve klorofille ilişkili bileşiklerin fenolik maddelerden daha etkin rol oynadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde deniz alglerinde bol bulunan flavonoit ler ve polifenol bileşiklerinin endojen savunma sistemini kullanarak doğrudan serbest radikalleri elemine ederek hücreyi oksidasyon hasarına karşı koruduğu ifade edilmiştir. (Scalbert et al., 2005).

Alglerin antioksidan kapasitelerinin tespit edildiği çalışmalara istinaden çeşitli hastalıklara karşı koruyuculuk veya ortadan kaldırmaya yönelik çok sayıda

laboratuvar çalışmaları da yürütülmüştür (Çizelge 1.3). Godarda et al., (2009) tarafından bu konuya ilişkin hiperkolesterolemik hamsterlarda *Ulva*'nın etkilerinin incelendiği bir çalışma yürütülmüştür. Çalışma sonucunda kontrol grubuna kıyasla *Ulva*'yla beslenen grupta plazma kolesterol, non-HDL kolesterol ve trigliserid seviyelerinde önemli azalmalar kaydedilmiştir.

Çizelge 1.3 Alglerden elde edilen bileşiklerin antioksidan özellikleri (Cornish and Garbary, 2010)

Genel kategori	Bileşik	Alg Türü
Karotenoid β-	Karoten Fukoksantin, Antheraksantin, lutein, violaksantin, ksanthofil, zeaksantin	<i>Chondrus crispus</i> , <i>Mastocarpus stellatus</i> Kahverengi alg Kırmızı alg
Fenolik Bileşik	Stypodiol, isoepitaondiol, taondiol, Terpenoid	<i>Taonia atomaria</i> <i>Cystoseira</i> sp.
Fikobilin pigmentleri	Fikoeritrin, fikosiyenin	Genelde kırmızı alglerde
Fenoller	Kateşin, epikateşin, gallat Flavonoit ve Florotannin	<i>Halimeda</i> sp. <i>Palmaria palmata</i> <i>Sargassum pallidum</i> <i>Fucus vesiculosus</i>
Sülfat polisakkarit	Fukoidan, alginik asit, laminaran Fukoidan Sülfat galaktans (lambda karrajen) Galaktan, Sülfate glikosaminoglikan Porphyran	<i>Turbinaria conoides</i> <i>Laminaria japonica</i> Bazı kırmızı algler Kırmızı alglerin çoğu <i>Sargassum wightii</i> <i>Porphyra</i> sp.
Vitaminler	Askorbat Vitamin A	<i>Chondrus crispus</i> <i>Mastocarpus stellatus</i> <i>Sargassum</i> sp. <i>Kappaphycus alvarezii</i>

Laminaria, *Porphyra* ve *Palmaria* gibi birkaç alg türün antioksidan kapasitesinin bağırsak, meme ve insan servikal adenokarsinoma kanser hücre hatları üzerine ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, florotannin, polifenol ve mikosporin-benzeri amino asitlerce zengin olan alg türlerinin kanser hücrelerini daha fazla inhibe etme potansiyeline sahip olabileceği ortaya konulmuştur (Yuan and Walsh, 2006). Aynı şekilde, insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) *Fucus* sp. ekstralarının H₂O₂- aracılı serbest radikalleri elemine ederek DNA'da oluşabilecek yıkımlara karşı koruyucu rol üstlendiği rapor edilmiştir (O'Sullivan et al., 2011).

Soo-Jin et al., (2005) 7 farklı kahverengi alg türünün enzimatik ekstraktlarının antioksidan potansiyeliyle ilişkili yürüttükleri çalışmasında, enzim ekstraktlarının hidrojen peroksiti %90 oranında süpürme aktivitesi gösterdiğini hatta ticari antioksidanlardan daha yüksek aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Buna paralel olarak, Ege körfezinden toplanan 5 farklı kahverengi alg türünün farklı solvan ekstraktlarıyla ilgili yürütülen çalışma sonucunda, *Dictyota dichotoma* var. *implexa*'nın en yüksek total fenolik madde içeriğine sahip olduğu ortaya konulmuştur (Demirel et al., 2009).

1.2.1.2. **Alglerin antimikrobiyal aktiviteleri**

Antimikrobiyal maddeler mikroorganizmaların büyümesini engelleyen veya öldüren ve mikrobik enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan ajanlardır. Antimikrobiyal ilaçlar onlara öncelikle karşılık hareket eden mikroorganizmalara göre sentetik veya doğal olarak antibakteriyel, antiviral, antifungal ve bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşikler şeklinde bulunabilir (Murray et al., 2005). Antimikrobiyal ajanlar başlıca dezenfektanlar (çamaşır suyu gibi objelerde yaşayan mikroorganizmaları öldürmek), antiseptik (cerrahi operasyon sırasında canlı dokulara uygulanan) ve antibiyotik (vücut içerisinde mikroorganizma yıkımında kullanılan) olarak sınıflandırılabilir. Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede en önemli silahlardan biri olup, keşfedildiğinden bu yana insan sağlığının kalitesini arttırmada yararlanılmıştır (Vowden et al., 2011). Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin kimyasal yapıları ve etki mekanizmalarının birbirinden farklı oluşu, toksin üretmeleri ve ilaçlara direnç kazanmalarıyla belirli hastalıklara karşı daha az etkili olmaya başlanmıştır. Bir antibiyotiğe karşı direnç geliştiren bakteri, farklı pek çok ilaca karşı da direnç geliştirmekte ve böylece çoklu ilaca karşı direnç kazanmaktadır. Şu anda, çoklu ilaca dirençli bakteri ile ilişkili tedavideki başarısızlıklar halk sağlığı için küresel bir endişe haline gelmiştir. Bu amaçla antibiyotik duyarlılığını değerlendirirken hastanın immün sistemi, antibiyotiğin absorpsiyonu, proteine bağlanması, enfeksiyon alanına ulaşma yeteneği ve salınım gibi eczacılık özellikleride göz önünde bulundurulmalıdır (Demain, 1999; Murray et al., 2005). Bu faktörler göz önüne alındığında yeni antibiyotiklerin keşfi hayati öneme sahiptir.

Bakteriler, ökaryotik mikroorganizmalar, bitkiler ve çeşitli hayvansal organizmalar gibi doğal ürünler yeni antibiyotiklerin keşifleri için en önemli kaynaklardır. 1990'lı yıllardan itibaren bitkisel ekstrater veya saf bileşikler, temel yağlar veya sentez edilen yeni bileşikler potansiyel ajanlar olarak kullanılmaya başlanmıştır (Cowan, 1999).

Organik solvanlar kullanılarak alglerden elde edilen alg ekstraterinin antimikrobiyal aktivite açısından pek çok çalışmaya konu olmuştur. Biyoaktif bileşiğe sahip pek çok alg türü bazı gram negatif ve gram pozitif bakteriyel patojenlerin büyümesini inhibe ettiği ortaya konulmuştur. Alglerde tanımlanan antibakteriyel bileşikler yağ, lipofilik bileşik, fenolikler, alkoloidler, polifenoller, halojenatlar ve izopirenoit bileşikleridir (Mohamed et al., 2012).

Manivannan et al., (2011) yürüttükleri bir çalışmada *Turbinaria conoides*, *Padina gymnospora* ve *Sargassum tenerrimum* kahverengi alglerinden elde edilen farklı solvan ekstraterinin önemli antibakteriyel faaliyet gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada, *Himanthalia elongata*, *Laminaria digitata* ve *Laminaria saccharina* ve diğer birkaç alg türünden edilen bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin kullanılan solvane göre değişiklik gösterdiği, kahverengi alglerden elde edilen metanol eksteresinin, yeşil ve kırmızı alglerden elde edilen aseton ekstresinden daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Cox et al., 2010).

5 bakteri türü üzerinde 151 deniz alginin etkilerinin incelendiği çalışmada, mevsimsel değişiminlerin alg türlerindeki antibiyotik üretimini önemli ölçüde etkilediği ortaya konulmuştur (Hornsey and Hide, 1974). *Ulva fasciata* (yeşil) ve *Hypnea musciformis* (kırmızı) alg türlerinden izole edilen bileşiklerin de geniş bir spektrumda *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi*'ye karşı antimicrobial aktivite göstermiştir (Selvin and Lipton, 2004). Benzer şekilde, Mannar körfezi alglerinden izole edilen metanol ekstraktları *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeurginosa* ve *S.aureus* gibi çoklu ilaca direnç gösteren bakterilere karşı farklı düzeyde etki gösterirken, çoklu direnç göstermeyen *Stocheospermum marginatum*'a karşı güçlü etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Manikandan et al., 2011).

Akdeniz kıyılarından toplanan 26 deniz alginin metanol ekstraktları 3 gram-pozitif (*E.faecalis*) ve 2 gram-negatif (*E.coli*, *Klebsiella*) bakteri suşlarına karşı güçlü ve orta düzeyde aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Rhimou *et al.*, 2010). Pakistan Karaci'den toplanan 32 alg türüyle yürütülen başka bir çalışmada, alglerin hemen hepsinin insan, hayvan ve bitkide yaygın gram-pozitif ve gram-negatif suşlara karşı farklı düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Muhammed and Shammel, 2004). Divya *et al.*, (2011) yürüttükleri çalışmada *Saragassum cinereum* metanol ekstrelerinin *S.typhi*, *K.pneumoniae*, *P.aeurginosa* ve *S.aureus* suşlarına karşı yüksek aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Bununla birlikte önemli birer potansiyel antimikrobiyal ajan olarak alglerden elde edilen seskiterpenlerce, florotanninler, bromoditerpenler, halojenli furanlar ve lektinler üzerinede pek çok çalışma yürütülmüştür.

Laurencia rigida (kırmızı alg) türünden elde edilen biyoaktif sesquiterpenler *Bacillus megaterium* üzerinde antibakteriyel etki gösterirken (König *et al.*, 2000), *Ecklonia kurome*'den elde edilen florotanninler hem gram-negatif hemde gram-pozitif bakteri büyümelerini inhibe ettikleri ortaya konulmuştur (Nagayama *et al.*, 2002). Urla kıyılarından toplanan çeşitli alg türlerinin dietil eter ekstreleri gram-negatiflere kıyasla gram-pozitifler üzerinde daha fazla yüksek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Tüney *et al.*, 2006). Aynı şekilde kırmızı alg *Laurencia majuscule* halojenat bileşikleri insan patojen bakterilerine (*Salmonella*, *Klebsiella* ve *Staphylococcus*) karşı aktivite gösterirken, *Delisea pulchra* halojenli furanonlar geniş bir spektrumda antibiyotik etkinlik göstermiştir (Vairappan, 2003). Bununla birlikte bitki ve hayvanda bulunan lektinlerle ilgili yürütülen diğer bir çalışmada, 8 kırmızı, 3 yeşil ve 2 kahverengi alglerden elde edilen lektin bileşiğinin vibrio bakteri türlerine ve balık patojenlerine karşı güçlü inhibisyon gösterdikleri ortaya konulmuştur (Liao *et al.*, 2003).

1.2.1.3. Alglerin antikanser aktiviteleri

Kontrolsüz hücre çoğalması, çevre dokulara yayılma ve diğer organ ve dokulara metastaz gibi komplike bir süreçten oluşan kanser dünyadaki ölümlerin başlıca nedenidir (Green ve Reed, 1998). Kanser genellikle eksternal (kimyasallar,

sigara, radyasyon ve enfekte ajanlar) veya internal faktörlerin (hormon, kalıtım, immün sistem ve mutasyonlar) tetiklemesiyle normal bir hücrede kromozomal DNA'nın mutasyonu ile sonuçlanır. Bunun sonucu olarak hücre homeostasisini sağlayan hücre sağ kalım ve apoptozis arasındaki denge bozulur ve kontrol edilemez hücre çoğalmaları başlar (Boopathy ve Kathiresan, 2010).

Programlı hücre ölümü (apoptozis) çok hücreli organizmaların sağ kalım süreci için kritik öneme sahiptir. Apoptozis hücre büzülmesi, membran kalınlaşması, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi farklı morfolojik özelliklere sahip enerji bağımlı biyokimyasal bir mekanizmadır. Doğal savunma mekanizmasındaki defektler anormal hücre çoğalması ve genetik kusurların birikimini teşvik ederek tümörigenez ile sonuçlanmaktadır (Kaufmann ve Hengartner, 2001). Apoptozis ekstrinsik (ölüm reseptörleri), intrinsik (mitokondriyal) yollar ve kaspaz aileleri aracılığıyla süreci gerçekleştirmektedir. Kaspazlar, inflamatuvar kaspazlar (kaspaz -1, -4, -5, -12) ve apoptotik kaspazlar (başlatıcı kaspazlar: -2, -8, -9 ve -10 ve uygulama kaspazları: -3, -6 ve -7) olarak sınıflandırılmaktadır. Kaspazlar-3, -8 ve -9, apoptoz sinyal yollarının kontrolünde hayati bir role sahiptir. Kaspaz ailesi inaktif proenzimler (zimojenler) olarak sentezlenir ve proteolitik bölünme ile aktive edilmektedir (Boatright ve Salvesen, 2003). Ekstrinsik yolak Fas ve TNFR-1 gibi ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla başlayıp, FADD ve CRADD gibi adaptör proteinler aracılığıyla sırasıyla başlatıcı kaspaz 8 ve efektör kaspaz 3 ve 7'nin uyarılmasıyla tamamlanan sinyal kompleks sürecidir (Locksley et al., 2001). Aynı zamanda uyarılan başlatıcı kaspaz 8, Bid proteiniyle etkileşerek tBid proteinine yararılır ve intrinsik yolda anahtar rol oynayan Bcl-2 apoptotik proteinlerini uyarır. Bcl-2 protein ailesi, anti-apoptotic [BAG1, BCL2, BCL2L1 (BCLxL), BCL2L2 (Bcl-W), BCL2L10 (BCLB) MCL1] ve pro-apoptotic [BAX, BAK1, BOK, BCL-XS, BİM (BCL2L11), BAD, BID, BIK, BCL-RAMBO (BCL2L13), PUMA, NOXA, ve HRK] üyelerden oluşur. Bid tarafından uyarılan proapoptotik BAX'ın mitokondride birikimiyle sitokrom c sitosole salınır. Daha sonra sitokrom c, APAF1 ve kaspaz 9 birleşerek oluşturduğu apoptozom kompleksiyle kaspaz 3 uyararak apoptozisi başlatır (Kuwana and Newmeyer, 2003). Hücre çoğalması veya apoptozisin aktivasyonundaki anormaller veya defektler kanser tedavisinde etkili bir rol oynamaktadır.

Uzun yıllardır kanserin farklı tiplerine uygulanacak kemoterapi, radyoterapi, cerrahi operasyonlar ve sentetik ilaçlar gibi pek çok yöntem geliştirilmiştir. Fakat bu uygulamaların bazıları minimal fayda sağlarken, pek çok yan etkiyede yol açmaktadır. Bu amaçla, son zamanlarda doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler kanserin herhangi bir aşamasına katkıda bulunmak için yoğun olarak çalışılmaktadır. Denizel canlıların sahip olduğu kimyasal ve biyolojik çeşitlilik yeni antikanser ilaçların keşfi için olağanüstü fırsatlar sunmaktadır.

Denizel organizmalar arasında önemli bir yere sahip olan algler, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin yanısıra besin olarak tüketilmesi ve Asya ülkelerinde geleneksel olarak kullanılmasından dolayı potansiyel antikanser özellikleri yoğun olarak çalışılmıştır. Alglerden elde edilen biyoaktif bileşikler ya apoptotik yolağı uyararak kanser hücrelerini inhibe ederek yada sinyal enzimlerinin proteinkinaz-c üyelerinin aktivasyonu aracılığıyla hücre sinyallerini etkilemektedir (Harada et al., 1997).

Hücre kültür teknikleri (*in vitro*), başta kanser olmak üzere bazı insan hastalıklarının patogenezini anlamada ve uygulanacak kimyasal bileşiklerin sitotoksitesini değerlendirmede *in vivo* deneylerin vazgeçilmez bir parçası olmuştur (Ekwal, 1980). Bu amaçla alg biyoaktif bileşiklerin antikanser özelliklerini ortaya koymak için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar eş zamanlı pek çok çalışılma yürütülmüştür.

Abirami ve Kowsalya (2012) Swiss albino farelere transplante edilen Dalton's askitik lenfoma (DAL) hücrelerine *Ulva fasciata*'nın etkilerini inceledikleri çalışmada, alg ekstresinin kanser hücre sayılarında önemli bir azalmaya ve farelerin yaşam süresinde artışlara neden olmasının yanısıra kanserli hayvanlarda önemli biyokimyasal ve hematolojik değişimleri de rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, *Avrinvillea nigricans*'dan elde edilen nigrikanoidlerin MCF-7 (insan göğüs kanseri) hücre hatlarında antimitotik aktiviteye sahip olduğu (Williams et al., 2007), *Cymopolia barbata* ve *Neomeris annulata*'dan elde edilen simobarbatolün antimitotik aktivelere gösterdiği ortaya konulmuştur (Gerwick, 1981).

Ulusal Kanser Enstitüsü (ABD) tarafından *Portieria hornemannii* kırmızı alg türünden elde edilen pentahalogenli monoterpen bileşiğinin bazı insan tümör hücre hatları üzerine etkisi incelenmiş, renal, beyin ve kolon tümör hücre hatlarına karşı yüksek düzeyde sitotoksik etkili iken, melanoma ve lösemi hücre hatlarında daha az etkili bulunmuştur (Fuller et al., 1992). Siklik ve linear peptid ailesinden olan kahalalid *Bryopsis* sp. türlerinden elde edilmektedir. Bu bileşiğin, klinik olarak faz II aşamasında göğüs ve prostat tümör hücrelerinde hücre ölümüne neden olan lizozomların membran yıkımına sebep oldukları ortaya konulmuştur (Martín-Algarra et al., 2009).

Başka bir çalışmada, *Cymodocea nodosa*'dan elde edilen diarilheptanoidler akciğer kanseri NSCLC-N6 hücre hatları üzerine sitotoksik etkiliyken (Konitza et al., 2006), *Caulerpa* sp. türlerinden elde edilen kaulerpenin antikanser, antitümör ve antiproliferatik özellikler sergilemiştir (Fischel et al., 1995). Yeşil alg *Enteromorpha prolifera*'nın feofitin, klorofil a ve b bileşiklerinin farede cilt kanserini uyaran kimyallara karşı baskılayıcı bir potansiyeli olduğu ortaya konulmuştur (Okai et al., 1997).

Yenilebilen alg türlerinin gıda takviyesi olarak kullanımı göz önünde bulundurulduğunda immün sistemi destekleme ve kanserin tedavisinde de kullanımda kaynak olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Özellikle *Laminaria* (kahverengi) sp. türünün popüler şekilde gıda olarak tüketildiği ve Asya ülkelerinde kanser tedavisinde geleneksel olarak kullanımının mevcut olduğu bilinmektedir (Yubin and Guangmei, 1998). Bu konuyla ilgili yürütülen bir çalışmada, *Laminaria japonica* ve *Undaria pinnatifida*'dan izole edilen sülfat polisakkaritlerin insan göğüs kanser (T-47D) ve melanoma SK-MEL-28 hücre hatlarına karşı antitümöral aktivite gösterdiği bulunmuştur (Vishchuk et al., 2011). Bununla birlikte, *Halimeda stuposa* ve *Dictyota* sp., türlerinden izole edilen farklı bileşiklerin insan ve memeli hücre hatlarına karşı sitotoksik etkinlik gösterdiği ifade edilmiştir (Simon et al., 2012).

Özellikle kahverengi alglerden elde edilen fukoidanın dönüşüm, farklılaşma ve hücre proliferasyonunda önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. Fukoidanın etkilerini gösteren başka bir *in vitro* çalışmada, *Laminaria guryanovae* fukoidan bileşiği JB6 C141 hücrelerinde epidermal growth faktörün (EGFR)

fosforilasyonu ile inhibasyon aktivitesi sergilediği görülmüştür (Lee et al., 2008). Benzer olarak, *Ascophyllum nodosum*' dan izole edilen fukoidanın kolon adenokarsinoma hücrelerinin yayılımını inhibe ettiğini ve ekstrasellular matrikste bu hücrelerin dağılımını bloke etmek suretiyle insan göğüs kanser hücrelerinin inhibisyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Haroun-Bouhedja et al., 2002). *Cladosiphon okamuranus* fukoidan bileşiklerinin ise kaspaz-3 ve -7 bağımlı yolaklar üzerinden U937 hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Teruya et al., 2007).

Kahverengi alg türü *Ecklonia cava*'dan izole edilen dioksinohidroekolün insan göğüs hücrelerinde (MCF-7), Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) yolu üzerinden apoptozisi uyararak antiproliferatif özellikler sergilediği rapor edilmiştir (Kong et al., 2009). Yang et al., (2010) *Laminaria japonica*'dan izole edilen florotannin bileşiğinin fare lösemi hücre hattı (P388) ve hepatosellüler karsinoma hücre hattında (BEL-7402) antiproliferatif aktiviteler gösterdiğini ifade etmişlerdir. Bu bileşikler dışında, *Stipodium zonales*'den türevlenen aromatik yağların karaciğer ve kolon kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkili olduğu belirtilmiştir (Dorta et al., 2002).

Laurencia microcladia kırmızı alginden elde edilen sesquiterpen elatol bileşiği, özellikle hücreleri G₁ fazında tutarak sitotoksik etki sergilemektedir. Aynı zamanda, western blot analizlerine göre, elatol siklin-D1, siklin-E, siklin-bağımlı kinaz ve cdk 4 ekspresyonunu azaltır. Bcl-x1'de bir azalma ve BAK, kaspaz -9 ve p53 ekspresyonunda bir artış gözlemlenmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise elatol C57B16 farelerde tümör büyümesini önemli düzeyde azaltmıştır (Campos et al., 2012). Bununla birlikte, *Corallina pilulifera* HeLa'ya, *Enteromorpha* ve *Gracilaria* metanol, kloroform ve etanol ekstraktları HCT15 hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivite göstermiştir (Hyun et al., 2007; Murugan and Iyer, 2012). Alglerden izole edilen diğer önemli bir bileşik grubu olan yağ asitlerinin geniş bir anlamda kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkili olduğu rapor edilmiştir (Jiang et al., 2008).

Capsosiphon fluvescens'den izole edilen polisakkaritlerin gastrik hücre hatlarında kaspaz3 ekspresyonunu arttırıp, Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak apoptozisi uyardığı ve dolayısıyla polisakkaritlerin ve PI3K/AKT aktivasyonu

ve IGF-IR fosforilasyon düzeylerini azalttığı rapor edilmiştir (Kwon and Nam, 2007). Poliskkaritlerce zengin olan kırmızı alg *Laurencia* sp. türlerinden elde edilen bileşiklerin HeLa hücrelerine ($IC_{50} = 15.5 \mu M$) ve göğüs kanser hücre hatlarına ($IC_{50} < 15.5 \mu M$) karşı sitotoksik etkili olduğu ortaya konulmuştur (Sun et al., 2007; Zubia et al., 2009). *Turbinaria conoides*'in elde edilen oksijenli fukostreol bileşiğinin A-549 (insan akciğer adenokarsinoma) ve HT-29 (inan kolon adenokarsinoma) hücre hatlarında çok düşük dozlarda bile etkili olduğu ($ED_{50} = \sim 0,4-5,9 \mu g/ml$) belirtilmiştir (Sheu et al., 1999).

Kahverengi alg *Cystoseira crinita*'dan izole edilen çeşitli aktif bileşiklerin HM02 gastrik adenokarsinoma, HepG2 hepatosellular karsinoma ve MCF7 göğüs adenokarsinoma ($IC_{50} < 2 \mu g/ml$) hücre hatlarına karşı etkili olduğu ifade edilmiştir (Fisch et al. 2003).

1.2.1.4. Alglerin anjiyo/anti-anjiyogenik aktiviteleri

Anjiogenezis kelimesi, ilk olarak Hertig tarafından 1935 yılında adlandırılmış olup, mekanizması Folkman tarafından ortaya konulmuştur. Anjiyogenezis, var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşması olup, embriyonik gelişme, yara iyileşmesi, inflamasyon, tümör gelişimi ve metastaz gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır. Hedef endotel hücresi içinde göç ve yapışma sinyalleri içerir (Folkman, 1995; Thamilarashi et al., 2014).

Tüm damarların en iç astarını oluşturan endotel hücreleri nispeten durgun hücrelerdir. Vasküler endotel için ortalama devir süresi genellikle yıllarla ölçülür. Bununla birlikte, endotel hücreleri fizyolojik veya patolojik uyarılara maruz bırakıldıklarında, bazı kemik iliği hücre popülasyonunun büyüme hızına yaklaşarak hücre döngüsüne hızlı girerler ve bazı tümör hücreleri çoğalma kapasitesini aşabilir. Fakat bu süreç hem geçici hemde zaman ve mekan açısından kesinlikle kısıtlıdır. Bu durum, özellikle iyileşme dokusunun metabolik taleplerinin artmasıyla ortaya çıkan ve granülasyon dokusu içeren zengin kan damar ağlarından oluşan kutanöz yaralar için doğrudur. Bu işlemin daha kolay anlaşılması için, anjiyogenezi koordine eden hücresel ve moleküler işlemler çeşitli sınıflandırmalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. İlk olarak, bu işlemin hem

anjijojenez (mevcut kan damarlarından kılcal damar oluşumu) hem de vaskülogenez (kemik iliği kaynaklı endotel kök hücrelerin harekete geçirilmesi) yoluyla gerçekleştiğine dair artan kanıtlar vardır. İkincisi, bu işlem son derece kompleks olup endotel hücreleri, çözünebilir anjiyojenik büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matrix molekülleri arasında dinamik, zamansal ve uzamsal olarak düzenlenmiş bir etkileşim gerektirir. Üçüncüsü, yetişkinlikte damar büyümesinin diğer fizyolojik (dişi üreme sistemi) veya patolojik koşullarının (karsinogenesis) aksine, doğal immün cevabın aktifleştirilmesiyle anjiyogeneze yol açar (Sabine et al., 2007; Gurtner et al., 2008).

Anjiyogenez yetişkin organizmalarda görülürken, aşırı anjiyogenez, kanser, diyabetik körlük, romatizmal artrit ve sedef hastalığı, yetersiz anjiyogenez ise koroner arter hastalığı, inme ve geciken yara iyileşmeleri gibi pek çok hastalıkla ilgilidir. Son yıllarda, anjiyogenez için VEGF (vasküler endoteriyal büyüme faktörü) protein ailesi gibi önemli arabulucuların tanımlanmasının yanısıra *in vivo* ve *in vitro*'da pek çok modelleme yapılmıştır.

Anjiyogenezis yara iyileşiminde anahtar rol oynamaktadır. Yaralı doku, hasarlı bölgeyi onarmak için karmaşık ve yapılandırılmış bir dizi olay başlatır. Bu olaylar, anjiyojenik faktörlerin vaskülarizasyonunun artması, hücre proliferasyonunda ve hücre dışı matris birikiminde bir artış ve nekrotik dokuyu yok etme sürecinin bir parçası olarak inflamatuvar immün hücrelerin infiltrasyonunu içerebilir. Yara alanına doğru hücre göçü yara iyileşme sürecinin önemli safhasıdır (Tannock and Hayashi, 1972).

In vitro yara iyileştirme testleri, araştırmacılar tarafından hücre kutuplaşması, doku matrisinin yeniden modellenmesi veya hücre çoğalması, farklı hücrelerin ve kültür koşullarının göç oranlarının hesaplanması gibi farklı yollarla yıllardır çalışılmaktadır. Yara iyileştirme testleri, çoğu hücre biyolojisi laboratuvarında kolaylıkla temin edilebilen araçlar ile endotel hücre göçünün gerçekleştirilebileceği nispeten ucuz ve basit bir yöntemdir (Cynthia, 2008). Bununla birlikte, anjiyogenezi etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi aşamasında etkileri direk gözlemleyebilmek ve *in vitro* çalışma sonuçlarını doğrulayıcı olarak canlı dokular üzerinde *in vivo* denemelerin yapılması mevcut şüphelerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olacaktır. *In vivo* testler çoğunlukla gerçekleştirilmesi ve

kantifikasyonu daha zor ve zaman alıcı olmasına rağmen gerçekleştirilmesi kolay olan ve daha iyi kantifikasyona izin veren *in vivo* test sistemleride mevcuttur. Cıvıv korioallantoik membran (CAM) yöntemi, *in vivo* olarak anti-anjiyogenezi incelemek için erişilebilir bir sistem sunmaktadır. Döllenen yumurta yaşayan bir sistem olduğundan, basit olmasına rağmen, bu model daha önce tarif edilen *in vitro* sistemlere kıyasla hücreler, patojenler ve eczacılık reaktiflerin *in vivo* analizleri için daha fizyolojik bir sistem sağlar. CAM, embriyo dışında kolaylıkla erişilebilir ve karmaşık biyolojik sistemleri incelemek için teknik olarak basit bir yol sağlar (Staton et al., 2009).

Anti-anjiyojenik ajanlar (VEGF) patolojik anjiyogenez inhibisyonunda etkili olmasına rağmen, birçok hastada kullanımını engelleyen ciddi yan etkilere sahiptir ve bu nedenle bu hastalar anti-anjiyojenik tedavinin optimum ve olumlu etkilerinden mahrum kalmaktadır. Buna göre, günümüzde kullanılan anti-anjiyojenik ilaçların maliyeti yüksek ve ciddi toksisiteyi alternatif stratejiler aramaya yöneltmiştir. Araştırmacılar, yüzyıllar boyunca birçok hastalığın tedavisi için dünyanın farklı yerlerinde kullanılan başta algler olmak üzere bitki ürünlerinden doğal olarak oluşan etkili, düşük veya az miktarda toksisiteye sahip anti-anjiyojenik moleküller üzerinde yoğunlaşmışlardır (Lu et al., 2016).

Alglerin anti-anjiyojenik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, *Stoechospermum marginatum* ekstraktları *in vitro*'da HUVEC hücrelerine, *in vivo*'da koryoallantoik membran (CAM) denemelerine karşı anjiyogenezi inhibe ettikleri ortaya konulmuştur (Vinayak et al., 2014). Benzer olarak, kontrol grubuna göre *Sargassum muticum* metanol ekstresinin uygulandığı CAM grubunda damar sayısında ve uzunluğunda önemli bir azalmaya yol açarak antianjiyojenik özellik gösterdiği belirtilmiştir (Namvar et al., 2013).

Stinophillum sargassum'dan türevlenen Sargassum A'nın heparin bağlayıcı anjiyojenik büyüme faktörlerinin aktivitesi üzerinden antikanser ve anti-anjiyojenik özellikler gösterdiği ortaya konulmuştur (Dias et al., 2005). Bununla birlikte, yeşil alg türevli sifonaksantin *ex vivo* ve hücre kültür sistemlerinde anjiyogenezi inhibe ettiği belirtilmiştir (Ganesan et al., 2010).

Yu et al., (2011) *in vivo* CAM denemelerinde *Grateloupia filicina* türevli GFP08 bileşiğinin, MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini etkilemeksizin TF (tissue factor) proteinin ekspresyonunu azaltarak yeni damar oluşumunu engellediğini ileri sürmüşlerdir. Antianjiyogenik etkinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, *Codium cylindricum*'dan izole edilen sülfat galaktan molekülleri, *in vitro* HUVEC'te ve *ex vivo*'da serumsuz matriks kültür modellerinde küçük damar oluşumlarını inhibe ederek antianjiyogenik aktivite göstermişlerdir (Matsubara et al., 2003).

Alglerin önemli bir bileşiği olan alginatın, *in vivo* hayvan yara iyileştirme modelleri üzerinde çeşitli anjiyogenik faktörleri (VEGF, fibronektin ve kollajen) uyararak yara iyileştirme sürecini etkilediği ortaya konulmuştur (Lee et al., 2009). Bir başka hayvan modeli üzerinde, *Padina* sp. türlerinden izole edilen sülfat polisakkaritlerin epidermal rejenerasyon ve kollajen oluşumunu teşvik ederek yaranın iyileşme sürecini etkilediği tespit edilmiştir (Kordjazi et al., 2013).

Kahverengi alg türlerinde yoğun olarak bulunan fukoidan bileşiği anjiyogenik aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla yoğun olarak çalışılan sekonder metabolitlerin başında gelmektedir. Bu amaçla yürütülen bir çalışmada, *Undaria pinnatifida*'dan türetilen fukoidanın, VEGF-A anjiyogenez faktörünün ifadesini ve damar büyümesini azaltarak hücre göçünü sınırladığı tespit edilmiştir (Liu et al., 2012). Matou et al., (2002) fukoidanın, anjiyogenez sürecinde yüzey reseptör proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyen FGF-2 uyararak damar oluşumunu teşvik ettiğini ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde, düşük molekül ağırlıklı fukoidan bileşiğinin, VEGF aktivasyonu üzerinden terapötik damar oluşumunun uyarılmasına yardımcı olduğunu destekleyen çalışmalarda mevcuttur (Lake et al., 2006). Kahverengi alglerden elde edilen diğer bir bileşik fukoksantin bileşiğinin ise migrasyon üzerinde etki göstermediği fakat göbek bağı endotel hücrelerinin oluşumunu sınırlayarak anti-anjiyogenik özellik sergilediği rapor edilmiştir (Sugawara et al., 2006).

1.2.1.5. Alglerin antimutajenik etkileri

Bütün canlı organizmaların genomları hem spontan DNA hasarı gibi endojen hemde ekzojen süreçler tarafından sürekli hasara maruz kalırlar. Bu hasar

organizmanın yaşlanması ve ilişkili pek çok hastalıktan sorumludur. DNA'da meydana gelen bozulmalar hücrel fonksiyonların yanısıra replikasyon, rekombinasyon ve transkripsiyonun dahil olduğu pek çok olaya karışmaktadır. Mutasyonlar, mutajen olarak adlandırılan fiziksel ve kimyasal ajanlar gibi eksternal faktörler tarafından canlı organizmaların genetik materyalinde kalıcı değişikliğe neden olabilecek oluşumlardır ve bu oluşumların neden olduğu değişimler ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır. Kimyasal mutajenler farklı mekanizmalarla mutasyonlara neden olduklarından, alkilleyici ajanlar, baz analogları ve interkalasyon ajanları gibi birkaç ana sınıfı ayırt edilebilir (Thumvijit et al., 2013; Słoczyńska et al., 2014)

Mutasyonlar tek bir geni, bir gen bloğunu veya tüm kromozomu etkileyebilmektedir. Nokta (gen) mutasyonları bir gen içerisinde yalnızca bir veya birkaç nükleotidi etkiler. DNA sekansında en yaygın değişim çeşidi olan nokta mutasyonlar bir baz çiftinin yer değiştirmesi (bir baz çiftinin bir diğeriyle değiştirilmesi); delesyon (bir veya daha fazla baz çiftinin kaybı) ve insersiyon (DNA dizisine ekstra baz çiftlerinin ilavesi) şeklinde meydana gelmektedir (Migliore ve Coppedè et al., 2002; Cooke et al., 2003)

Mutajen aktivitesinin altında yatan mekanizmanın, biyolojik sistemlerde normal metabolik yollar veya kimyasal kanserojenlerin maruziyetinin bir sonucu olarak ortaya çıkan ROS üretimiyle meydana geldiği ileri sürülmüştür. Bu bileşikler protein, karbonhidrat, lipit ve DNA gibi hücrel bileşenlere zarar vererek kanser gibi pekçok hastalığa neden olmaktadır (McBride et al., 1991). Bu mekanizmaya karşı koymadaki başarı mutajeneziste ve karsinogeneziste önemli rol oynamaktadır. Pekçok mutajenik madde, doğrudan genetik materyali etkileyerek yapısal hasara neden olan direkt etkili mutajenler olarak bilinirken (Sodyum azid (NaN_3), benzo [a] piren (BP) gibi bazı bileşikler de doğrudan doğruya farklı kimyasalların sentezinin indüksiyonu yoluyla indirekt bir şekilde (dolaylı olarak etkili mutajenler) DNA üzerinde etkili olurlar. Bu işlem sırasında, promutajenin gerçek mutajenata dönüşümü gerçekleşmektedir (Turhan et al., 2012).

Antimutajenler etki mekanizmasına göre çeşitli sınıflara göre gruplandırılmaktadır. Bir mutajenle direk kimyasal etkileşime girme (sistein), dış

membran transporterlerine bağlanarak mutajenleri bloke etme (gallik asit), antioksidan potansiyel özellik gösterme (lipoik asit), mutajenin sitokrom-P450 metabolizması aracılığıyla etkileşime girme (fenolikler), promutajenin metabolik aktivasyonunu inhibe etme (çeşitli bitkisel sekonder metabolitler) şeklinde etki gösterebilmektedirler (De Flora et al., 1998). Diyet yoluyla mutajeniteye karşı korunma en popüler yöntem olarak bilinmektedir. Zengin sekonder metabolite sahip bitkisel kaynaklı bileşiklerin doğal olması ve yan etkilerinin nispeten az olmasıyla potansiyel birer antimutajenik madde olarak kullanılması pek çok deneysel çalışmayla ortaya konulmuştur.

Terapoik amaçlı kullanılacak bir bileşiğin antimutajenik aktivite potansiyeli *in vivo* ve *in vitro* gibi çeşitli evrelerde bir takım deneysel çalışmalar ile belirlenebilmektedir. Genellikle mutajenite değerlendirmesi üç aşamaya ayrılabilir. Evre 1, bakteri kültürleri ve memeli hücreleri ile yapılan *in vitro* testlere dayanmaktadır; Evre 2, *in vivo* mutajenik aktivitenin, somatik hücrelerde değerlendirilmesini içerir; Evre 3, *in vivo* somatik hücrelerde mutajenik potansiyel için pozitif sonuç veren bileşiklerin, germ hücrelerinde ileri testlerinin yapılmasını içermektedir (Eastmond et al., 2009). Genellikle antimutajenite testlerinde, test edilen hücreler hem test bileşiği hem de standart bir mutajen ile eş zamanlı olarak uygulanmaktadır. Bileşiklerin antimutajenik etkilerinin ilk değerlendirilmesinde kısa süreli temel bakteriyel testler kullanılır. Bu denemeler, nispeten düşük maliyetli, hassas ve farklı deneysel ayarlara esneklik sağlayabilen birçok avantaja sahiptir (De Flora et al., 1992).

Çevresel strese cevapta algler tarafından oluşturulan fitokimyasalların antimutajenik özellikleri, diğer birçok dejeneratif hastalıkta kullanıldığı kadar yoğun olarak çalışılmasa da etkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı alg türlerinden izole edilen fotosentetik pigmentler kimyasal koruma sağlayan maddeler olarak tanımlanmıştır (Pangestuti and Kim, 2011).

Yenilebilir kırmızı deniz algi *Porphyra tenera* metanol ve aseton ekstraktları ile izole edilen b-karoten, klorofil a ve lutein bileşiklerinin *S. typhimurium* TA1535/ PSK 1002 suşlarında mutajen uyaran umu C geni ekspresyonuna karşı kimyasal koruma sağlayan bileşikler olarak ortaya konulmuştur (Okai et al., 1996). Benzer bir çalışmada, *Chlorococcum humicola* metanolik ekstraktlarından

elde edilen karotenoidlerin (astaksantin, lutein ve b-karoten) *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA 102 üzerinde yüksek antimutagenik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Bhagavathy et al., 2011).

Farklı alg türlerinin antimutajenik etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına karşı *Caulerpa sertularioides* ve *Spyridia filamentosa* yüksek antimutajenik aktivite sergilediği tespit edilmiştir (Osuna-Ruiz et al., 2016). Bunların dışında kırmızı ve kahverengi alglerin halojenli aktif bileşiklerinden cymobarbatol ve 4-izosimobarbatolün antimutagen etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Wall et al., 1989). Güner et al., (2015) kahverengi alg *Cystoseira compressa*'nın metanol, hekzan ve kloroform ekstralarının S9'lu ve S9'suz ortamda TA98 ve TA100 suşlarına karşı mutajenik aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir. Yeşil alg *Spirogyra neglecta*'nın *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerine etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, bu alg türünün indirekt etki göstererek koruma sağladığı ortaya konulmuştur (Thumvijit et al., 2013).

1.2.1.6. Alglerin in vivo protektif potansiyeli

Son yıllarda genetik hastalıkların ve kanser vakalarının sayısında önemli bir artış görülmektedir. Her ne kadar bu artışın nedeni spontan mutasyonlar olarak düşünülse de, sürekli maruz kaldığımız eksojen kaynaklı fiziksel ve kimyasal ajanların etkilerinin de önemsenmeyecek derecede olduğu kanıtlanmıştır. Bu ajanlar nokta mutasyonları, delesyon, insersiyon, sınırlı DNA sekansı değişikliklerini, kromozomal düzenlemeler ve anöploidi gibi kromozomal değişiklikleri gibi genomik istikrarsızlıklara yol açmaktadır (Wang, 2001). Günümüze kadar hem bu sürece müdahale ederek olumsuz etkileri en aza indirmeyi amaçlayan ajanlar hemde bu etkileri takip edebilmek için test yöntemleri geliştirilmiştir. Bu ajanlar tümörün inhibisyonu, detoksifikasyon enzimlerinin indüklemeye, ROS radikallerini yoketme yada ortadan kaldırma, DNA hasarını önlemek için hücresel bağışıklığı güçlendirilme, DNA onarımını arttırma, hücre kontrol noktası kontrol etme ve apoptozun sinyal transdüksiyon yollarını etkileme gibi çok sayıda farklı mekanizma ile bu etkileri yok etmeye çalışır (de Kok et al., 2008; Ramos et al., 2011).

Genotoksinlerin ve kanserojenlerin zararlı etkilerini en aza indirmek için etkili bir strateji olarak sentetik veya doğal kaynaklı pek çok ilaç geliştirilmiştir. Sentetik ilaçlar etkili olarak kullanılmalarına rağmen yol açtıkları yan etkilerle başka arayışlara yol açmıştır. Algler yaşadıkları doğa gereği pek çok uyarana maruz kalmakta ve bunun sonucu olarak savunma amaçlı bir takım sekonder metabolitler salgılamaktadır. Günümüze kadar alglerden elde edilen düşük yan etkili ve yüksek antioksidan kapasiteli sekonder metabolitlerin başta kanser olmak üzere pek çok hastalığa karşı protektif etkileri *in vivo* ve *in vitro* testler ile ortaya olmuştur.

Bu testler, farklı mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Genetik hasarı önleyici (anti-genotoksik) yada protektif etkili maddelerin güvenilirliğini ortaya koymak için en yaygın olarak kullanılan standart Comet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testleridir (Zeiger, 2004).

Alglerden izole edilen renk pigmentleri, polisakkaritler ve yağlar protektif etkileri ortaya konulan bileşiklerdendir. Bu konuyla ilişkili comet, KA ve MN testleriyle yürütülen *in vivo* bir çalışmada, sülfat polisakkaritlerce zengin kahverengi alg *Sargassum dentifolium*'un siklofosfamid ile uyarılan genotoksik etkilere karşı protektif etki gösterdiği ve kanserin önlenmesinde besin takviyesi olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Gamal-Eldeen et al., 2013). Başka bir çalışmada, *Spirulina* sp. alg türlerinin fare ve sıçanlar üzerinde cisplatin ile oluşturulan genotoksik etkilere karşı, MN frekansında önemli azalmalara yol açarak etkili bir antigenotoksik ajan olduğu ortaya konulmuştur (Premkumar et al., 2004; Linjawi, 2011). Tingxin et al., (2009) benzer olarak yürüttükleri çalışmada, farelerde siklofosfamid ile oluşturulan genotoksisiteye karşı *Laminaria japonica* polisakkaritlerinin MN frekansında önemli azalmalara yol açtığını rapor etmişlerdir.

Ulva rigida ekstrelerinin *in vitro*'da muhtemel antigenotoksik ve protektif etkilerini belirlemek için yürütülen çalışmada, insan lenfosit kültürlerinde kemoterapötik madde mitomisin-C ile uyarılan etkilere karşı alg örneğinin KKD ve MN frekansı ile KA sayısında önemli azalmalara yol açtığı tespit edilmiştir

(Çelikler et al., 2008). İnsan lenfositlerinde doksorubisin kaynaklı DNA hasarına karşı kahverengi alg *Fucus vesiculosus* kullanarak protektif etkinliğinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, alg ekstralarının genotoksik olmadığını ve algin kültüre eklenmesiyle DNA hasarına karşı antigenotoksik aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Leite-Silva et al., 2007). İnsan lenfositlerinde yürütülen başka bir çalışmada, karoten pigmentlerince zengin *Chlorococcum humicola* alg türünün benzo(a)piren ile uyarılan genotoksositeye karşı KKD ve MN frekansından önemli azalmalara sebep olduğu belirlenmiştir (Bhagavathy ve Sumathi, 2012). Çelikler et al., (2009) yeşil alg *Codium tomentosum*'un etanol ekstralarının *in vitro* protektif etkilerini inceledikleri çalışmada, alg uygulanmış grubun mitomisin-c ile uyarılmış gruba oranla KA, KKD ve MN frekansında önemli azalmalara yol açtığını rapor etmişlerdir.

Sargassum micracanthum'un farklı alkol ekstralarının antioksidan kapasitesi ve protektif etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak incelendiği çalışmada, kontrol grubuna göre özellikle metanol elstresinin yüksek düzeyde antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve kimyasal ajanla uyarılan ratlarda protektif etki gösterdikleri ortaya konulmuştur (Mori et al., 2003). Alglerin *in vivo* comet testi kullanılarak protektif etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, balıklarda civa klorit (HgCl₂) ile uyarılan klostojenik etkilere karşı kırmızı alg *Kappaphycus alvarezii* ekstralarının antigenotoksik etkili olduğu vurgulanmıştır (Nagarani et al., 2012).

Yang et al., (2012,) yenilebilir kırmızı alg *Gracilaria tenuistipitata*'nın sulu ekstralarının H1299 hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan DNA zararlarının yüzdesini azaltarak kimyasal ajanın etkisini baskıladığını ifade etmişlerdir.

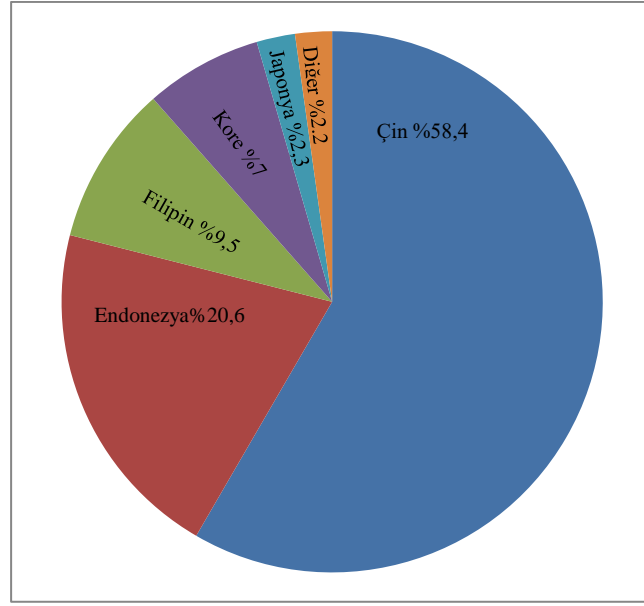
1.2.2. Alglerin ekonomik önemi

Deniz algleri zengin vitamin, karbonhidrat, lif, mineral ve protein içeriği yanısıra düşük kalorili PUFA içeriği bakımındanda geçmişten günümüze çok geniş bir alanda kullanıma sunulmuştur. Bu kullanıma dair ilk bilgilerin Çin imparatoru Shen Nong tarafından yazılan "Materia Medica" adlı eserden yola çıkarak M.Ö. 2700 yıllarına kadar dayanmakta olduğu anlaşılmaktadır (Sukatar,

2002). Algler fitokimyasal yapılarından dolayı genellikle gıda ve eczacılık alanında stabilizör veya jel olarak kullanılmasına rağmen alerji, kanser, diyabet, hipertansiyon, inflamasyon, obezite ve diğer dejeneratif hastalıklara karşı potansiyel bir ajan olarak pek çok alanda laboratuvar çalışmalarına konu olmuştur (Vassilev et al., 2010).

Denizel alglerin gıda olarak kullanımı Japonya'da 4. yüzyıla Çin'de ise 6. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Aynı zamanda özellikle Japonya, Çin ve Kore gibi Asya ülkelerinde zengin vitamin (A, B1, B12, C, D ve E), riboflavin, niasin ve minerallere (Ca, P, Na, K ve I) sahip yeşil, kahverengi ve kırmızı algler denizel kaynaklı tüketimin önemli büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu amaçla bu ülkelerin pek çoğunda ihtiyacı karşılamak üzere açık ve kapalı alg kültürasyon sistemleri geliştirilmiştir. Çin yaklaşık 5 milyon ıslak ton alg hasatı ile yenilebilir yosunların en büyük üreticisidir (Şekil 1.2). Bu miktarın büyük bir bölümünü kahverengi deniz yosunu *Laminaria japonica*'dan üretilen kombu oluşturmaktadır. Korede üç farklı türden yaklaşık 800.000 ıslak ton alg hasatı yapılmakta olup, bunun yaklaşık %50'sini kahverengi deniz yosunu *Undaria pinnatifida*'dan elde edilen "wakame" oluşturmaktadır. Japonyada ise yaklaşık 600.000 ton yaş alg üretimi yapılmakta olup bunun %75'ni kırmızı alg *Porphyra*'dan elde edilen "nori" oluşturmaktadır. Bu yüksek ekonomi değere sahip ürünler içerisinde 6900 ABD\$/kuru ton wakame ve 2800 ABD \$/kuru ton kombuyla karşılaştırıldığında nori yaklaşık 16000 ABD\$/kuru tonluk geliriyle zirvede yer almaktadır (McHug, 2003; Barsanti and Gualtieri, 2006).

İrlanda, İzlanda ve Kanada gibi Batı ülkelerinde alglerin farklı türleri geleneksel olarak tüketilmekte ve pazar gittikçe gelişmektedir. Fransa'da hükümet ve bazı ticari kuruluşlar restoran ve evlerde alglerin kullanımı için teşvikler oluşturmuştur. Bazı kıyı ülkelerinde ise sebze ve salatalarda taze deniz yosunu kullanılarak bir gelenek oluşturulmuştur. Bunların dışında Şili'de *Callophyllis variegata*, Hawai'de *Gracilaria*, Kuzey ülkelerinde *Alaria esculenta*, Avrupa'da yaygın olarak *Chondrus crispus* ve *Palmaria palmata* ve Filipinler'de *Caulerpa lentillifera* gıda olarak tüketilmektedir (McHug, 2003; FAO, 2016).



Şekil 1.2 FAO 2012 yılı raporunda en fazla alg üretimi yapan ülkeler (FAO, 2014)

Algler gıda olarak tüketilmesinin yanısıra, iyotça zengin olanlar tiroit tedavisinde, bağırsak bozukluklarında, hipokolesterolemik ve hipoglisemik ajanlar olarak, zengin mineraller ve vitamin sayesinde yetersiz beslenmede, agar, alginat ve karrajen gibi hidrokolloidler tıpta ve eczacılıkta pek çok alanda kullanıma sunulmuştur (El Gamal, 2012).

Alginatlar hem asit hem de tuz formunda mevcut olan kahverengi alg ailesinden elde edilen önemli bir biyopolimerdir. Tuz formu kuru alg kütlelerinin yaklaşık %40-47'ni oluşturmaktadır (Rasmussen and Morrissey, 2007). Özellikle *Saccharina* ve *Undaria* türlerinden elde edilen alginler olmak üzere gıda işlenmesi, kozmetik ve eczacılıkta kıvam ayarlamada kullanılmaktadır. Aynı zamanda antihipertansiyon etkilerinin yanısıra kolesterol düzeylerinin düşürülmesi, toksik kimyasal maddelere karşı önleme, sindirim ve mide membran yüzeyinde koruyuculuk gibi sağlık alanında önemli bir yardımcıdır (Murata and Nakazoe, 2001; Burtin, 2003). Bununla birlikte, alginik asit boya, cam, kağıt ve kozmetik sanayinde de önemli bir yer tutmaktadır. Karrajen, şeker ünitesine bağlı yarı ester sülfatlı lineer polisakarit zincirden oluşur. Suda çözülebilen yapısıyla geniş bir pH aralığında sabit bir yüksek viskozite gösterir. Bu polimer *Chondrus crispus*'un %71'ini and *Kappaphycus* sp. %88'ini oluşturmaktadır. Karrajen (E 407) konserve gıdalar, salata sosları, ekmek dolguları, dondurma, tatlılar ve konserve hayvan mamaları dahil pek çok gıda alanında kullanılmaktadır. Aynı

zamanda eskiye nazaran azda olsa bira ve şarap berraklaştırılması için içki sanayinde kullanılmaktadır (Vlieghe et al., 2002; Yan et al., 2004). İrlanda'da 1830'lu yıllardan beri tıbbi çay olarak bronşit, soğuk algınlığı ve öksürük tedavisinde kullanılmasının yanısıra antitümör, antikoagülant ve antiviral özelliklere sahip olduğuda ortaya konulmuştur. Karrajen aynı zamanda ilaç, losyon ve krem yapımında stabilizör ve süspansiyon ajanı olarak kullanılmaktadır (Morrissey et al., 2001). *Gelidium* sp. ve *Gracilaria* gibi kırmızı alglerden elde edilen agar; agaroz ve agaropektin karışımından oluşan polisakkaritlerdir. Agar-agar, Japonya'da tipik ve geleneksel gıda malzemesi olarak yemekte ve Japanesestyle şekerlemede kullanılır. Buna ek olarak, agar-agar tıbbi uygulamalarda kapsül üretimi ve hücre kültüründe medyum olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda hem kan glukoz konsantrasyonlarında azalamalara yol açar hem de antiagregasyon özelliği gösterir. Agaro-oligosakkaritlerin, nitrik oksit üretimi ile ilişkili bir enzim ve proenflamatuar sitokin üretimini baskıladığı gösterilmiştir (Enoki et al., 2003). Yukarıda saydığımız üç hidrokolloitten alginat 213 milyon US\$, agar 132 milyon US\$ ve karrajen 240 milyon US\$ yıllık hasılatı sahiptir.

Algler bunların dışında fukoidan, selüloz, laminarin, mannitol, vitamin ve mineral içeriği zengin olmasından dolayı da tercih edilmektedir. Kahverengi algler fukoidanca zengin olup, bu polisakkarit grubunun özellikle med cezir olaylarında suyun çekilmesi sırasında algleri dehidrasyondan korumak için hücre duvarı bileşenlerine katıldığı düşünülmektedir (Holdt and Stefan Kraan, 2010). Fukoidanlar bitkiden kaynaklanan ve virüs gibi enfeksiyöz ajanları içermesi olasılığı az olduğundan enjektabl antikoagülan heparine alternatif olarak önerilmiştir (Berteau and Mulloy, 2003). Aynı zamanda antiviral ve antioksidan özelliklerinden dolayı immün sistem desteklenmesinde önerilmektedir (Hayashi et al., 2008). Mannitol önemli bir şeker alkolü olup, özellikle *Laminaria* ve *Ecklonia* gibi kahverengi alglerde yoğun bulunmaktadır. ABD, İngiltere, Fransa ve Japonya üretiminin ana merkezleri olmak üzere mannitol plastik sektöründe, patlayıcı üretiminde, deri ve kağıt üretiminde ve boya endüstrisinde, sakız yapımında ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Özellikle diyabet hastaları için şeker içermeyen bileşik kaplamalar yapmak için, gıdalar, şekerleme ve çikolata aromalı bileşik kaplamaların içeriğinde kullanılmaktadır (Nabors, 2004). Algler genel

olarak B grup (B1, B2 ve B12) vitaminlerin önemli kaynaklarıdır. B grubunun diğer vitaminleri (niasin, B6, biotin, folat) düşük veya eser miktardadır. Belirli alg gruplarında karotenoid, provitaminA, Vit C ve Vit E bakımından oldukça zengindirler. Vitaminler hücre ve doku büyüme ve farklılaşma düzenleyicileri, hücre sinyalizasyon arabulucuları, antioksidan fonksiyon ve biyokimyasal hormonlar gibi pek çok kritik noktada görev alırlar. Bundan dolayı günlük vitamin gereksinimi karşılayacak besin tüketimi önemlidir. Genel olarak kırmızı (*Porphyra* veya *Palmaria*) ve yeşil alglerin çoğunluğu provitamin A, Vit B gruplarınca zengin iken, kahverengi alglerde Vit C içerikleri yüksek olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarla günlük 100 g alg tüketimi günlük vitamin gereksinimini fazlasıyla karşılamaktadır (Chapman, 1970). Örneğin *Undaria pinnatifida*'nın (1.16 mg) 8 gr'lık porsiyondaki Vit E miktarı yarfıstığından (0.8 mg) çok daha fazladır. Özellikle besin olarak tüketilen wakame ve kambuda B1 ve B2 vitaminleri yüksek miktarlarda bulunurken (0.3 ve 0.24 mg B1/100g), *Ascophyllum* ve *Fucus* kahverengi alg türlerinde E vitamini miktarı 200-600 mg tokoferol/kg⁻¹ (kuru ağırlık) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte yeşil ve kırmızı alglerde genellikle alfa tokoferol ihtiva ederken, kahverengi algler alfa, beta ve gama tokoferolleri tespit edilmiştir (Burtin, 2003). Aynı zamanda alglerin kuru ağırlığının yaklaşık %2'si çoğunluğu PUFA'dan oluşan lipitlerden oluşmaktadır. PUFA'larda hem insan diyetinde önemli olan omega-3 ve omega-6 yağ asitlerini ihtiva ederken hemde konserve sanayinde kullanılmaktadır (Sanchez-Machado et al., 2004).

Potasyum, kalsiyum ve magnezyum minerallerince zengin alglerin insan diyetinde kullanımının yanısıra, gübre olarak kullanımı 19. yya kadar yeterli ilgiyi görmemekteydi. İlk kullanımları kıyı kesiminde genellikle büyük kütleli esmer alglerin (*Ascophyllum*, *Ecklonia* ve *Fucus*) kazılan toprağa bırakılması şeklindeyken bu endüstrinin gelişimiyle konsantrasyon şeklinde sıvı alg ekstraları kullanıma sunulmuştur. Önceleri yaklaşık 1000 ton alg ekstresi eldesi için 10000 ton ıslak alg kullanılmaktayken son 20 yılda bu oran ürün verimliliğini geliştirmesi ve organik tarıma olan ilginin artmasıyla iki katına çıkmıştır (De Roeck-Holtzhauer, 1991).

Bunların kullanım alanlarının dışında özellikle Avrupa ülkelerinde çiftlik hayvanlarının beslenmesi, balık çiftliklerinde yem olarak kullanılmasının yanısıra

alglerden biyokütle enerji üretimi ve yakıt olarak kullanımı bu alana olan ilgiyi gittikçe arttırmaktadır (Pacheco-ruiz et al., 2004).

AMAÇ

Algler yaşadıkları ortam açısından ekstrem şartlarda hayatını sürdürebilme yeteneğine sahip canlı gruplarıdır. Bu özelliklerini ortama uyum ve savunma amaçlı salgıladıkları biyolojik olarak aktif metabolitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu amaçla günümüze kadar bu potansiyeli ortaya koymak için sayısız çalışma yapılmış ve alglerin organik asitler, karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, lipitler ve renk pigmentlerince zengin canlılar olduğu ortaya konulmuştur. Bu aktif bileşiklerin antikanser, antimikrobiyal, antimutajenik, antioksidan ve antigenotoksik olarak kullanılma potansiyeli bulunmakla birlikte, başta İzmir Körfezi olmak üzere, zengin çeşitliliği sahip ülkemizin kıyı algleri hem yeteri kadar ilgi görmemekte hem de aktiviteleri üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, İzmir Körfezinden (Urla) toplanan kahverengi (*Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau), yeşil (*Enteromorpha linza*) ve kırmızı (*Gacilaria gracilis*) alg türlerinden elde edilen hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının, insanlarda potansiyel bir ajan olarak kullanılması amacıyla *in vitro* ve deney hayvanları üzerinde *in vivo* araştırmalar yapılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Alg (Makroalg) Materyali

2.1.1. *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau'nın sınıflandırılması ve genel özellikleri

Şube *Ochrophyta*, Sınıf *Phaeophyceae*, Takım *Sphacelariales*

Aile *Stypocaulaceae*, Tür *Halopteris*

Halopteris “deniz tüyü” *scoparia* ise “süpürge veya çok dallı” anlamına gelmektedir. Tallusları ortak bir noktadan ayrılan pekçok daldan oluşan küçük ve yoğun çalı görünümündedirler. Pek çok üyesi 5 cm uzunluğunda ulaşırken bazen bireyler 15 cm boyutlarında bulunabilir. Her bir tüy genişliği 1 cm ve sürgünler genişliği bir milimetreden daha az bir mesafedir. Her dalın ucunda bir köşe apikal hücre bulunmasıyla dallar köşe şekilde büyüme gösterir ve diğer hücrelere nazaran daha büyük ve koyu renktedir (Şekil 2.1).

Halopteris scoparia (Linnaeus) Sauvageau klorofil a, c ve fukoksantin pigmenti taşıyan, denizel çok hücrelidir. Ayrıca yaprak, kök, gövde gibi oluşumlar taşımazlar. Hareketli hücreleri iki kamçı taşır. Bu tür, açık denize bakan kayaların üzerinde ve gelgit bölgesinde bolca bulunan, dik, çok yıllık, esnek ve yıl boyunca en bol bulunabilen alg türlerinden biridir (Sánchez-Moyano et al., 2000). Akdeniz ve Atlantik Okyanusu bölgelerinde yaygın olmakla birlikte bazen tek bir çalı bazen de büyük gruplar halinde bulunabilirler (Dr. Rachel Einav, 2016).



Şekil 2.1 *Halopteris scoparia* genel görünümü

2.1.2. *Enteromorpha linza* var. *lanceolata* (Linnaeus) J. Agardh sınıflandırması ve genel özellikleri

Şube *Chlorophyta*, Sınıf *Ulvophyceae*, Takım *Ulvales*, Aile *Ulvaceae*
Tür *Enteromorpha*

Enteromorpha linza var. *lanceolata* (Linnaeus) J. Agardh 30 cm uzunluğuna ulaşabilen yeşil alglerin büyük bir şerit benzeri türüdür. Tallusta dallanma görülmez ve fırfırlı bir imajı vardır. Tallusun genişliği ortada en fazla seviyede olup, yaklaşık 5cm genişliğinde ve parlak yeşil renklidir (Şekil 2.2).

Enteromorpha türleri yıllık olarak genelde yaz mevsiminde mevcut olup; sezon sonunda çürüyerek ağaran yaprakları ile büyük kitleler oluşturur. Bu alg grubu çabucak çoğalarak hızlıca büyümektedirler. Yaşam döngüsü birçok safhada gerçekleşmektedir. Gametofit safhasında mobil seks hücreleri veya gametler çok sayıda üetilmektedir ve su yeşil olduğunda daha fazla üretim meydana gelmekte gelgitler ile senkronize olarak serbest kalırlar. Bu alg türü kıyının her seviyesinde bulunabildiği gibi, nehir ağızlarında ve tuzlu alanlarda da yaşayabilirler (Fish and Fish., 1989; Budd and Pizzola., 2002).



Şekil 2.2 *Enteromorpha linza* genel görünümü

2.1.3. *Gracilaria gracilis* M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham sınıflandırması ve genel özellikleri

Şube *Rhodophyta*, Sınıf *Florideophyceae*, Takım *Gracilariales*
Aile *Gracilariaceae*, Tür *Gracilaria*

Gracilaria gracilis (Stackhouse) Steentoft, L.Irvine & Farnham vejetatif kısımları 30-50 cm uzunluğunda ve 1-3 mm genişliğinde dik, yuvarlak ya da basık gövdeli olup çatalsı ya da her yöne dallanma ile koyu kahverengi/kırmızı rengi ile karakterizedir. Çeşitli renklerde renk pigmentleri içermekle birlikte tallusunun rengi yazın soluk turuncudan kışın koyu kırmızıya dönüşebilir. Bu alg türü genellikle kayalar, çakıl, kum ve sığ sularda bulunmaktadır. Makroalg büyümesi genellikle yılın en az bir kısmında nitrojen durumu ile sınırlanmaktadır (Şekil 2.3).

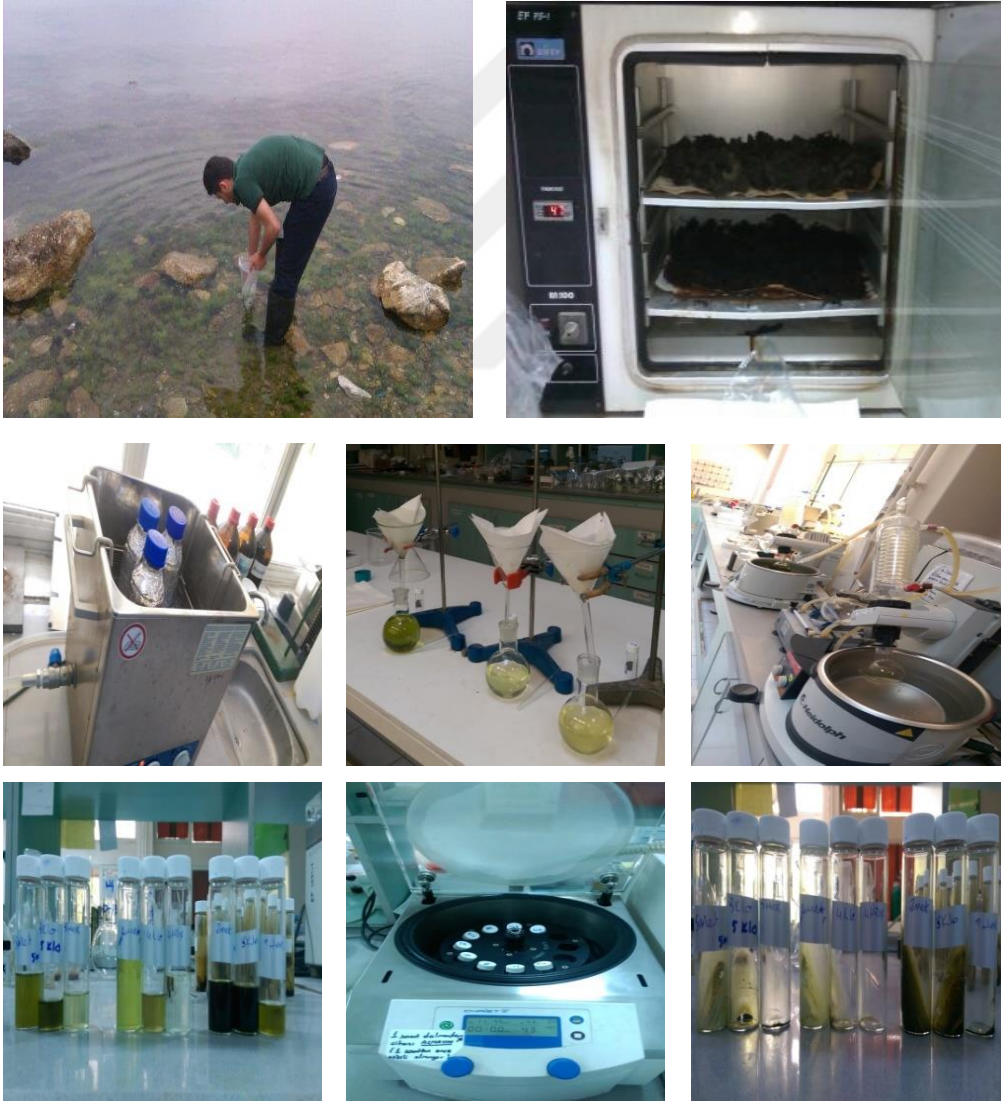
Gracilaria türleri kendi kapasitesi kadar azotu hızla assimile etme ve stokta tutma ile karakterizedir. Bu özellik onların azot eksikliğinde canlılığı sürdürmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda agar kaynağı olarak kullanılmasının yanısıra gıda olarak tüketilmektedir (NORSAS, 2016).



Şekil 2.3 *Gracilaria gracilis* genel görünümü

2.2. Alg Örneklerinin Temini

Nisan 2013' de İzmir (Urla) kıyı şeridi boyunca (1-2 m derinlik) birçok resiften toplanan kahverengi (*Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau), yeşil (*Enteromorpha linza* J.Agardh) ve kırmızı alg (*Gracillaria gracilis* M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham) türlerinin tanımlanması yapıldıktan sonra, fiş örnekleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Laboratuvarında depolanmıştır. Örneklerin herbarium referans numaralandırılması (Çizelge 2.1) yapıldıktan sonra alg örneklerinden tuz, epifit ve yüzeyindeki kumlardan uzaklaştırmak için saf su ile 3 kere yıkanmıştır. Daha sonra işleme tabii olana kadar -20°C'de buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 2.4 Alg ekstraktlarının toplanması ve ekstraksiyon aşamaları

2.3. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Alg örneklerinin ekstaksiyonu için kullanılan solvanlar Merck firmasından, muhtemel mutajenik potansiyelini belirlemek amacıyla Ames MPF Penta I kiti (Cat No: 10512, 10512S1P) Xenometrix firmasından, RNA izolasyon ve Apoptoz kitleri içeriğinde yer alan Tripure Isolation Reagent (Cat No: 11667157001), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat No: 04379012001), LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Cat No: 03003230001), RealTime ready Human Apoptosis Panel'i (Cat No: 05392063001) Roche'dan, Hücre migrasyon denemesi kiti Cellbiolabs Inc.'tan, DMSO (Cas No: 67685) ve Giemsa Boya (Cas No: 51811826) Sigma firmasından satın alınmıştır. Histolojik incelemeler sırasında kullanılan tripsin (Chemical Co.St.Lois, MO) Sigma'dan, Biotinylated secondary antibody ve streptavidin konjuge horse radish peroxidase (Cas No: 85-9043, San Francisco, CA) Zymed'dan satın alınmıştır.

Bununla birlikte *in vivo*'da alglerin protektif etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan kadmiyum klorit ($CdCl_2 \cdot 5.H_2O$)(CAS No: 7790-78-5) Sigma firmasından (St Louis, MO, USA) tedarik edilirken kan biyokimya parametreleri, comprehensive diagnostic profile (ABAXIS, USA) rötörleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.4. Deney Hayvanları

Alglerin *in vivo* protektif etkilerinin değerlendirilmesi, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Biriminde, Ege Üniversitesi, Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu' nun, 24.02.2012 tarih ve 2012 - 032 no'lu onayı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı San. ve Tic. A.Ş. firmasından temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş 8-10 haftalık, ağırlıkları 20-25 g arasında değişen $n= 30$ adet Swiss albino deney fareleri kullanılmıştır. Hayvanlar çalışmaya başlamadan 15 gün önce deney ortamına alınarak deneye hazırlanmıştır. Fareler kontrol ve deney grupları için tesadüfi olarak seçilmiş ve 5'erli gruplar şeklinde kafeslere yerleştirilmiştir. Çalışma süresince hayvanlar, Tecniplast firmasından satın alınan, her biri bireysel havalandırmaya sahip ve mikrobiyolojik kontaminasyonu önlemek amacıyla 0,2 mikron por çapında filtreli

kafeslerde tutulmuşlardır (Şekil 2.5). Laboratuvar sıcaklığı 20-24°C ve nispi nem % 45-65 olarak düzenlenmiş ve günde 3 defa kontrol edilmiştir. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu uygulanmıştır. Deney hayvanlarının beslenmeleri için yeteri kadar standart laboratuvar yemi (pellet) ve su kullanılmıştır. Yem ve su günlük olarak değiştirilmiştir.

HET-CAM uygulamaları için kullanılan Leghron tavuk yumurtaları Abalıoğlu A.Ş.'den satın alınmıştır.



Şekil 2.5 Deney hayvanlarının barınma alanı

2.5. Kullanılacak Deneysel Yöntemler

2.5.1. Ekstrelerin hazırlanması

Algler farklı fonksiyonel kutup ve gruplu bir dizi sekonder metabolit üreten karmaşık matrislere sahip olduğundan, bitkisel materyalin ekstraksiyonu için farklı adımlar izlenmektedir. Ekstraksiyon, çözelti ya da süspansiyon içindeki bir maddeyi farklı çözünürlük özelliğine sahip çözümler yardımıyla diğer bir sıvı faza alarak ayırma işlemidir. Ekstraksiyon yapılırken, biyolojik olarak aktif bileşiklerin etkinliklerini kaybetmeden izole edilmesini amaçlayan uygun, hızlı, düşük maliyetli ve çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesi esas alınmıştır. Ekstraksiyon işlemi genelde polar (metanol veya etanol), apolar (n-hekzan veya

kloroform) veya hafif polar (etil asetat) çözünebilirliğe sahip solvanlar yardımıyla “katı-sıvı” veya “sıvı-sıvı” ilkesine dayandırılarak gerçekleştirilmektedir.

Potansiyel aktiviteleri değerlendirilecek olan alg örneklerimiz işleme alınmadan önce 45°C’lik fırında kurutulmuştur. Daha sonra toz haline getirilerek, oda sıcaklığında her bir solvan için 3 x 500 mL olacak şekilde %99.8 saflığa sahip *n*-hekzan (Hex), kloroform (Chl) and metanol (Met) solvanları ile ultrasonik banyoda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu yöntemde çözücü 20 kHz üstündeki frekanslarla örneğe titreşimler uygular. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar ve böylece ekstraksiyon gerçekleşir (Capelo and Mota, 2005). İnkübasyon sonrasında her bir çözücü evaporatörde kuruluğa kadar uçurulmuştur (Şekil 2.4). Elde edilen ekstratlar (Çizelge 3.1) viallere konulup tartılarak -20°C’de buzdolabında bekletilmiştir.

2.5.2. Alg ekstratlarının içerik tayini

2.5.2.1. Total fenol ve flavanoit içerik tayini

Total fenolik içerik Folin-Ciocalteu metodu ile belirlenmiştir. (Meda et al, 2005). Öncelikle, miktarları 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL çözülmüş 0,1 mL ekstrat, 28 mL deiyonize su ile karıştırılmıştır. Bu çözelti, 2 mL % 2’lik sodyum karbonat ve 0,1 mL 0,1 N Folin-Ciocalteu ajanı ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında karışımın absorbanansı, deiyonize su içeren köre karşılık 750 nm’de UNICAM 8625 UV/Vis spektrofotometre ile standart olarak Gallik asit (GA) (Fluka Cas No: 149917) kullanılarak ölçümler yapılmış ve veriler mg gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

Total flavanoit içerik Chang et al., (2002) tarafından tanımlanan alüminyum klorür kolorimetrik metoduna göre belirlenmiştir. 0,5 mL ekstrat (0,5 mg/mL ve 1 mg/mL) 1,5 mL etanol, 0,1 mL % 10’luk alüminyum klorür ve 2,8 mL distile su ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika tutulduktan sonra, absorbanans 450 nm’de UNICAM 8625 UV/Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Kersetin (QE) standart olarak kullanılmıştır. Flavonoit miktarı kersetin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

2.5.2.2. **HPLC (YBSK) cihazı ile içerik analizi**

Analitik kimyada yaygın olarak kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YBSK) (HPLC), bir karışımdaki her bileşeni ayırmak, tanımlamak ve miktarını belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem numunedeki bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi, kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması prensibiyle çalışmaktadır. Standart karışımın derişimi 5ug/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda alg örneklerinin Hex, Chl ve Met ekstre içeriklerinin belirlenmesi için ekstrelerden 10'ar mg örnek alınmış 10 mL etanolde çözündürülmüştür. Standart karışımın derişimi 0.25, 1 and 5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Homojenize edilen örnekler Çizelge 2.1'de özellikleri verilen HPLC cihazına verilmiş ve α -tokoferol, gallik asit, kafeik, klorojenik asit, p-kumarik asit ve kersetin standartlarına karşılık içerik analizi gerçekleştirilmiştir. ($R_2 \geq 0.9996$)

Çizelge 2.1 HPLC Cihazının Özellikleri

Cihaz	Shimadzu 20A PDA
Kolon	Lichrospher RP18-5
Kolon Uzunluğu	25 m
Kolon Çapı	4,6 mm
Kolon Film Kalınlığı	5 µm
Mobil Faz	A) Su – Asetik asit (97:3 - V:V) B) Asetonitril
Başlangıç Akış Hızı	0.8 mL/dakika ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Kolon Sıcaklığı	30°C
DAD sinyali	280 nm
Başlangıç	0
Gradient program	
Dakika	Mobil Faz B(%)
0-5.0	8.5
5.0-16.5	2
16.5-35	18
35-50	20
50-65	30
65-65.1	0
65.1-70	0

2.5.3. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

2.5.3.1. DPPH yöntemi

Alg örneklerinin DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikalini süpürme kapasitesi Blois yöntemine göre ölçülmüştür (Turkoglu et al., 2006). 100 µl ekstre (0.5 mg/ml ve 1 mg/ml), 4 ml DPPH' in %0.004'lük metanol solüsyonuna eklenmiştir. Oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda 30 dak. inkübasyondan sonra absorbans 517 nm' de köre karşı UNICAM 8625 UV/Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür (Şekil 2.6). Tokoferol (TOC) karşılaştırma amacıyla standart olarak kullanılmış ve inhibisyon (*I*) yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır

(A_{blank} kontrol reaksiyonun absorbanı ve A_{sample} ise test edilen maddenin absorbanıdır): $I (\%) = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$



Şekil 2.6 Antioksidan aktivitenin tayin edilmesi

2.5.3.2. ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemi

Ekstrelerin total antioksidan aktivitesi ABTS⁺ renksizleştirme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. ABTS her sulfat başına potasyum ile mavi/yeşil ABTS⁺ üretir. Oluşan radikal 734 nm'de maksimum absorbanı gösterir. Antioksidanlar, katyon radikaline bir hidrojen atomu transferi ile renksizleştirmeye neden olur. Bu yöntemde, 5 mL, 7 mM ABTS ve 88 µL, 140 mM K₂S₂O₈ karıştırılacak ve oda sıcaklığında 12-16 saat boyunca karanlıkta radikal oluşumu tamamlanması için bekletilmiştir. Stok solüsyonu 734 nm'de 0.75 absorbanı veren PBS (fosfat buffer solüsyonu) (pH 7,4) ile seyreltilmiştir. 1 mL ekstreler seyreltilmiş stok solüsyonundan 2 mL eklenmiş ve kör olarak PBS kullanılmıştır. 5 dakika sonra başlangıçtaki karışımın 734 nm'de absorbanı ölçülmüş ve denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Total antioksidan aktivite yüzdesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır. Ayrıca trolox pozitif kontrol olarak (0.5 µg/mL) hazırlanmış ve ekstrelerin Relative antioksidan aktivitesi (RAA) hesaplanmıştır. $TAA \% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$

A_c : stok solüsyonun absorbanı A_s : ekstrelerin absorbanı

RAA = TAA % ekstre / TAA % standart antioksidan bileşiği (0.5 µg/mL trolox)

2.5.4. Antimikrobiyal aktivite testi (Mikrodilüsyon Testi)

Antimikrobiyal çalışmalar için kullanılan gram negatif ve gram pozitif bakteri suşları Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir.

Alg ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ölçümü ile değerlendirilmiştir. MIC değerleri, National Committee of Clinical Laboratory Standards tarafından geliştirilen prosedürlere göre mikrodilüsyon deneyi ile ekstralara duyarlı gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) ve gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 7064) bakteri suşına karşı gerçekleştirilmiştir (NCCLS 2003). Bakteri suşları Mueller-Hinton brotha (Difco) inokule edilerek ve 24 saat $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ de inkübe edilmiştir. Bakteri suşlarının inokulumları 24 saatlik broth kültürden hazırlanmış ve süspansiyonlar 0.5 McFarland standart turbiditeye göre ayarlanmıştır.

Ekstrelerden değişik konsantrasyonlarda bir seri test tübü hazırlanmıştır. Steril 96-lık mikropelatelerin kuyucukları, Mueller-Hinton broth (Difco), inokulum (1×10^8 CFU/ ml) ve ekstre eklenerek hazırlanmıştır. Son kuyucuk negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Platelere üzeri steril kapaklarıyla örtülerek, platerler 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm ekstralar her organizmaya karşı 2 kez test edilmiştir. MIC değeri, ekstraların mikroorganizmaları öldüren en düşük konsantrasyonu olarak belirlenmiş ve standart antibiotikler (Gentamisin, Ampisilin) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.5.5. Antikanser etkilerin belirlenmesi

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi (MTT Yöntemi)

Hücre Hatları: MCF-7 (İnsan meme adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-22), U-87MG (İnsan glioma hücre hattı, ATCC HTB-14), A549 (İnsan Akciğer karsinom hücre hattı, ATCC-CCL-185), CaCo-2 (İnsan kolon kolektoral

adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-37), HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı, ATCC-CCL-2) ve HEK 293 (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı, ATCC-CRL-1573) sitotoksiste testlerinde kullanılmıştır. Hücre hatları, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü hücre kültür koleksiyonundan temin edilmiş olup çalışmalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Arastırma ve Eğitim Laboratuvarında (AREL) gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültürü: Hücreler, %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Biological Industries, Cat: 04-121-1), %1 L-glutamin (Biological Industries, Cat: 41-218-100), %1 gentamisin (Biological Industries, Cat: 03-035-1C), %2 NaHCO₃ (% 5,5) (Sigma, CAS Number 144-55-8), 1 mM HEPES (Biological Industries, Cat: 03-025-1B), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Ham's F12 besiyeri ortamı (Biological Industries, Cat: 01-170-1B) içerisinde 37°C'ye ayarlanmış CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması kültür kabını % 80 kapladıktan sonra flasklarda pasajlama yapılarak sağlanmıştır.

Pasajlama ve Hücre Sayımı: DMEM F12 besi ortamı içerisinde aktif olarak çoğalan hücreler, Inverted Research Mikroskop (Olympus Ix71, Japan) altında incelenerek, sitotoksiste testi için istenilen hücre sayısına ulaşıp ulaşılmadığı belirlenmiştir. Logaritmik fazda aktif olarak çoğalan hücreler sitotoksiste testlerinde kullanılmıştır.

Hücrelerin hemositometrik sayımı için tüm hücre hatlarının besiyeri ortamı uzaklaştırılmış ve hücre hatlarının flask içerisindeki çoğalma yüzeyine Tripsin (Biological Industries, Cat: 03-051-5C) (75 cm²'lik flask yüzeyi için 1 mL, 25 cm²'lik flask yüzeyi için 0,5 mL) eklenerek, 37°C'ye ayarlanmış CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Her hücre hattının inkübasyon süresi, tripsin uygulanmış flasklardaki hücrelerin çoğalma yüzeyinden kalkması ve eklene tripsin içerisinde süspanse hale gelmesi ile orantılı olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücreler süspanse hale geçtikten sonra her flaska uygun konsantrasyonlarda DMEM F12 besi ortamı eklenerek, flask içeriği 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri, 1000 rpm'de +4°C'de 5 dakika (Eppendorf, 5810 R, Hamburg, Germany) santrifüjlenmişlerdir. Tüplerdeki üst faz uzaklaştırıldıktan sonra hücre sayımı yapabilmek için %10'luk bir dilüsyonda 100 µL hücre/ 900 µL

DMEM olacak şekilde 0,2 mL'lik falkon tüplerine aktarım yapılmıştır. Hemositometrik lama (Neubauer) %10 dilüsyonda 50 µL'lik hücresel süspansiyon eklenerek mikroskop altında, kullanılan hemositometrik metota uygun olarak mL'de ki hücre sayısı hesaplanmıştır. Sayımı yapılan hücrelerden hazırlanan stok hücre solüsyonları sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Hücre Canlılığı ve Sitotoksite Testi: MTT testi, hücre canlılığını, büyümesini ve hücrelerin aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik testtir. Test, yaşayan hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim kapasitesine bağlı suda çözünen sarı renkli MTT substratının, suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazan substratına dönüştürülmesi esasına dayanır. Üretilen formazan miktarı direk olarak canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi bölünmeyen ancak hala aktif olan hücrelerin belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Mosmann, 1983).

1×10^5 hücre/mL konsantrasyondaki hücreler 96 gözlü hücre kültürü kaplarına 100'er µL'lik hacimlerde ekilmiştir (1×10^4 hücre/kuyucuk). Bu hücreler, 24 saat 37°C'de, % 85 nem ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilerek 24 saat sonra üzerlerindeki ortamlar uzaklaştırılmış, yerlerine farklı konsantrasyonda hücre kültürü ortamında dilüe edilmiş alg ekstraktları eklenmiştir (Çizelge 2.2). Hücre canlılığı, inkübasyonun 48. saatinde 5 mg/mL konsantrasyonda MTT (30 µL/kuyucuk) (Ambresco, CAS Number: 298-93-1) solüsyonu eklenerek 4 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra formazan kristalleri DMSO (200 mL) ile çözülüp 570 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada Thermo Scientific, Multiskan Spectrum' dan (Waltham, USA) yararlanılarak her bir 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarında hücre canlılığı belirlenmiştir. Her bir hücre hattı için uygulanan dozda, kontrol ile karşılaştırılarak, hücre canlılığı ve maddelerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama GraphPad Prism 5 programı kullanılmıştır.

% Canlılık = $100 \times \frac{\text{Uygulanan dozdaki ortalama absorbans}}{\text{Kontrol hücre absorbansı}}$

Çizelge 2.2 Alg ekstralarının Maruziyet Dozları

Ana Stok Konsantrasyon	10 mg/mL		
Uygulama Dozları	I. Doz (mg/mL)	II. Doz (mg/mL)	III. Doz (mg/mL)
	50	5	0,5

Morfolojik İnceleme: Farklı konsantrasyonlarda ekstralara maruz bırakılmış hücrelerin 48. saatteki morfolojik incelemeleri Olympus Ix71 Inverted Research mikroskop altında yapılarak, DP71 Camera Instruction aracılığı ile fotoğraflanmıştır.

Veri Analizi: Sitotoksosite, herhangi bir ajana maruz bırakılmamış kontrol \pm SD'e bağlı olarak yüzde artış şeklinde belirlenmiştir. Kontrol değeri % 0 sitotoksik olarak alınmıştır. Sitotoksosite verileri sigmoidal eğriye oturturulmuş ve herhangi bir madde uygulaması yapılmamış kontrol grubuna kıyasla % 50 inhibisyona neden olan madde konsantrasyon değeri olan IC₅₀ değerinin hesaplanmasında 4 parametrelili lojistik model kullanılmıştır. IC₅₀, deneysel koşullar altında hücre büyümesini % 50 azaltan konsantrasyon değeridir. Bu değer en az üç tane birbirinden bağımsız tekrarlanabilir ve istatistiksel olarak anlamlı hesaplamaların ortalamasıdır. IC₅₀ değeri % \pm 95 güven aralığında belirlenmiştir. Bu analiz GraphPad Prism (San Diego, CA) ile yapılmıştır.

2.5.5.1. In vitro apoptotik etkinin belirlenmesi

Sitotoksosite denemesi sonrasında hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre 24 saat 37°C'de inkübe edilen hücreler (10⁵ hücre/mL) belirlenen IC₅₀ değerindeki konsantrasyon ile muamele edilerek, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, bu hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmış, ardından cDNA hazırlanmıştır. Her hücre hattından elde edilen cDNA'lar RealTime ready Human Apoptosis Panel'ine (Roche, 05392063001, Basel, Switzerland) yüklenerek, her hücre hattında apoptoz ile ilişkili yaklaşık 84 genin ekspresyon profilleri ortaya konulmuştur. Çalışma GENMAR Teşhis Ürünleri, ARGE Laboratuvar Hizmetleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirket'inde bulunan Roche Light Cycler® 480 sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Apoptoz paneli için hücrelerin hazırlanması: Elde edilen sitotoksosite verileri ışığında, etkin madde ile etkileşim içerisinde olan kanser ve normal hücre hatları seçilmiş ve apoptoz paneli için hazırlanmıştır. Belirlenen hücre hatları 25 cm²'lik flakslara, her bir hücre hattı için 1x10⁵ hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi yapılarak, yeni bir test düzeneği kurulmuştur. Flasklara eklenen hücreler 24 saat 37°C' de, % 85 nem ve % 5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası her 3 test maddesi için hesaplanan IC₅₀ değerindeki dozlar hücre hattına uygulanarak 48 saatlik madde maruziyeti için inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında 25 cm²'lik flakslardaki besi ortamı uzaklaştırılmış ve hücrelerin çoğalma yüzeyi 5 mL PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ile yıkanmıştır. Flasklara eklenen PBS uzaklaştırılarak yine hücre çoğalma yüzeyine 0,5 mL tripsin eklenmiş ve tüm flakslar inkübatöre kaldırılmıştır. Flask içerisindeki hücrelerin süspanse forma geçmeleri sağlandıktan sonra 5 mL PBS ile homojenize edilen flask içeriği, 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve 1000 rpm'de 7 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüpte üst fazda PBS ve alt fazda ise hücre pelleti gözlemlenmiştir. Üst faz dikkatlice uzaklaştırılmış ve alt fazda yer alan hücre pelletinden total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Kültür hücrelerinden total RNA izolasyonu prosedürü: Kanser ve normal hücre hatlarından total RNA izolasyonu, TriPure Isolation Reagent (Roche, 11667157001, Basel, Switzerland) ile yapılmıştır. Elde edilen total RNA'ların miktarı Thermo Scientific NanoDrop 2000c (Waltham, USA) cihazı ile ölçülmüştür.

Kültür hücrelerinden total RNA (1x10⁶ hücre) izolasyon prosedürü:

1. Steril polipropilen santrifüj tüpüne 0,8 mL TriPure Isolation Reagent (fenol ve guanidin tiyosiyanat monobazik çözeltisi) ve hücre pelleti eklenmiştir.
2. Şırınga yardımı ile TriPure Isolation Reagent içindeki hücreler homojenize edilmiştir.
3. Nükleoprotein kompleksinin ayrılması için homojenatlar 15-25°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

4. Her örneğe 0,8 mL TriPure reagent'ına 0,16 mL olacak şekilde kloroform eklenmiştir. Tüplerin kapağı kapatılmış ve 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalanmış ve örnekler 15-25°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

6. Faz ayırımı yapmak için + 4°C'de 12000g'de (15000 rpm) 15 dakika santrifüj yapılmıştır.

7. Santrifüj sonrasında 3 faz oluştuğu gözlenmiştir. (Renksiz üst sulu faz RNA izolasyonu için kullanılmıştır)

8. Renksiz üst faz polipropilen santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

9. Bu fazdan RNA'nın çöktürülmesi için 0,8 mL TriPure reagent'ına 0,4 mL olacak şekilde izopropanol eklenmiştir. Tüplerin kapağı kapatılmış ve birkaç kez ters-yüz edilmiştir ve örnekler 15-25°C'de 5-10 dakika inkübe edilmiştir.

11. +4°C'de 12000g'de (15000 rpm) 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant atılmıştır.

12. Tüplere 0,8 mL TriPure reagent'ına 0,8 mL olacak şekilde % 75 etanol eklenmiştir. Örnekler vorteksenerek etanolde yıkanmıştır.

13. +4°C'de 7500g'de (15000 rpm) 5 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant atılmıştır ve vakum ya da hava akımı ile RNA'dan etanol uzaklaştırılmıştır.

15. RNA pelleti Dietilpirokarbonat (DEPC)-uygulanmış 20 µL'lik RNaz-free su ile resüspande edilmiştir.

16. RNA bir pipet yardımı ile çözülmüş, 10-15 dakika 55-60°C'de inkübe edildikten sonra kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Total RNA'dan cDNA sentezi: Total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, elde edilen total RNA'lardan cDNA hazırlanmıştır. cDNA sentezi için kullanılan Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, 05081955001, Basel, Switzerland) solüsyonları çalışma öncesinde çözündürülmüş ve birkaç saniye santrifüjlenmiştir. Tüm işlem buz kaseti üzerinde gerçekleştirilmiştir. Buz kaseti üzerindeki steril PCR tüplerinde, Çizelge 2.3'de içeriği yer alan template-primer karışımı 96 reaksiyonluk master mix şeklinde hazırlanmıştır.

Template-primer karışımını denatüre etmek için tüpler 10 dakika 65 °C'de bekletilmiş. Bu adımda RNA'nın ikincil yapılarının denatürasyonu sağlanmıştır. 10 dakikanın sonunda tüpler hemen buz üzerine alınmıştır ve denatüre RNA formlarının korunması sağlanmıştır. Template-primer karışımını içeren tüpler

içerisine her bir reaksiyon için son hacim 20 µL olacak şekilde revers transkriptaz (RT) karışımı bileşenleri eklenmiştir.

Çizelge 2.3 Template-Primer Karışımının Hazırlanması

Kit Bileşenleri (1 Örnek için)	Hacim	Master-Mix TP (96 reaksiyon)
Total RNA	4 µL	348 µL
Random Hexamer primer, 600 pmol/µL	2 µL	192 µL
dH ₂ O (PCR Grade)	5,4 µL	518,4 µL
Son Hacim	11,4 µL	1058,4 µL

RT karışımı bileşenlerini içeren tüpler 25 °C’de 10 dakikayı takiben 55 °C’de 30 dakikalık inkübasyonun gerçekleşeceği termal cykler cihazına verilmiştir. 85 °C’de 5 dakika bekletilerek revers transkriptaz enziminin inaktivasyonu sağlanmış ve tüpler soğuk buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulmuştur. cDNA içeren tüpler kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Template-primer karışımını içeren tüpler içerisine son hacim 20 µL olacak şekilde Çizelge 2.4’de yer alan Revers transkriptaz (RT) Mix bileşenleri eklenmiştir.

Çizelge 2.4 Revers Transkriptaz (RT) Karışımının Hazırlanması

Kit Bileşenleri (1 örnek)	Her Bileşenin Son Konsantrasyonu	Aktarım Hacmi (1 reaksiyon)	Master Mix (96 reaksiyon)
Reaksiyon tamponu (5x conc.)	1 x (8 mM MgCl ₂)	4 µL	348 µL
RNaz inhibitörü (40 U/ µL)	20 U	0,5 µL	486 µL
Deoks nükleotid karışımı (dNTP)	1 mM	2 µL	192 µL
DDT	5 mM	1 µL	96 µL
Revers Transkriptaz	10 U	1,1 µL	105,6 µL
Son Hacim	-	20 µL	1920 µL

Real time PCR yöntemi: İnsan apoptotik panel (Roche, 0539206300, Basel, Switzerland) apoptoz ile ilişkili gen ekspresyon profillerinin belirlenmesinde kullanıma hazır bir üründür. Apoptotik yolakta yer alan genlerin ekspresyon profillerinin belirlenebilmesi için dizayn edilmiştir. Bu dizayn ile 84

adet insan apoptosiz ilişkili genin yanında, 7 adet housekeeping gen ve 5 adet kontrol içeren bir qPCR analizi yapılmakta ve hedef gen ekspresyonunun rölatif kantifikasyonu belirlenmektedir. Çizelge 2.5’de ise analizlenen hedef genlerle ilişkili bilgiler ve Çizelge 2.6’da ise panel için kullanılan plaka şablonu yer almaktadır.

Çizelge 2.5 İnsan Apoptotik Panel Analizinde Kullanılan Plaka Şablonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AKT	APAF	AVEN	BAD	BAG1	BAK1	BAX	BBC3	BCL2	BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11
B	BCL2L13	BCL2L2	BID	BIK	BIRC2	BIRC3	BIRC5	BOK	CAD	CASP1	CASP10	CASP12
C	CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7	CASP8	CASP8AP2	CASP9	CFLAR	CRA DD
D	DDFA	DIA BLO	endo G	FADD	FAM96A	FAM96B	FAM96B	FASLG	HMG B1	HRK	HSP90 B1	HTR A2
E	LRDD	MCL	NFK B1	NFK B2	NGFR	PMAIP1	PMAIP1	REL	RELA	RELB	SOCS2	SOC S3
F	STAT1	STAT5A	STAT5B	TNF	TNFR SF10A	TNFR SF10B	TNFR SF10C	TNFR SF10D	TNFR SF11D	TNFR SF10D	TNFR SF10D	TNFR SF10D
G	TNFRSF25	TNFRSF8	TNFRSF10	TNFRSF11	TP53	TP53I3	TP53I3	TRAF2	TRAF3	TRAF5	TRAF6	TRAF7
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPT	RPL13A	18S	YWHAZ	RT+	RT+	RT+	RT-	RT-
	REFERANS GENLER							POZİTİF KONTROLLER			NEGATİF KONTROLLER	

Çizelge 2.6 İnsan Apoptotik Panel Detaylı İçeriği

Pos.	Sembol	Tanım
A01	AKT ₁	RAC-alfa serin/treonin- protein kinaz
A02	APAF ₁	Apoptotik proteaz-aktif edici faktör 1 (Apaf-1)
A03	AVEN	Hücre ölümü regülatörü Aven
A04	BAD	BCL ₂ antagonisti (BAD)
A05	BAG ₁	BAG ailesinin moleküler şaperon regülatörü 1
A06	BAK ₁	BCL ₂ homolog antagonisti/ öldürücü (Regülatör BAK)
A07	BAX	Apoptoz regülatör BAX
A08	BBC ₃	BCL ₂ bağlanma elemanı 3 (p53 up-regülatör modülatörü)
A09	BCL ₂	Apoptoz regülatör BCL ₂
A10	BCL ₂ L ₁	Apoptoz regülatör Bcl-xL (BCL ₂ benzeri 1 protein)
A11	BCL ₂ L ₁₀	Apoptoz regülatör BCL ₂ B (BCL ₂ benzeri 10 protein)
A12	BCL ₂ L ₁₁	BCL ₂ benzeri protein 11 (BCL ₂ interaksiyon mediyatörü, Bim)
B01	BCL ₂ L ₁₃	BCL ₂ benzeri 13 protein (Protein Mil ₁)
B02	BCL ₂ L ₂	Apoptoz regülatör Bcl-W (Bcl-2 benzeri 2 protein)
B03	BID	BH3 interaksiyon domaini ölüm antagonisti (BID)
B04	BIK	BCL ₂ interaksiyon öldürücü (İndükleyici NBK)
B05	BIRC ₂	Baculoviral IAP tekrarları içeren protein 2 (IAP ₁)
B06	BIRC ₃	Baculoviral IAP tekrarları içeren protein 3 (IAP ₂)
B07	BIRC ₅	Baculoviral IAP tekrarları içeren protein 5 (Survivin; IAP ₄)
B08	BOK	BCL ₂ ilişkili ovaryan öldürücü protein (Hbok)
B09	CAD	CAD protein
B10	CASP ₁	Kaspaz-1 prokürsör
B11	CASP ₁₀	Kaspaz-10 prokürsör
B12	CASP ₁₂	İnaktif kaspaz
C01	CASP ₁₄	Kaspaz-14 prokürsör
Pos.	Sembol	Tanım
C02	CASP ₂	Kaspaz-2 prokürsör
C03	CASP ₃	Kaspaz-3 prokürsör
C04	CASP ₄	Kaspaz-4 prokürsör
C05	CASP ₅	Kaspaz-5 prokürsör
C06	CASP ₆	Kaspaz-6 prokürsör
C07	CASP ₇	Kaspaz-7 prokürsör
C08	CASP ₈	Kaspaz-8 prokürsör
C09	CASP ₈ AP ₂	CASP ₈ - ilişkili protein 2 (FLICE ilişkili büyük protein)
C10	CASP ₉	Kaspaz-9 prokürsör
C11	CFLAR	CASP ₈ ve FADD-benzeri apoptoz regülatör prokürsörü (c-FLIP)
C12	CRADD	Ölüm domaini içeren protein CRADD
D01	DFFA	DNA fragmentasyon faktörü alt-ünite α (ICAD)
D02	DIABLO	DIABLO homologu, mitokondrial prokürsör (mitokondrial aktivatörü)
D03	endoG	Endonükleaz G, mitokondrial prokürsör
D04	FADD	Protein FADD (Fas ilişkili ölüm domain proteini)
D05	FAM _{96A}	UPF ₀₁₉₅ protein FAM _{96A}
D06	FAM _{96B}	UPF ₀₁₉₅ protein FAM _{96B}
D07	FAS	TNF-reseptör süperaile üyesi 6 (FASLG reseptörü)
D08	FASLG	TNF- ligand süperaile üyesi 6 (Fas antijen ligandı) (TNFSF ₆)
D09	HMGB ₁	Hareketliliği yüksek grup proteini B1
D10	HRK	Apoptoz harakiri aktivatörü (Nöral ölüm proteini DP5)
D11	HSP _{90B1}	Endoplazmin prokürsörü (Isı şok proteini β üyesi 1)

D12	HTRA ₂	Serin proteaz HTRA ₂ , mitokondrial prokürsör
E01	LRDD	Lösence zengin tekrarlı ve ölüm domaini içeren protein
E02	MCL ₁	İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini MCL ₁
E03	NFKB ₁	Nükleer faktör NF-kappa-B p105 alt-ünitesi
E04	NFKB ₂	Nükleer faktör NF-kappa-B p100 alt-ünitesi
E05	NGFR	TNF-reseptör süperaile üyesi 16 prokürsörü
E06	PMAIP ₁	Phorbol-12-myristate-13-acetate indüklü protein 1
E07	PTEN	Phosphatidylinositol- 3,4,5-trisphosphate3-fosfataz
E08	REL	C-Rel proto- onkogen protein (C-Rel protein)
E09	RELA	Transkripsiyon faktör p65 (NF-kappa-B p65 alt-ünitesi)
E10	RELB	Transkripsiyon faktör RelB (I-Rel)
E11	SOCS ₂	Sitokin sinyali 2 baskılayıcısı (SOCS-2)
E12	SOCS ₃	Sitokin sinyali 3 baskılayıcısı (SOCS-3)
F01	STAT ₁	Transkripsiyon 1- α/β 'nın sinyal transdüker ve aktivatörü
F02	STAT _{5A}	Transkripsiyon 5A'nın sinyal transdüker ve aktivatörü
F03	STAT _{5B}	Transkripsiyon 5B'nın sinyal transdüker ve aktivatörü
F04	TNF	Tümör nekrotik faktör prokürsörü (TNF- α)
F05	TNFRSF _{10A}	TNF- reseptör süperaile üyesi 10A prokürsörü (TRAILR ₁ ;DR ₄)
F06	TNFRSF _{10B}	TNF- reseptör süperaile üyesi 10B prokürsörü (TRAILR ₂ ; DR ₅)
F07	TNFRSF _{10C}	TNF-reseptör süperaile üyesi 10C prokürsörü(TuzakR ₁ ; TRAILR ₃)
F08	TNFRSF _{10D}	TNF-reseptör süperaile üyesi 10D prokürsörü(TuzakR ₂ ; TRAILR ₄)
F09	TNFRSF _{11B}	TNF- reseptör süperaile üyesi 11B (Osteoprotegrin)
F10	TNFRSF _{1A}	TNF- reseptör süperaile üyesi 1A prokürsörü (p60) (TNFR ₁)
F11	TNFRSF _{1B}	TNF- reseptör süperaile üyesi 1B prokürsörü (TNFR ₂)
F12	TNFRSF ₂₁	TNF-reseptör süperaile üyesi 21 prokürsörü (TNF-ölüm reseptörü 6)
G01	TNFRSF ₂₅	TNF-reseptör süperaile üyesi 25 prokürsörü (WSL-1)
G02	TNFSF ₈	TNF- ligand süperaile üyesi 8 (CD ₃₀ ligandı)
G03	TNFSF ₁₀	TNF- ligand süperaile üyesi 10 (apoptosiz-indükleyen L) (TRAIL)
G04	TNFSF ₁₁	TNF-ligand süperaile üyesi 11 (NFKB-R aktivatörü)
Pos.	Sembol	Tanım
G05	TP ₅₃	Hüresel tümör antijen p53 (Tümör baskılayıcı p53)
G06	TP _{53I3}	Varsayılan quinone oksidoredüktaz
G07	TRAF ₁	TNF-reseptör- ilişkili faktör 1
G08	TRAF ₂	TNF-reseptör- ilişkili faktör 2
G09	TRAF ₃	TNF-reseptör- ilişkili faktör 3 (CD ₄₀ reseptör ilişkili faktör 1)
G10	TRAF ₅	TNF-reseptör- ilişkili faktör 5 (RING parmak protein 84)
G11	TRAF ₆	TNF-reseptör- ilişkili faktör 6 (İnterlökin- 1 sinyal transdüker)
G12	TRAF ₇	E ₃ ubiquitin-protein ligaz TRAF ₇
H01	ACTB	Aktin, sitoplazmik 1 (β -aktin)
H02	B ₂ M	β -2-mikroglobulin prokürsörü
H03	GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
H04	HPRT ₁	Hipoksatin-guanin fosforibosil transferaz
H05	RPL _{13A}	₆₀ S ribozomal protein L _{13a} (23 kDa yüksek bazik protein)
H06	₁₈ S	₁₆ S ribozomal RNA
H07	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinaz C inhibitör protein 1)
H08	RT+	RT-pozitif kontrol 5'
H09	RT+	RT-pozitif kontrol orta
H10	RT+	RT-pozitif kontrol 3'
H11	RT-	RT- negatif kontrol 1 cDNA
H12	RT-	RT- negatif kontrol 2 RNA

Toplamda 5 adet kontrol ile elde edilen RNA'nın kalitesi belirlenmektedir. Bunlardan 3 tanesi RT pozitif kontrol (RT+) olarak revers transkripsiyon adımını, diğer 2 tanesi de RT negatif kontrol (RT-) olarak rezidüel genomik DNA'nın denetimini sağlamaktadır. Ayrıca 7 adet housekeeping gen kontrol kullanımı, hedef gen ifadesinin normalizasyonunda ve ifadesindeki değişimin belirlenmesinde önemlidir. Hazırlanan PCR karışımları ve hücre hatlarından elde edilen cDNA örnekleri plakaya yüklenmiştir. Böylece hedef gen ekspresyonunun görece miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir. PCR analizine başlamadan önce her bir reaksiyon için PCR karışımı yine 96 reaksiyonluk PCR master mix şeklinde hazırlanmıştır (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7 PCR Karışımının Hazırlanması

PCR Karışımı Bileşenleri	Hacim (1 reaksiyon)	PCR Master Mix (96 reaksiyon)
dH ₂ O (PCR Grade)	9,8 µL	940,8 µL
LightCycler® 480 Probes Master	10 µL	960 µL
cDNA	0,2 µL	19,2 µL
Son Hacim	20 µL	1920 µL

Çizelge 2.8'de ki tek bir reaksiyonluk konsantrasyonlar, 96 reaksiyonluk panele uygun olacak şekilde PCR master mix olarak buz kaseti üzerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan tek örneklik PCR master mix bileşenleri pipetle karıştırılmış ve akabinde her bir plaka kuyucuğunda, son hacim 20 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Her bir kuyucuğunda PCR master mix içeren plaka 2 dakika, 1500 g'de santrifüjlendikten sonra LightCycler® 480 cihazında, Çizelge 2.9'da verilen program ayarlaması ile çalışılmıştır.

Apoptotik gen ekspresyonunun rölatif kantifikasyonu: Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi iki method aracılığı ile gerçekleştirilebilir. Bunlar kesin ve rölatif kantifikasyon olarak adlandırılır (Livak and Schmittgen, 2001). Kesin kantifikasyonda, reaksiyona giren kopya sayısının oluşturduğu PCR sinyalinin standart eğim yardımı ile hesaplanması baz alınırken, rölatif kantifikasyonda, çalışma grubunun hedef transkriptinin oluşturduğu PCR sinyalinin kontrol grubu ile göreceli olarak karşılaştırılması temelinde bir hesaplama yapılır. Çalışmada 84 adet insan apoptozisi ilişkili hedef gen ekspresyonunun rölatif kantifikasyonunda, 'Karşılaştırmalı CT Methodu'

kullanılmıştır. Bu yöntem ile hedef gen ekspresyonunun görece miktarı, analizde kullanılan 7 adet housekeeping gen ekspresyonu ile karşılaştırılma esası baz alınarak, fold change (kat artışı) şeklinde saptanmıştır. İnternal kontrol olarak kullanılan housekeeping genler ve apoptotik hedef genler Çizelge 2.5 ve 2.6’da gösterilmiştir.

Karşılaştırmada kullanılan kantitatif değer, CT değeri, sabit bir eşik değere ulaşan amplifiye edilmiş hedef gen miktarındaki fraksiyonel döngü sayısını ifade eden bir değerdir. 84 adet hedef gen ve 7 adet housekeeping gen için bu CT değerleri, ‘Delta CT (Δ CT)’ değeri olarak her bir hedef gen için 7 adet housekeeping gen CT değer ortalaması ile normalize edilmiş formda LightCycler tarafından hesaplanmıştır. Elde edilen bu ham Δ CT değerlerinden ise analizdeki her bir hücre hattındaki hedef gen için Delta-Delta CT ($\Delta\Delta$ CT) değerleri hesaplanmıştır (Livak and Schmittgen, 2001) (Çizelge 2.9).

Çizelge 2.8 LightCycler® 480 Cihaz Çalışma Protokolü

Dedektör Formatı		Blok Ölçüsü	Reaksiyon Hacmi
Monocolor Hydrolysis Prob / UPL Probu		96 Kuyucuk	20 μ L
Filtre Kombinasyonu: Dinamik mod			
FAM 483 – 533 or 465 – 510 sırasıyla, LightCycler 480 Instrument Version I or II			
Program Adı		Döngüler	Analiz Modu
Pre-İnkübasyon		1	-
Ampfilikasyon		45	Miktar Ölçümü
Soğutma		1	-
Sıcaklık Hedefleri ($^{\circ}$ C)	Acquisition Modu	Bekleme (ss:dd:ss)	Ramp Oranı
Pre-İnkübasyon			
95	Yok	00:10:00	4.4
Ampfilikasyon			
95	Yok	00:00:10	4.4
60	Yok	00:00:30	2.2
72	Tek	00:00:01	4.4
Soğutma			
40	Yok	00:00:30	2.2

Çizelge 2.9’da belirtilen formülle hücre hatlarındaki her bir hedef gen için hesaplanan bu $\Delta\Delta$ CT değerlerinden yararlanılarak, yine her bir hücre hattına özgü hedef genin kontrole göre ne kadar değiştiğinin yorumlanması amacı ile

'Karşılaştırmalı CT Methodu' temelinde "Kat Değişimi" (Fold Change) değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 2.9 $\Delta\Delta C_T$ ve Fold Change Değerlerinin Belirlenmesi

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(SFO)} - \Delta C_{T(Kont)}$	$\Delta\Delta C_T$: Hedef genin Delta C_T değeri
	$\Delta C_{T(alg)}$: Alg ekstreleriyle muamele edilmiş hücre hatlarındaki normalize edilmiş hedef gen C_T değeri
	$\Delta C_{T(Kont)}$: Kontrol hücre hattındaki normalize edilmiş hedef gen C_T değeri
$\Delta\Delta C_T$ değeri ≤ 0 ise;	$Fc = 2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
$\Delta\Delta C_T$ değeri > 0 ise;	$Fc = (-1) / 2^{-(\Delta\Delta C_T)}$

2.5.6. Anjiyo/Anti-anjiyogenik aktivitenin belirlenmesi

2.5.6.1. In vitro hücre migrasyon denemesi (Wound Healing Assay)

Yara iyileşmesi; inflamasyon, hücre migrasyonu, anjiyogenezis, geçici matriks sentezi ve kollajen birikimi gibi karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, anjiyogenik faktörler tarafından uyarılmış vaskülarizasyon ve hücre poliferasyonunda artış meydana gelmektedir. Yara iyileşme prosedüründe hücreler, yara oluşan bölgeye doğru kutuplaşarak göç ederler.

Çalışmada "CytoSelect 24 –Well Wound Healing Assay Kit" (Cell Biolabs, INC.) kullanılmıştır.

Alg örneklerinin Hex, Chl ve Met ekstreleri 5mg/1000 μ L konsantrasyonlarında olacak şekilde fibroblast hücrelerine uygulanmış ve çalışma 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Steril koşullar altında Laminar Air Flow içinde gerçekleştirilen çalışma prosedürü Çizelge 2.10'de verilmiştir.

Çizelge 2.10 Yara İyileşme Modeli İşlem Basamakları

No	Hücre Migrasyonu
1	Fibroblast hücreleri için kullanılacak 4 kit (FBS, rhFGF-B, GA-100, insülin) ortam bulunan flakslara ekip etüve bırakılır.
2	+4°C'de muhafaza edilen 24 kuyucuklu CytoSelect™ Yara İyileşme Inset'leri oda sıcaklığında (25 ± 1 °C) 10 dakika bekletilir.
3	Steril pens yardımı ile insetler 24 kuyucuklu plakaların içine yerleştirilir.
4	% 10 Fetal Bovin Serum (FBS) içinde 0,5-1,0 x 10 ⁶ hücre/mL olacak şekilde süspansiyon hazırlanır.
5	Her kuyucuğa 500 µL hücre süspansiyonundan eklenir.
6	Hücreler 37 ± 1 °C'de 24- 48 saat inkübe edilirler.
8	Dikkatli bir şekilde steril pens yardımı ile insetler kaldırılır ve 0,9 mm alana sahip yara modelini oluşturulmuş olur.
9	Kuyucuklardaki besiyeri yavaşça aspire edilir. Yıkama işlemi ile ölü hücreler uzaklaştırılır. Hücrelerin nemli kalması için biraz besiyeri kuyucuklarda bırakılır.
10	Işık mikroskopu altında görüntü alınır ve ölü hücre veya tutunamayan hücre var ise yıkama işlemine devam edilir.
11	Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra FBS eklenir.
12	Alg eksreleri 5 mg/mL miktarında eklenir ve inkübasyon gerçekleştirilir.
13	Yara iyileşme süreci yapılan ölçümler ile takip edilir.
DAPI Floresan İşaretleme / Giemsa Boyama	
14	Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp hücrelerin üzerine 0,5 mL fiksasyon çözeltisi eklenir.
15	10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra çözelti uzaklaştırılır.
16	PBS ile hücreler 3 defa yıkanır.
17	6,5 mL fizyolojik suya 6,5 µL DAPI olacak şekilde hazırlanır.
18	Her kuyucuğa 250 µL DAPI eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
19	PBS ile hücreler 3 defa yıkanır ve 1 mL PBS eklenir ve hücreler inverted mikroskopta incelenerek fotoğflanır.
20	Giemsa (Sigma, Cas No: 51811-82-6) boyama için, DAPI incelemesinden sonra ortamdaki uzaklaştırılır.
21	250 µL giemsa ortama eklenir ve 15 dakika beklenir.
22	Süre sonunda giemsa uzaklaştırılır ve mikroskopta fotoğraf çekimi gerçekleştirilir.
Hesaplamalar	
Yara İyileşme Yüzdesi	
23	Yara alanı olarak belirlenen yüzey ölçülür. Total Yüzey Alanı = 0,9 mm x uzunluk
24	Yara yüzeyinde göç eden hücrelerin alanı hesaplanır. Migrasyona uğramış Hücre Yüzey Alanı = hücre göçünün uzunluğu (mm) x 2 x uzunluk
25	Kapanma Yüzdesi (%) = Migrasyona uğramış Hücre Yüzey Alanı / Toplam Yüzey Alanı x 100

2.5.6.2. **In vivo koryoallantoik membran yöntemi (HET-CAM)**

Alg ekstralarının anti-anjiogenik ve olası anjiyogenez inhibitörü etkilerini ortaya koymak amacıyla döllenmiş tavuk yumurtaları üzerinde, koryoallantoik membran modeli uygulaması gerçekleştirilmiştir (Krenn and Paper, 2009).

50-60 gr ağırlığında, 0. günde temiz beyaz Leghron tavuk yumurtalarında analiz gerçekleştirilmiştir. Döllenmiş yumurtalar, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de, % 58 ± 2 nem oranında 5 gün kuluçka makinasında inkübasyona bırakılmışlardır. 5. günde yumurtalar çıkartılmış, hava boşluğu (künt) olan yerden işaretleme yapılmış ve o bölgeden 25 mm'lik disk şeklinde yumurta kabuğu kaldırılmıştır. Bu aşamada zarın yırtılmamasına özen gösterilmiştir. Membran % 9'luk NaCl ile nemlendirildikten sonra yumurtalar tekrar inkübatöre yerleştirilmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. Koryoallantoik membran, yaklaşık 2 cm çapa ulaştığında 0,3 mL alg örnekleri direkt olarak uygulanmıştır. Pozitif ve negatif kontrol maddeleri de aynı miktarda uygulanmıştır. Kabuktaki bu açıklık laboratuvar filmi ile kapatılmıştır. Her bir test bileşiğinin her bir konsantrasyonu için 5 yumurtaya uygulama yapılmıştır ve tüm testler iki kez tekrarlanmıştır. Uygulama sonucunda örnekler hemoraji, vasküler lizis ve koagülasyon bakımından Çizelge 2.11'e göre değerlendirildikten sonra elde edilen skorlar aşağıdaki formüle yerleştirilip hesaplamalar yapılmıştır. Deney sonunda embriyolar hızlı bir şekilde kurban edilmişlerdir.

Çizelge 2.11 HET-CAM Değerlendirilmesinde Kullanılan Skor Değerleri

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
< 0,5	Yok	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Normal embriyo oluşumu gözlenmektedir. ✓ Çevre kapillerlere göre değişiklik yoktur. ✓ Hemoraji, lizis veya koagülasyon durumu tespit edilmemiştir.
0,5-0,75	Zayıf	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kapiller damarsız alan yoktur. ✓ Kapillerlerin yoğunluğu azalmıştır
0,75-1	Orta	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmıştır. Etkiler madde alanının 2 katından fazla değil.
> 1	Kuvvetli	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kapillersiz alan mevcuttur. ✓ Normal embriyo oluşumu gözlenmemektedir.

Ortalama skor = [Yumurta sayısı (Skor 2) x 2 + Yumurta sayısı (Skor 1) x 1] / [Toplam Yumurta Sayısı (Skor 0, 1, 2)].

Bu ortalama skor sistemine göre:

skor < 0,5: antianjiyogenik etki yok

skor = 0,5-0,75: zayıf düzeyde antianjiyogenik etki

skor = 0,75-1: orta düzeyde antianjiyogenik etki

skor > 1: Kuvvetli antianjiyogenik etki olarak değerlendirilmektedir.

2.5.7. Mutajenik potansiyelin belirlenmesi (AMES) Testi

Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan Ames Testi “*Salmonella*-mikrozom test sistemi” olarak da bilinmektedir. Bu test, kısa zamanlı testlerin en yaygın kullanılanı, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş olmasının yanı sıra bilinen mutajen ve kanserojenlerle denenerek geçerliliği kabul edilmiş, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Organizasyonu (Organisation for Economic Co-operation Development) tarafından standardize edilmiş bir testtir (OECD 471).

Bu test, yapay olarak mutasyona uğratarak histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş (*His⁻*, oksotrofik, His gerektiren) *Salmonelle typhimurium* suşlarının test edilen kimyasal madde ile maruziyetinden sonra ikinci bir mutasyon geçirip yabancı tip (*His⁺*, prototrofik, His üreten) hale geri dönüşmeleri temeline dayanır (Maron and Ames, 1983).

2.5.7.1. **Test Bakterileri ve Genotoksik Özellikleri:** Çalışmamızda *Salmonella typhimurium*’ un TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları kullanılmıştır.

Çizelge 2.12 *Salmonella typhimurium* Suşlarının Genotipleri ve Özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	Mutasyon Tipi	Hedef	Hücre Duvarı	Onarım	pKm1 01	R-faktör
98	His D3052	Çerçeve kayması	GCGCGCGC GC yanından-1	Rfa	Δ uvr B	+	+
100	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	+	+
1535	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	-	+
1537	His C3076	Çerçeve kayması	C-C-C yanına +1	Rfa	Δ uvr B	-	+

His D 3052: His D⁺ geni histidinol dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır. his D 3052 mutasyonu (-1) çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup nükleotid eksikliği his D⁻ geni içinde 8 kere tekrarlanan –GCGCGCGC- bölgesindedir. Bu nedenle suş daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/karsinojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülmektedir.

His G 46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende lösün kodunu (GAG) yerine prolin kodunu (GGG) gelmesine neden olmaktadır.

His C 3076: +1 çerçeve kayması (near C-C-C run) tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/karsinojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülmektedir.

Rfa: Bu mutasyon hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit örtüsünü zayıflatarak normal hücrelere giremeyen benzopiren gibi büyük moleküllerin test bakterilerine girebilmelerini sağlamaktadır.

Δ: Delesyon: Uvr B geni “excision repair” de görevi olan bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bu enzimin yokluğu mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha hassas yapmaktadır.

+R: pKM101: Ampisilin dirençlilik geni taşıyan, hücrede çok sayıda bulunan bir plazmittir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu, bu hücrelerde normalde bulunan ve hata frekansı yüksek olan “error-prone” DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve bu nedenle de kimyasalların etkisiyle veya spontan olan mutasyonların artmasına neden olmaktadır.

2.5.7.2 Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi: Xenometrix firmasından temin edilen Ames MPFtm 98/100/1535/1537 kiti ile yapılmıştır. Salmonella typhimurium test bakterilerinin stok kültürleri de kit içeriği olarak Xenometrix firmasından temin edilmiştir. Testin güvenilirliği açısından test suşlarının genetik yapılarındaki mutasyon durumları Maron ve Ames (1983) tarafından geliştirilen yöntem uygun olarak Xenometrix tarafından yapılmış ve sertifikalandırılmıştır.

2.5.7.3 Metabolik aktivasyon çalışması : Tüm bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik, unsur memelilerdeki detoksifikasyon/biyoaktivasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin bakterilerde olmayışıdır. Bu amaçla en yaygın kullanılan enzim preparatı, sıçanların enzim aktivasyonunun kimyasal ile uyarılmış haldeki karaciğer dokularından homojenize edilen ve S9 fraksiyonu olarak isimlendirilen mikrozomal enzim fraksiyonudur. Hücre homojenize edilirken endoplazmik retikulum membranı “mikrozom” denilen kürecikler haline dönüşür. Bu kürecikler biyotransformasyonda görev alan enzimlerin oldukça önemli bir kısmını içerir.

Çeşitli maddelerin biyoaktivasyonunu etkili bir şekilde arttırmak için, insan karaciğerine oranla daha kolay elde edilmelerinden dolayı, aroclor 1254 ile muamele edilmiş fare karaciğerlerinden elde edilen S9 fraksiyonu kullanılmaktadır ve bu çalışmada Xenometrix firmasından temin edilen % 30'luk S9 karışımı kullanılmıştır. S9 karışımının hazırlanması için gerekli kofaktör çözeltilerinin hazırlanışları ve saklama koşulları çizelge 2.13'te verilmiştir.

Çizelge 2.13 Kofaktör Çözeltilerinin Hazırlanışları

Stok Konsantrasyon	Kimyasal Madde	Toplam Hacim	Miktar	Saklama Koşulu	Ames için kullanılan miktarlar
1,00 M	KCl	50 mL	3,728 g	4°C	0,083 mL
0,25 M	MgCl ₂ ·6H ₂ O	50 mL	2,541 g	4°C	0,080 mL
0,20 M	Glukoz-6-fosfat	10 mL	0,564 g	-20°C	0,063 mL
0,04 M	NADP	10 mL	0,306 g	-20°C	0,250 mL
0,20 M	NaH ₂ PO ₄	100 mL	3,120 g	4°C	1,270 mL
-	S9k Fraksiyonu	-	-	-	0,750 mL

2.5.7.4 Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanışı: Bakterilere karşı mutajenik etkileri bilinen standart maddeler pozitif olarak her deneyde yapılmalıdır. Test ortamına S9 karışı ilave edilmesi veya edilmemesi durumları için farklı pozitif kontroller kullanılmıştır. Her suş için kullanılan pozitif kontroller ve miktarları Çizelge 2.14'te verilmiştir.

Çizelge 2.14 Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Suşlar	-S9'lu testler için kullanılan kimyasallar	Konsantrasyon	+S9'lu testler için kullanılan kimyasallar	Konsantrasyon
TA 98	2-nitrofluoren (2-NF)	2 µg/mL	2-aminoantrasen(2-AA)	25 µg/mL
TA 100	4-nitroquinolin N-oksit (4-NQO)	0,1 µg/mL	2-aminoantrasen(2-AA)	62,5 µg/mL
TA 1535	N ⁴ -aminositidin(N ⁴ -ACT)	100 µg/mL	2-aminoantrasen(2-AA)	125 µg/mL
TA 1537	9-aminoakridin (9-AA)	15 µg/mL	2-aminoantrasen(2-AA)	125 µg/mL

Alg ekstrelerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesinde test maddesinin seyreltilmesi işlemi sırasında 1 adet 96'lık seyreltme mikroplakası, bakterilerin test maddelerine maruziyeti için 24'lük maruziyet mikroplakası kullanılmıştır. Ames testinde; test maddesinin seyreltilmesi ve pozitif kontrol ilavesi için 96'lık seyreltme mikroplakası, bakterilerin test maddesine maruziyeti için 24'lük mikrolakası, maruziyet kültürlerinin mutajenik aktivitelerinin tespiti için 384'lük mikrolakası kullanılmıştır.

2.5.7.5 Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması: Bakteriler, ayrı ayrı 50 mL'lik steril falkon tüplere 10'ar mL büyüme besiyeri içerecek şekilde konulmuştur. "Negatif kontrol" olarak etiketlenen 50 mL'lik steril falkon tüpüne de 5 mL büyüme besiyeri eklenmiştir. -20 °C'den çıkarılan bakteri tüpleri oda sıcaklığına çözünmeye bırakılmış ve ampisilin çözeltisinden % 0,1 oranında (10 µL) eklenmiştir. -80 °C'de saklanan bakteri kültürleri oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve üzerlerine 200 µL büyüme besiyeri ilave edilmiştir. Yarı katı pellet halindeki bakteriler steril pipet ucu ile mekanik olarak homojen hale getirilip bu karışımların 25 µL'si ampisilinli büyüme besiyeri içeren etiketlenmiş falkon tüplere ilave edilmiştir. Falkon tüpler inkübatörde 37 °C'de ve 250 rpm'de 14 - 16 saat çalkalanarak inkübe edildikten sonra bir gecelik kültürlerin OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunun en az 2,0 ve negatif kontrolün ise ≤ 0,05 olması gerekmektedir.

2.5.7.6 Bakteri kültürlerinin test maddesine maruziyeti:

Test maddesinin sitotoksik konsantrasyonunun belirlenmesi: Ames testine başlamadan önce, tayin edilecek örneğin test ortamındaki çözünürlüğü ve çalışılacak konsantrasyon aralığının bakteri suşu üzerine sitotoksik etkisi ön deneyle incelenmiştir. Test prosedürün de olduğu gibi, öncelikle 96 kuyucuklu mikropalakada test maddesi için seyreltme işlemi yapılmıştır ve 24 kuyucuklu maruziyet mikropalacasına aktarılmıştır. Maruziyet besiyeri ve bir gecelik bakteri kültürü eklendikten sonra 37 °C ve 250 rpm’de 90 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar incelendiğinde bulanık olan kuyucuklar sitotoksik etkisi olmayan dozları berrak olan kuyucuklar ise yüksek sitotoksik etkili olan dozları göstermiştir. Buna göre yapılan inceleme sonrasında sitotoksikite gösteren en düşük doz, testte kullanılan en yüksek konsantrasyon olarak seçilmiştir.

Test maddesinin stok çözeltilerden gerekli seyreltilmelerin yapılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda mikropalaca kuyucuğundaki test maddesi 25 kat oranında seyrelceğinden test maddesinin deneydeki en yüksek konsantrasyonunun 25 kat konsantre çözeltisi hazırlanmıştır. Test maddesinin 96 kuyucuklu seyreltme mikropalacasından 24 kuyucuklu maruziyet mikropalacasına aktarılması işlemi gerçekleştirilmiş ve hazırlanan tüm 24 kuyucuklu maruziyet plakaları 37°C ve 250 rpm’de 90 dakika çalkanarak inkübasyona bırakılmışlardır.

2.2.5.7 Mutajenik aktivitenin tespiti: 90 dakikalık inkübasyonun ardından inkübatörden çıkarılan 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakalarının her bir kuyucuğuna 2,8 mL indikatör besiyeri eklenmiştir. 24 kuyucuklu maruziyet mikropalacasındaki maruziyet kültürlerinin 384 kuyucuklu mikropalakaya aktarılması işlemi yapılmış ve bu plakalar kilitlenebilir plastik poşet içerisine dikkatlice yerleştirilmiş ve 37 °C’lik inkübatörde 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2. günün sonunda inkübatörden çıkartılan mikropalakalar sayım için hazırlanmıştır.

Karşılaştırma “Student-T Testi” ile yapılmış ve $p \leq 0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilerek değerlendirilmiştir. Test sonunda elde edilen veriler Xenometrix firması tarafından düzenlenen excel formatına aktarılıp değerlendirilmiştir.

2.5.8 *In vivo* protektif etkilerin belirlenmesi (Mikronukleus (MN) ve kromozom aberrasyon (KA) yöntemi):

2.5.8.1 Mikronuklues yöntemi:

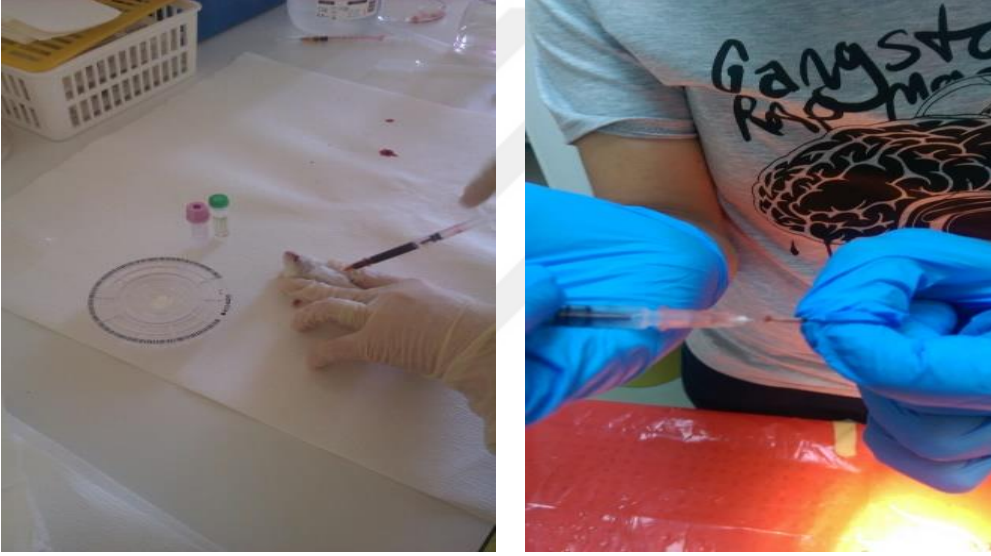
Bu yöntem *in vivo* ve *in vitro* kimyasalların genotoksisitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem *in vivo*'da genellikle farelerin olgunlaşmamış kemik iliği eritrositleri kullanılarak değerlendirilmektedir (Sato ve Tomita, 2001). MN yöntemiyle klastojenlerin çalışılması sonucunda;

En az bir dozun tek bir uygulamasından 24-48 saat sonra incelenmesi, kimyasalların mutajenitesinin değerlendirilmesi için yeterli bulunabilir. Bu bilgiler ışığından OECD 474 prosedürüne 12 haftalık farelerin aşağıdaki şekilde gruplandırılması amaçlanmıştır.

- **Gruplar (36 ♀ ve 36 ♂ Balb-c):**
 - Grup 1: Kontrol (distile su) (n=12)
 - Grup 2: *H.scoparia* 900 mg/kg (n=12)
 - Grup 3: *H.scoparia* 300 mg/kg + Cd 4 mg/kg (n=12)
 - Grup 4: *H.scoparia* 600 mg/kg + Cd 4 mg/kg (n=12)
 - Grup 5: *H.scoparia* 900 mg/kg + Cd 4 mg/kg (n=12)
 - Grup 6: Cd 4 mg/kg (n=12)

H. scoparia'nın 300, 600 ve 900 mg/kg'lık konsantrasyonları ve kadmiyum (Cd) oral 1.5 mg/kg olacak şekilde 21 gün boyunca verilmiş, negatif kontrol grubuna ise distile su gram başına 0.01 ml gelecek şekilde verilmiştir. 21. günde hayvanlardan interkardiyak olarak kanlar alındıktan sonra, servikal dislokasyonla öldürülüp, örneklerin arka ayak tibia ve femur kemik ilikleri 1 ml fetal calf serum ile çıkarılmıştır (Şekil 2.7). Tüpe alınan kemik iliği hücrelerinin pipetaj işlemiyle birbirinden ayrılması sağlanmıştır. İçinde kemik iliği bulunan tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, altta biriken kemik iliği hücrelerine zarar vermeden üstte biriken süpernatant atılmıştır. Altta kalan hücrelere pipetaj yapıldıktan sonra sonra, temiz lamın

üzerine bir damla solüsyon damlatılıp, bir başka lamla aralarında 45°'lik açı olacak şekilde bu damlanın yayılması sağlanmıştır. Preparatlar en az 1 gece kuruduktan sonra, saf metanolde fikse edilmiştir. Bir gece kurutulan preparatlar Sörensen fosfat tamponunda (pH 6.8) hazırlanmış % 10'luk giemsa ile 10 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra distile suda çalkalanmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Hazırlanan preparatlarda, her bir hayvan için 1000 eritrosit sayılarak, Preparatlar küçük değişiklikler yapılarak Schmid (1975) ve Aaron'nun et al., (1989) tanımladığı gibi MN'lu hücreler belirlenmiştir.



Şekil 2.7 Deney hayvanlarından kemik iliğinin çıkarılma işlemi

2.5.8.2 Kromozom aberasyon yöntemi:

H. scoparia'nın 300, 600 ve 900 mg/kg'lık konsantrasyonları ve kadmiyum (Cd) oral 1.5 mg/kg olacak şekilde 21 gün boyunca verilmiş, negatif kontrol grubuna ise distile su gram başına 0.01 ml gelecek şekilde verilmiştir. Hayvanlar ötenazi yapılmadan 3 saat önce hücreleri metafaz plağında durdurmak için 1 mg/kg kolşisin i.p. olarak uygulanmıştır. Süre sonunda hayvanlar servikal dislokasyonla ötenazi yapılmış ve arka ayaklarındaki femur kemikleri serum fizyolojik yardımıyla çıkarılmıştır. Tüpe alınan örnekler pipetaj yapıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üstte biriken süpernatant atılmıştır. Dipte kalan pelletin üzerine taze olarak hazırlanmış 0,075 M KCl eklenerek

37°C’lik etüvde 25 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant tekrar atılmıştır. Dipte kalan pellete taze hazırlanmış Carnoy fiksatifinden (3:1 Metanol/Asetik Asit) 5 ml ilave edilip pipetaj yapılmıştır. Daha sonra hücreler beyazlaşınca kadar santrifüj ve fiksatif işlemi 3-4 kez daha tekrarlanır. en son işlemde dipte kalan pelletin üzerine 2-3 ml fiksatif ilave edilip süspansiyon hazırlanmıştır. Numaralandırılması yapılan lamalar metanolla iyice temizlendikten sonra içinde distile su bulunan cam jar içinde +4 °C’ de bekletilmiştir.

Hazırlanan fiksatif-hücre süspansiyonundan, soluk ve ıslak lamalar üzerine 1-2 damla, yaklaşık 20 cm. yükseklikten hızlı bir şekilde damlatılarak yayılması sağlanmış ve daha sonra örnekler oda ısısında kurutulmaya bırakılmıştır. Her hayvan için 5 preparat hazırlanmıştır. Lamalar hidrolize edildikten sonra Giemsa boyasında 7 dk boyanmıştır.

2.6. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmadaki istatistiksel değerlendirmeler SPSS for Windows 10.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Deney sonunda bütün gruptaki farelere ait total ağırlıkları hesaplanarak, sonuçlar varyans analizi (One-Way ANOVA) ile kontrole göre karşılaştırılmıştır. İstatistiksel açıdan önem kontrolü $p < 0,05$ seviyelerinde, kontrol grubu ile uygulama grupları arasında yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Kuru Örneklerin Ekstraksiyon Verimi

Alg örneklerinin ekstraksiyon sonrası ürün verimi Çizelge 3.1’de görülmektedir. Sırasıyla *G.gracilis* ve *H.scoparia* metanol ekstrelerinde de en fazla verim gözlenirken, en az verim *H.scoparia*-Hex ile *E.linza*-Hex örneklerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1 Alg örneklerinden ekstraksiyon sonrası elde edilen miktarlar

Herbaryum numarası	Alg örnekleri	Kuru ağırlık (gr.)	Ekstraksiyon sonrası ağırlık (mg.)		
			Hex	Chl	Met
40797	<i>H.scoparia</i>	108	166 (%0,15)	228 (%0,21)	3902 (%3,6)
40798	<i>E. linza</i>	86	194 (%0,23)	195 (%0,22)	927 (%1,1)
40799	<i>G.gracilis</i>	98	258 (%0,26)	239 (%0,24)	2504 (%2,6)

3.2. Alg Ekstrelerinin İçerik Tayini

3.2.1. Total fenol ve flavonoit içerik sonuçları

Alg örneklerinin Hex, Chl ve Met ekstrelerinin toplam fenol ve flavonoit e karşılık gelen miktarları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; *H.scoparia*-Met ekstresi sırasıyla 33,20 ve 1,26 mg/g değeriyle gallik asit ve kersetine en fazla eşdeğerlik gösterirken, bunu sırasıyla *E.linza*-Met (25,58 mg GAE/g ve 0,94 mg QE/g) ve *G.gracilis*-Met (8,31 mg GAE/g ve 0,4 mg QE/g) ekstreleri izlemektedir. Bununla birlikte, *H.scoparia*-Hex ve -Chl ile *G.gracilaria*-Hex ekstrelerinde ise total fenol ve flavonoit içerik tespit edilememiştir.

Çizelge 3.2 Alg örneklerinin metanol ekstrelerinin toplam fenol ve flavonoit miktarları

Ekstre		Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g ekstre)	Toplam Flavonoit (mg QE/g ekstre)
<i>H.scoparia</i>	Hex	-	-
	Chl	-	-
	Met	<u>33,20±1,41</u>	<u>1,26±0,95</u>
<i>E.linza</i>	Hex	1,30±0,1	-
	Chl	2,34±0,1	0,17±0,05
	Met	<u>25,58±1</u>	<u>0,94±0,05</u>
<i>G.gracilis</i>	Hex	-	-
	Chl	1,42±0,1	0,23±0,105
	Met	<u>8,31±0,12</u>	<u>0,4±0,1</u>

3.2.2. HPLC yöntemi ile içerik Tayini

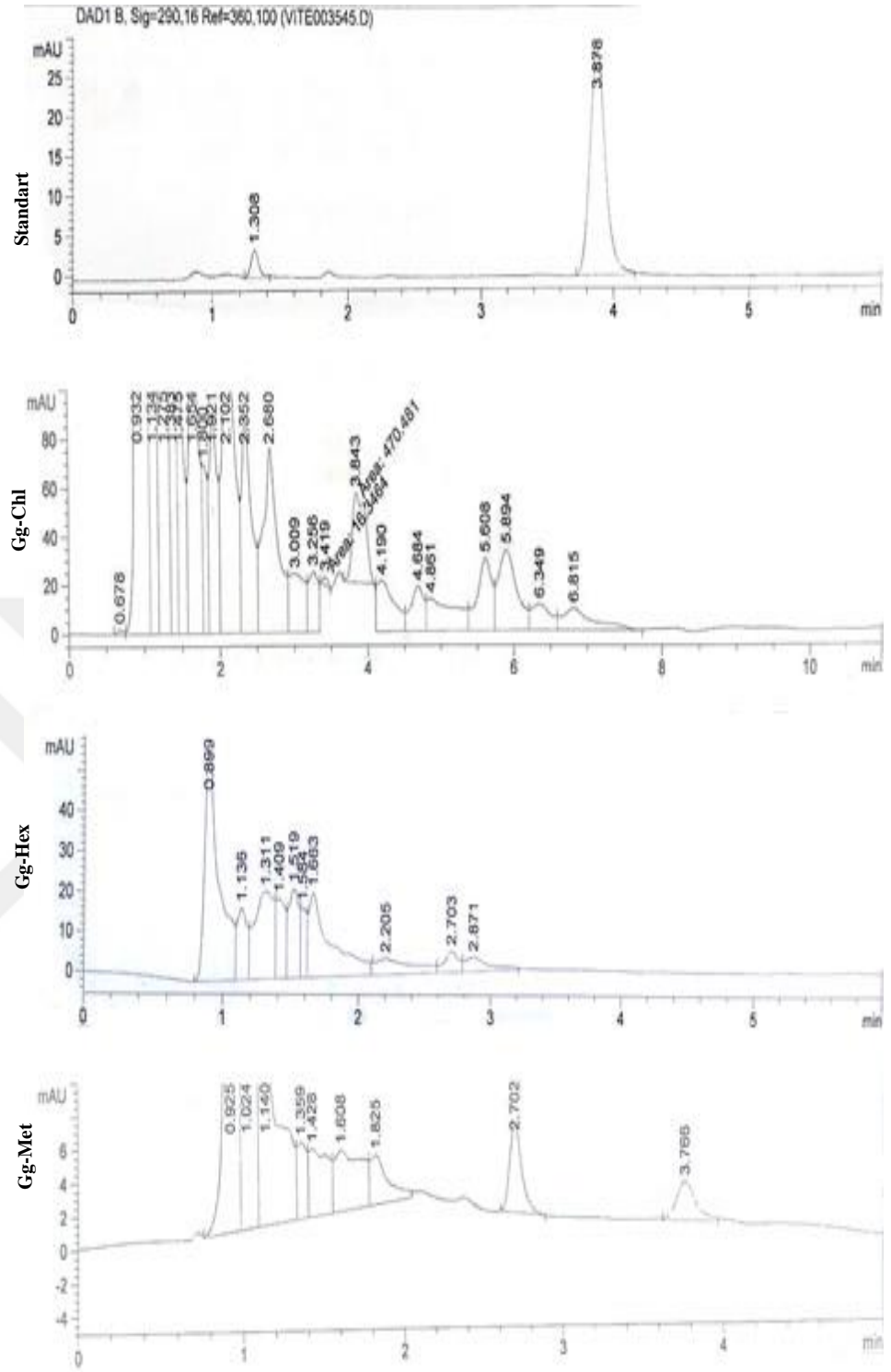
Alg örneklerine ait içerik analizleri α -tokoferol, gallik asit, kafeik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit ve kersetin gibi fenol ve flavonoit_ asit standartları kullanılarak belirlenmiştir. α -tokoferol standardı Şekil 3.1 ve Çizelge 3.3 görüldüğü üzere α - tokoferol standardı sadece *G.gracilis* örneklerinde tespit edilmiştir. Bu sonuca göre, Gg-Met 2,595 mg/100g ekstre değeriyle en yüksek içeriğe sahip olurken, Gg-Chl örneği 0,54 mg/100g ekstre oranında içerik tespit edilmiştir. Şekil 3.2 ve Çizelge 3.4 incelendiğinde, Hs-Hex örneğinde kafeik (0,036 mg/100g ekstre), p-kumarik asit (0,017 mg/100g ekstre) ve kersetin (0,41 mg/100g ekstre) içerikleri tespit edilirken, Hs-Chl örneklerinde sadece 0,13mg/100g ekstre p-kumarik asit bulunmuştur. El-Chl örnekleri incelendiğinde ise, kumarik asit (0,043 mg/100g ekstre) ve kersetin (0,23 mg/100g ekstre) içerikleri tespit edilirken, Hs-Met'de sadece gallik asit (0,11 mg/100g ekstre) belirlenmiştir. Gg-Chl, El-Hex, El-Met, Gg-Hex ve Gg-Met örneklerinde ise elde mevcut bulunan standart bileşikler tespit edilememiştir (şekil 3.3).

Çizelge 3.3 Hex ekstrelerine ait α - tokoferol alıkonma ve alan dağılımları

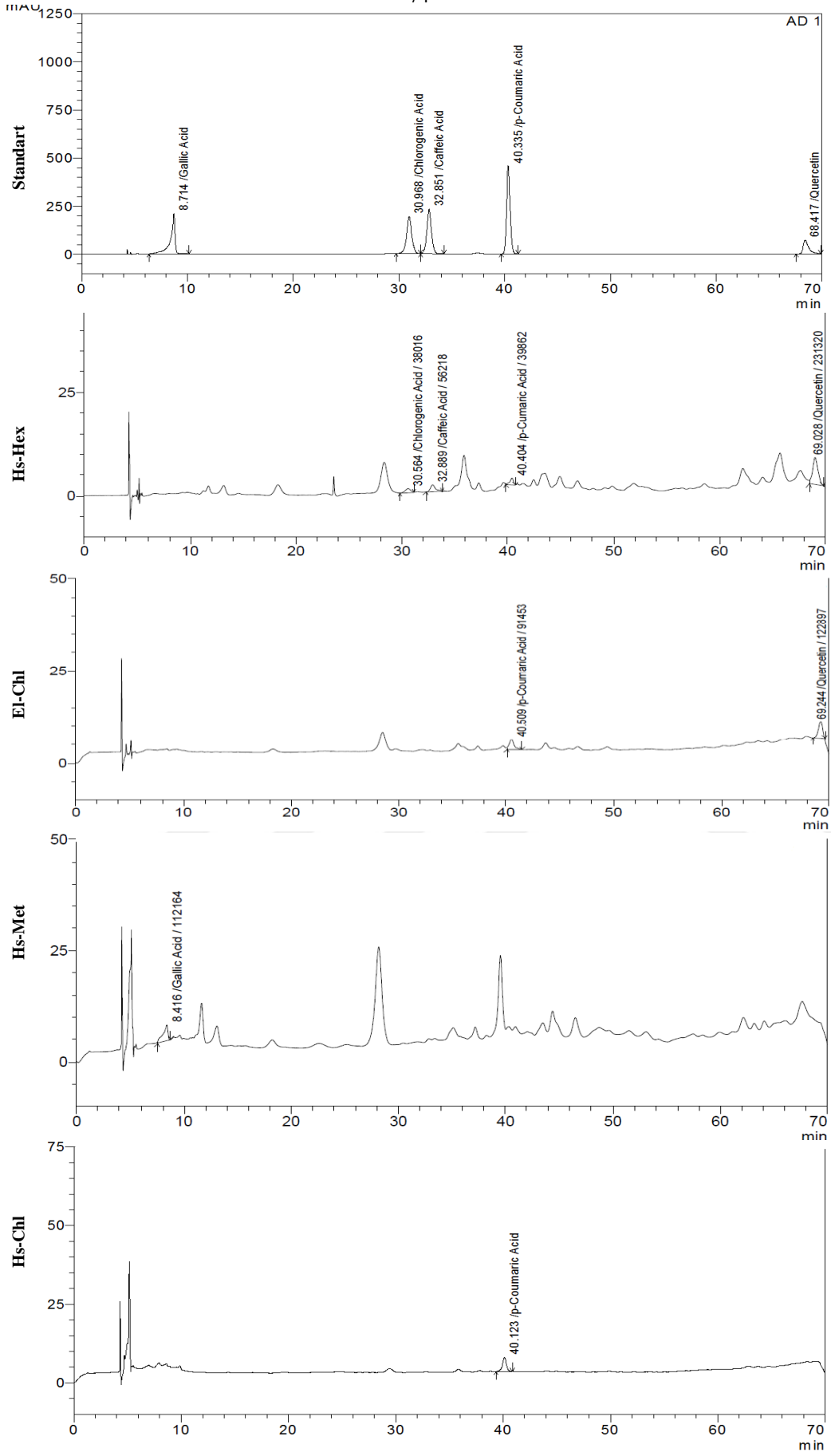
Örnek	Alıkonma Zamanı (dakika)	Area	Alan (%)	Miktar (mg/100g ekstre)
α - tokoferol	3,876	235,97556	79,2636	
Gg-Chl	3,843	446,01825	3,0270	0,54
Gg-Hex	-	-	-	
Gg-Met	3,767	20,46934	3,8845	2,595

Çizelge 3.4 Alg ekstrelerinde yer alan bileşiklerin alıkonma ve alan dağılımları

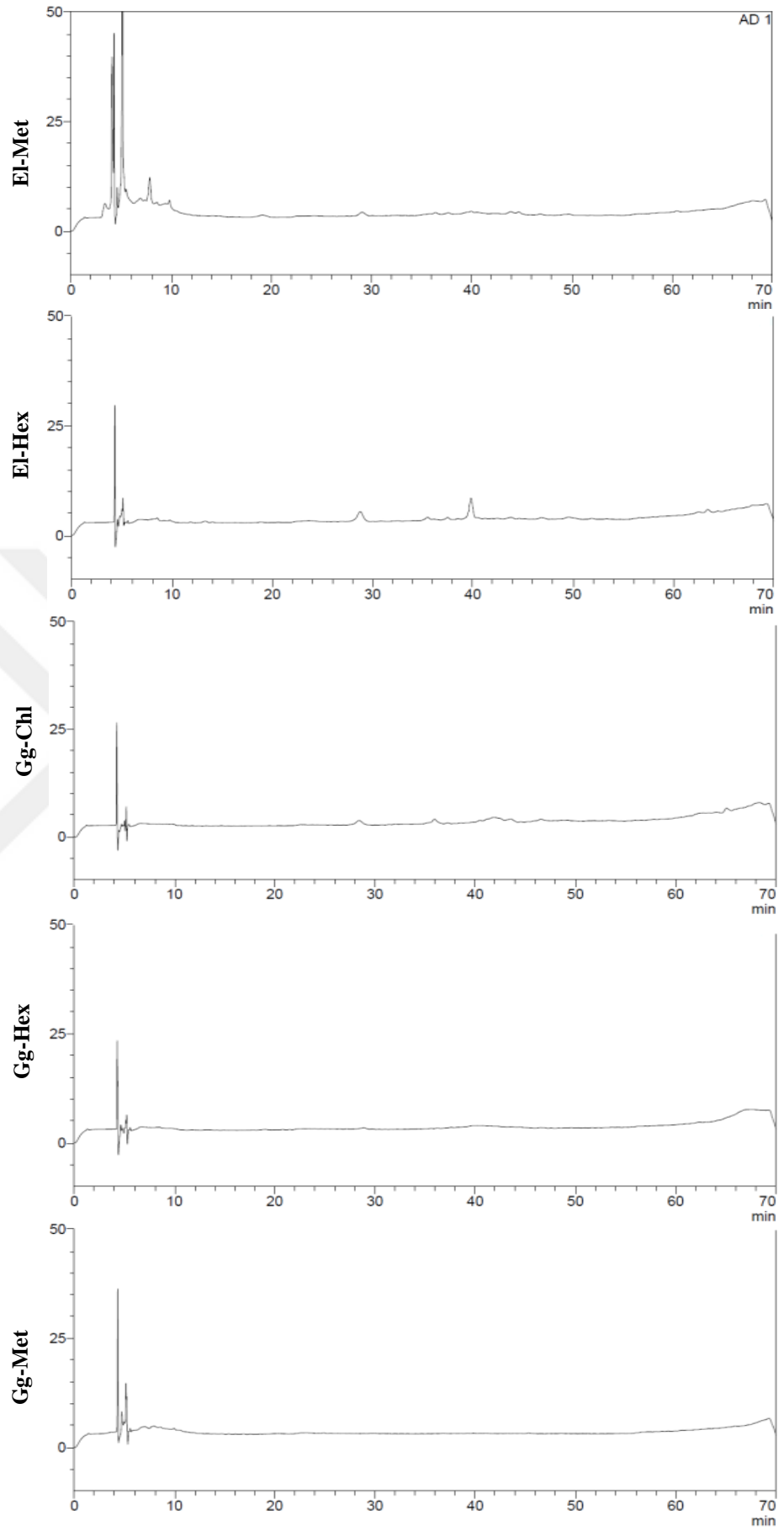
Örnek	İçerikte Yer Alan Bazı Bileşikler	Alıkonma Zamanı (dakika)	Alan	Yükseklik	Miktar (mg/100g ekstre)
Standart	Gallik Asid	8.714	5976635	209309	
	KlorojenikAsid	30.968	6554130	191786	
	Kafeik Asid	32.851	6974364	231379	
	p-KumarikAsid	40.335	10418827	456124	
	Kersetin	68.417	2579867	71196	
El-Chl	p-KumarikAsid	40.509	91453	2804	0,043
	Kersetin	69.244	122897	4547	0,23
Hs-Met	Gallik Asid	8.416	112164	3563	0,11
Hs-Chl	p-KumarikAsid	40.123	115136	4468	0,13
Hs-Hex	KlorojenikAsid	30.564	38016	1007	0,32
	Kafeik Asid	32.889	56218	1692	0,036
	p-Cumaric Asid	40.404	39862	1644	0,017
	Kersetin	69.028	231320	6544	0,41



Şekil 3.1 *Gracilaria gracilis* ekstralarının α - tokoferol'a karşı içerik analizleri



Şekil 3.2. Farklı alg ekstrlerinin HPLC içerik analizleri

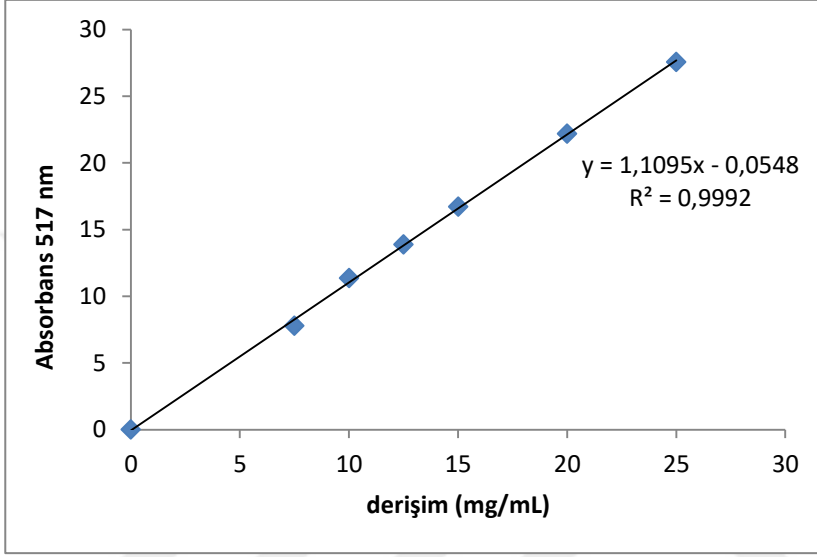


Şekil 3.3. İçerik tespiti yapılamayan alg ekstraktları

3.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları

3.3.1. DPPH aktivite sonuçları

Deney sırasında öncelikle DPPH serbest radikal çözeltisinin standart eğrisi oluşturulmuştur. Şekil 3.4’de DPPH radikal süpürme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği verilmiştir.



Şekil 3.4. DPPH serbest radikal çözeltisinin kalibrasyon grafiği

Her bir örnek için ortamdaki DPPH serbest radikallerinin inhibe edilen yüzde miktarı ve ED₅₀ (başlangıçtaki DPPH radikallerinin %50'sini süpürmek için gereken ekstrem miktarı) miktarları çizelge 3.5’de verilmiştir. ED₅₀ değeri ne kadar düşükse antioksidan etki de o kadar yüksek kabul edilmektedir. Çizelge 3.7 incelendiğinde, özellikle *G.gracilis*-Hex ekstrelerinin yüksek oranda inhibisyon gösterdiği; bunu takiben tüm örneklerin Gg-Hex> El-Met> Hs-Hex> Gg-Met> Hs-Chl> El-Chl> Gg-Chl> Hs-Met sırasıyla aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5 Algerin ortamdaki DPPH serbest radikallerinin % inhibisyon oranları

Örnek	Konsantrasyon (mg/mL)	%DPPH inhibisyon	α -tokoferol ekivalen değeri (ug/ml)	ED ₅₀ (mg/ml)	
H.scoparia	Hex	0,25	4.11±0,04	3.72±0,01	<u>14.0963</u>
		0,5	4.67±0,02	4.22±0,02	
		1	7.89±0,01	7.13±0,01	
	Chl	0,25	3.27±0,02	4.54±0,01	15.1228
		0,5	4.13±0,06	3.96±0,02	
		1	8.96±0,04	9.08±0,02	
	Met	0,25	5.11±0,02	5.72±0,03	400.332
		0,5	7.67±0,05	8.22±0,03	
		1	10.89±0,04	12.13±0,05	
E.linza	Hex	-	-	-	-
		-	-	-	
		-	-	-	
	Chl	0,25	5.75±0,04	4.33±0,03	221.33
		0,5	6.43±0,06	7.62±0,02	
		1	11.28±0,01	10.29±0,4	
	Met	0,25	0.11±0,03	0.99±0,01	<u>13.1733</u>
		0,5	1.89±0,03	1.71±0,01	
		1	3.67±0,02	3.32±0,01	
G.gracilis	Hex	0,25	2.09±0,02	1.89±0,02	<u>6.9439</u>
		0,5	4.82±0,04	4.36±0,02	
		1	11.56±0,02	10.45±0,03	
	Chl	0,25	6.58±0,01	5.94±0,05	224.9394
		0,5	10.11±0,05	9.14±0,05	
		1	11.56±0,01	10.45±0,06	
	Met	0,25	4.12±0,04	3.72±0,02	15.0093
		0,5	7.56±0,02	6.83±0,01	
		1	12.46±0,01	11.26±0,02	

3.3.2. ABTS⁺ aktivite sonuçları

Alg örneklerinden elde edilen hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri ABTS⁺ radikalinin hızlı ve etkili temizleyicileri olarak önemli derecede farklı aktivite göstermiştir. Çizelge 3.6'de gösterildiği üzere, alg türleri içerisinde ABTS⁺ aktivitesi en yüksek olan ekstre 0.25 mg/ml konsantrasyonda çalışılan Hs-Met'de tespit edilmiştir. Bunu 1 mg/ml konsantrasyonda çalışılan Gg-Met ve El-Met örnekleri takip etmiştir. Aynı zamanda hem çözücü ekstrelerinde hem de standart olarak kullanılan troloks ile yapılan çalışmada artan konsantrasyonlarda ABTS⁺ aktivitesinin de arttığı görülmüştür.

Çizelge 3.6 Alg ekstrelerinin ABTS⁺ serbest radikallerinin % inhibisyon oranları

Örnek	Ekstre (1 mg/ ml)	ABTS ⁺ % İnhibisyon
H.scoparia	Hex	63.93±0,31
	Chl	57.45±0,12
	Met (0.25 mg/ml)	<u>61.01±0,9</u>
E.linza	Hex	-
	Met.	<u>81.19±0,11</u>
	Chl	24.41±0,10
G.gracilis	Hex	-
	Chl	70.35±0,2
	Met	<u>89.72±0,09</u>

3.4. Antimikrobiyal Aktivite

Alg ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri 4-512 µg/ml doz aralığında gram negatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Salmonella typhimurium*) ve gram pozitif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus epidermidis*) bakteri suşları kullanılarak değerlendirilmiş ve gentamisin kontrol olarak kullanılmıştır. Çizelge 3.7'e bakıldığında Hs-Met ekstraları *B.cereus* ve *S.aureus*'ya karşı, Hs-Chl ekstraları *B.cereus* ve *E.faecalis* karşı düşük konsantrasyonlarda (64 µg/mL) etkili olurken, Hs-Hex ekstraları *Bacillus cereus* ve *E. faecalis*'e karşı orta dereceli antimikrobiyal etkili olduğu gözlemlenmiştir. *E.linza* ekstralarının değerlendirildiği Çizelge 3.8'e göre, El-Met ekstraları *Bacillus cereus*, *S.aureus* ve *E.faecalis* 64 µg/mL'da büyümeyi inhibe ederken, El-Chl ve El-Hex ekstraları gram pozitif bakteri suşlarına orta derecede etki göstermiştir. Kırmızı alg *G.gracilis* ekstraları incelendiğinde, yalnızca *B.cereus* bakterilerini 64 µg/mL konsantrasyonda inhibe ederken *S.aureus* ve *E.faecalis* orta dereceli aktiviteler görülürken, -Chl ve -Hex örneklerinde orta ve düşük dereceli etkiler tespit edilmiştir (Çizelge 3.9). *H.scoparia*, *E.linza* ve *G.gracilis* ekstralarının gram pozitif bakterilere karşı daha etkili inhibisyonlara sahipken, gram negatif bakterilerin büyüme inhibisyonunda düşük etkili oldukları ortaya konulmuştur.

Çizelge 3.7. *Halopteris scoparia*'nın antimikrobiyal aktivite sonuçları

Microorganisms	MIC (µg/ml)			
	Hex	Chl	Met	Gentamycin
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23999	256	256	256	1.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 2318	256	256	256	1.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256	256	256	1.0
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5445	256	256	256	1.0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	64	128	64	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/P	64	256	256	4.0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	128	128	64	16.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	256	256	256	2.0

Çizelge 3.8. *Enteromorpha linza* 'nın antimikrobiyal aktivite sonuçları

Microorganisms	MIC (µg/ml)			
	Hex	Chl	Met	Gentamycin
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23999	256	256	256	1.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 2318	256	256	256	1.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256	256	512	1.0
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5445	256	256	256	1.0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	64	256	128	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/P	64	256	256	4.0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	64	128	128	16.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	256	256	256	2.0

Çizelge 3.9 *Gracilaria gracilis* 'in antimikrobiyal aktivite sonuçları

Microorganisms	MIC (µg/ml)			
	Hex	Chl	Met	Gentamycin
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23999	256	256	256	1.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 2318	512	256	256	1.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256	256	256	1.0
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5445	256	256	256	1.0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	64	256	128	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/P	128	128	256	4.0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	128	256	128	16.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	256	256	256	2.0

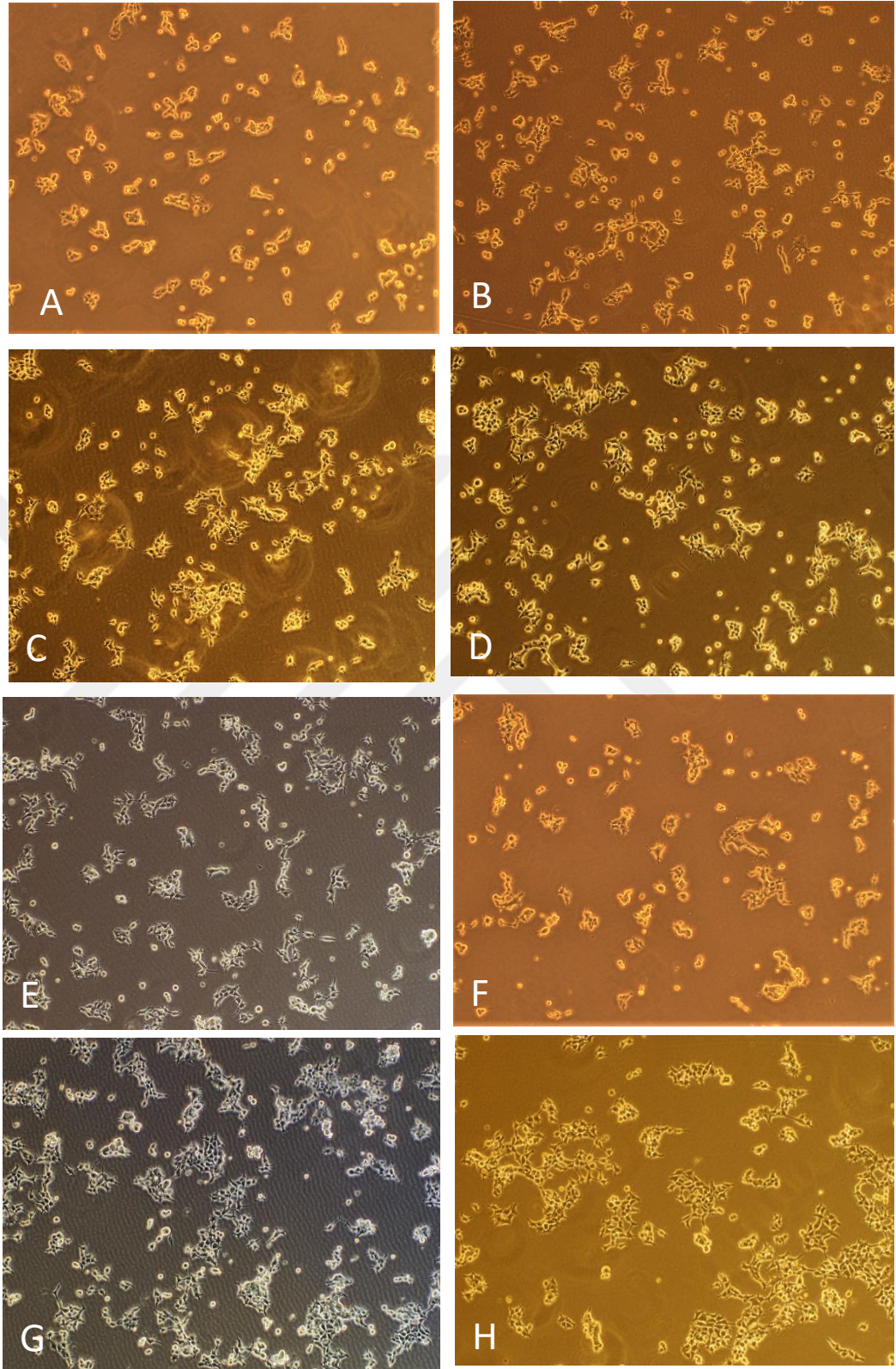
3.5. Antikanser Aktivite Sonuçlar

3.5.1. Sitotoksikite sonuçları

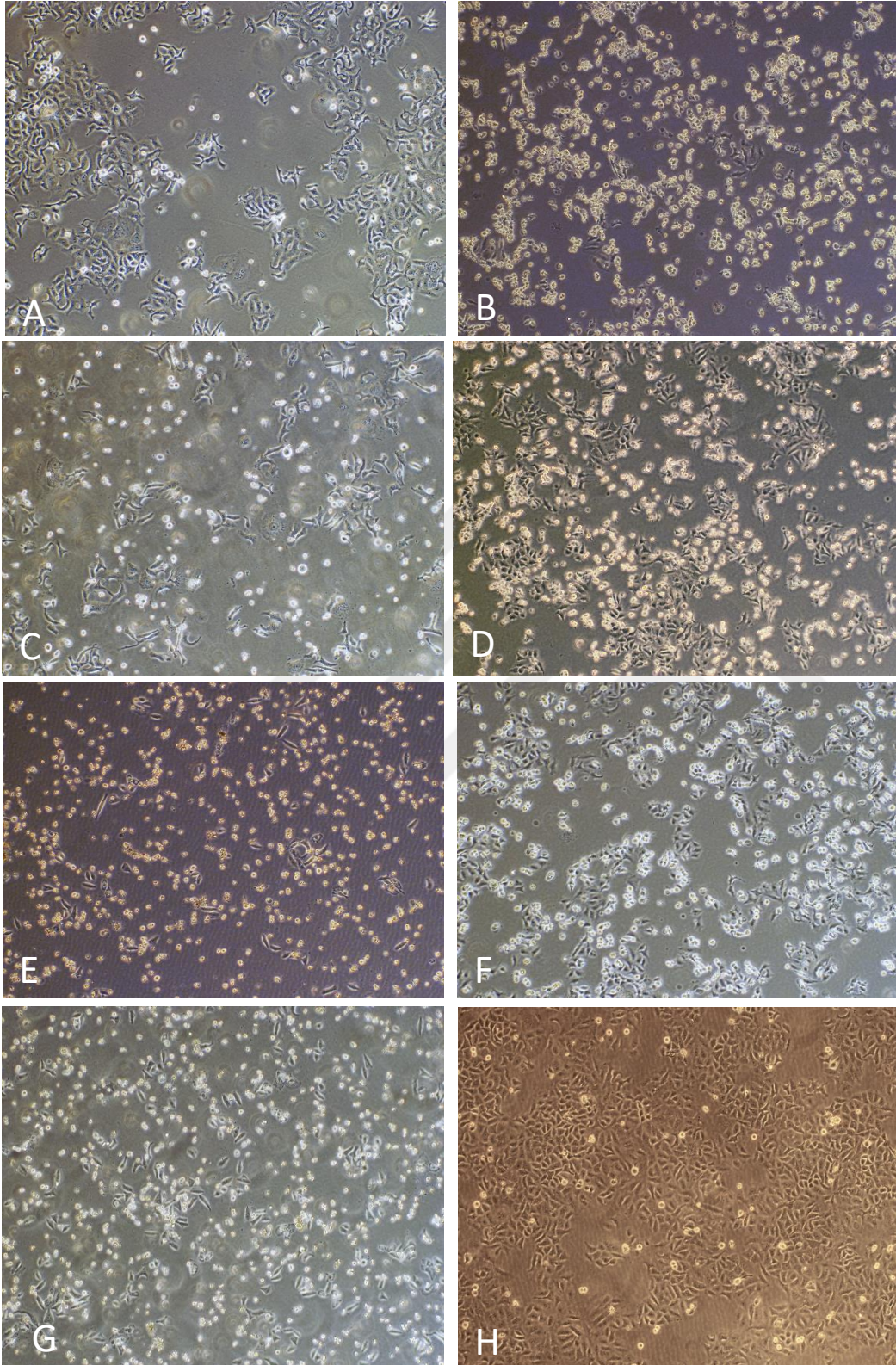
Çalışmada *H.scoparia*, *E.linza* ve *G.gracilis* alglerinin hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Her üç test maddesinin de kanser hücre hatları (U-87-MG, MCF-7, CaCo-2 ve HeLa) ve normal hücre hattı HEK üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi aracılığı ile hücrelerin %50'sinin çoğalmasını inhibe eden konsantrasyon olarak tanımlanan IC₅₀ değeri hesaplanarak belirlenmiştir. Madde maruziyetine bağlı olarak her kanser hücre hattı tipinde gözlemlenen IC₅₀ değerleri farklılıklar göstermiştir (Çizelge 3.10). Alg örneklerinin en etkili olduğu hücre hattı HeLa olarak tespit edilirken, ekstralar U-87-MG hücre hatlarında hesaplanabilir bir IC₅₀ değeri oluşturmamıştır. HeLa hücreleri incelendiğinde, kahverengi alg *Hs-Met* ekstresi en etkili inhibisyonu gösterirken (6.5 µg/mL) bunu *Hs-Chl* (7.6 µg/mL) ve *Hs-Hex* (12.2 µg/mL) örnekleri izlemektedir. Yeşil alg ekstralarında, *Chl* (27.6 µg/mL) ve *Hex* (22 µg/mL) ekstraları birbirlerine yakın bir değerde proliferasyonu inhibe ederken, kırmızı alglerde *Met* (13.3 µg/mL) ekstresi *Hex*'den (22.4 µg/mL) daha düşük konsantrasyonlarda etkili olmuştur. MCF-7 kanser hücre hatları incelendiğinde sadece *Hs-Met* (26.8 µg/mL), *Hs-Chl* (13 µg/mL) ve *El-Chl* (20.2 µg/mL) ekstralarında güçlü bir IC₅₀ değeri oluşurken, diğer ekstralarda hesaplanabilir bir inhibisyon etkisi kaydedilememiştir. CaCo-2 hücre hatları incelendiğinde ise benzer etkinlikler kaydedilmiş olup kahverengi alg *Hs-Hex* ekstresi 4.53 µg/mL değeriyle *Hs-Met*'den daha etkili olurken, yeşil alg ekstralarında özellikle *El-Chl* 1.7 µg/mL yüksek inhibisyon değeriyle *El-Hex*'den daha iyi etkinlik göstermiştir (16 µg/mL). Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8 incelendiğinde bu bilgileri doğrular nitelikte sonuçlara ulaşılmaktadır. *Hex*, *Chl* ve *Met* ekstralarının HEK 293 sağlıklı hücre hatlarına uygulanması sonucunda hücreler çokgen şekilli, sağlıklı bir görünüme sahip ve normal hücre büyümesini sürdürürken, ekstre uygulamaları sonrası kanser hücrelerinin, kültür plakalarına yapışma yeteneğini kaybedip yuvarlak şekil alarak canlılıklarını sürdüremedikleri gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.10 *H.scoparia*, *E.linza* ve *G.gracilis* alglerinin Hex, Chl ve Met ekstralarının hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri (µg/mL).

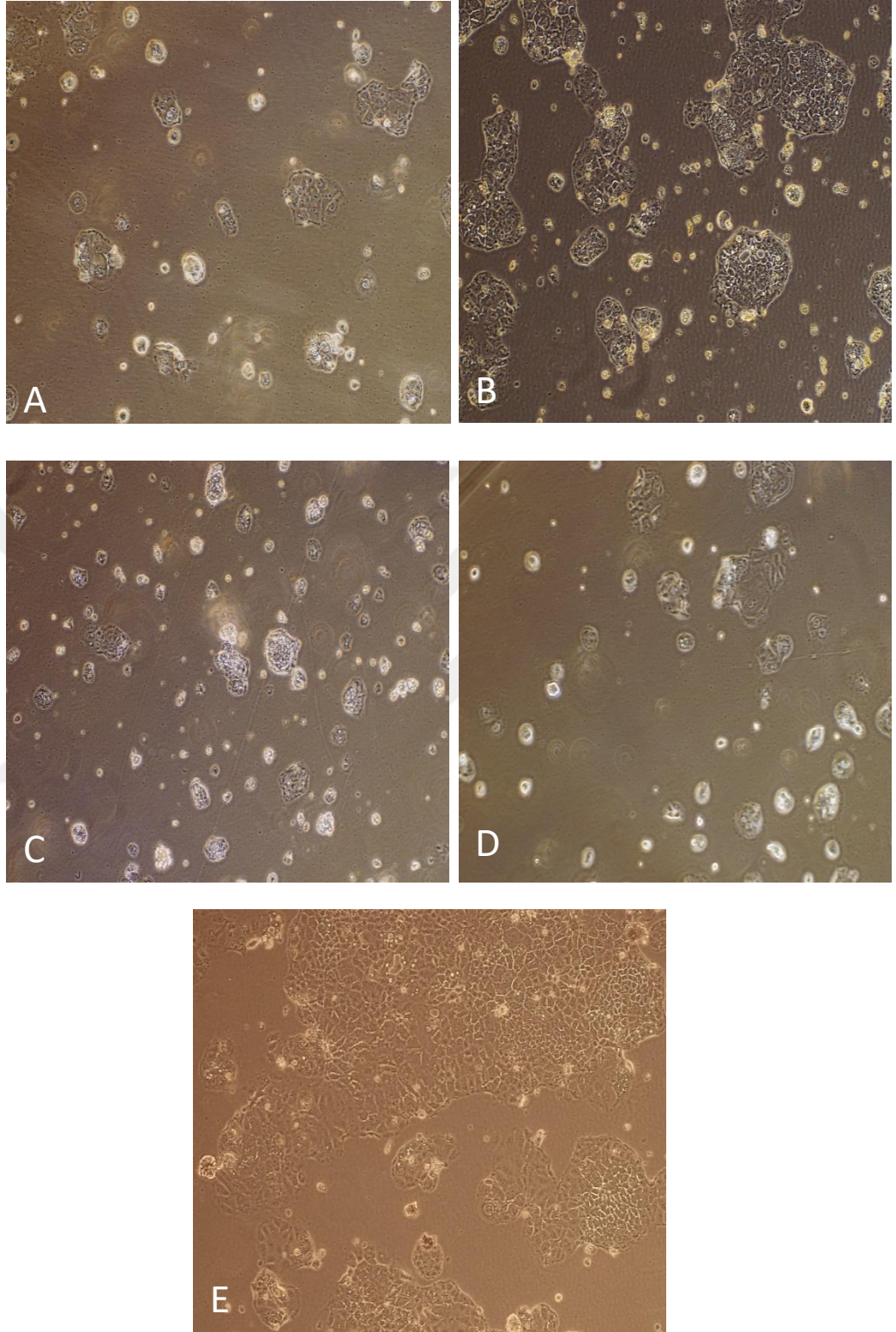
ÖRNEK	HeLa	MCF7	CaCo2	U87MG	HEK293	
<i>H.scoparia</i>	Hex	12.2±0.12	>50	<u>4.53±0.12</u>	>50	26±0.14
	Chl	7.6±0.08	<u>13±0.11</u>	>50	>50	12±0.13
	Met	<u>6.5±0.10</u>	26.8±0.13	22±0.11	>50	2,5±0.05
<i>E.linza</i>	Hex	22±0.13	>50	<u>16±0.08</u>	>50	15,52±0.12
	Chl	27.6±0.14	20.2±0.11	1.7±0.05	>50	22±0.11
	Met	>50	>50	>50	>50	>50
<i>G.gracilis</i>	Hex	22.4±0.14	>50	>50	>50	>50
	Chl	>50	>50	>50	>50	>50
	Met	<u>13.3±0.12</u>	>50	>50	>50	25±0.11



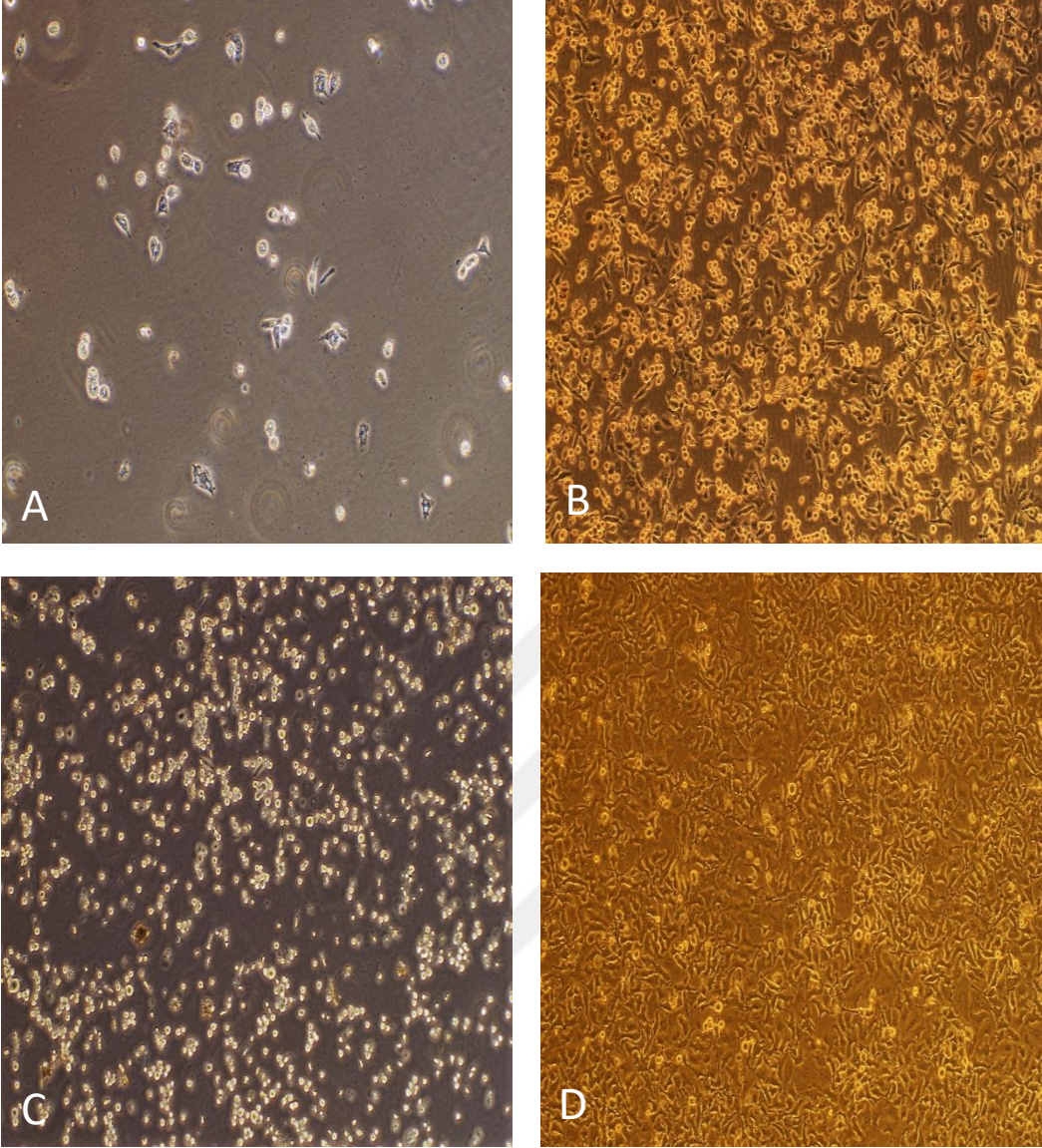
Şekil 3.5 HEK 293 hücre hatlarında alg ekstralarının etkileri **A**;Hs-Hex, **B**; Hs-Chl, **C**; Hs-Met, **D**; El-Hex, **E**; El-Chl; **F**; Gg-Hex, **G**; Gg-Met, **H**; DMSO kontrol.



Şekil 3.6 HeLa hücre hatlarında alg ekstrelerinin etkileri A;Hs-Hex, B; Hs-Chl, C; Hs-Met, D; El-Hex, E; El-Chl; F, Gg-Hex, G; Gg-Met, H; DMSO kontrol.



Şekil 3.7 CaCo-2 hücre hatlarında alg ekstralarının etkileri. A;Hs-Hex, B; Hs-Met, C; El-Hex, D; El-Chl; E; DMSO kontrol.



Şekil 3.8 MCF-7 hücre hatlarında alg ekstralarının etkileri A;Hs-Chl, B; Hs-Met, C; El-Chl, D;DMSO kontrol.

3.5.2. Apoptotik Potansiyel Sonuçları

3.5.2.1. Hücre hatlarından Total RNA izolasyon sonuçları

Gen ekspresyon profillerinin karşılaştırılabilir analizinin yapılabilmesi amacıyla alg örnek ekstreleri, DMSO ve hücre kontrol grupları ile birlikte her birinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA miktarları Thermo Scientific NanoDrop 2000c (Waltham, USA) cihazı ile ng/ μ L cinsinden ölçülmüştür (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11 Hücre Hatlarının Total RNA İzolasyon Sonuçları

	MADDE	HeLa	MCF7	CaCo2	HEK293
Total RNA değerleri (ng/ μ L)	Hücre Hattı Kontrol Grubu	1074,8	660,8	1588,6	395,1
	DMSO Kontrol Grubu (%0,05)	1064,4	1309,5	2800,6	2241,7
	<i>H.scoparia</i> -Hex	928, 3	-	2125,9	2394,2
	<i>H.scoparia</i> -Chl	1765,0	1432,0	-	599
	<i>H.scoparia</i> -Met	449,5	3377,0	739,7	2433,9
	<i>E.linza</i> -Hex	1850,0	-	545,1	3777,3
	<i>E.linza</i> -Chl	470,8	1955,1	545,1	2407,7
	<i>G.gracilis</i> -Hex	1937,6		-	3969,6
	<i>G.gracilis</i> -Met	2317,1		-	5317

3.5.2.2. Apoptotik gen ekspresyonunun sonuçları

LightCycler'dan elde edilen ΔCT değerleri ile 'Karşılaştırmalı CT Metodu' kullanılarak her bir hedef gen için kat değişimi (fold change) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.32). Hesaplama her bir hücre hattının kontrol grubu ile maruziyet grubu ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Analizde kullanılan aktin- β kontrol (ACTB), β -2-mikroglobulin prokürsör (B2M), gliseraldehit-3-P dehidrogenaz (GAPDH), hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT1), 60S ribozomal protein L13a (RPL13A), 16S ribozomal RNA ve 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) gibi housekeeping genlerle de hedef gen ifadesinin kontrolü sağlanmıştır ve ifadesindeki değişimin hesaplanmasında yine bu internal housekeeping kontrollerin ΔCT değerlerinden yararlanılarak normalizasyon yapılmıştır. Genlerin ekspresyondaki ≤ -2 veya ≥ 2 kat değişimleri sonucunda up veya down regülasyon ifadeleri ortaya konulmuştur. Ayrıca çalışılan insan apoptoz ilişkili genler, Human Gene Nomenclature Committee (HGNC) ve National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanlarında taranarak, her biri uygun gruplara yerleştirilmiştir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12'de, alg ekstrelerinin uygulaması sonrası kanser hücre hatlarında farklı yollar aracılığıyla yaklaşık 39 proapoptotik (Şekil 3.9) ile 20 antiapoptotik gen (Şekil 3.10) ile ilişkili anlamlı olabilecek apoptotik etkiler ifade edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.1). HeLa hücrelerinde, kahverengi alg *H.scoparia* ekstrelerinin etkinliklerine bakıldığında, Hs-Hex örneği proapoptotik TNF, FAS, FASLG, FADD, TNFRSF10A, TNFRSF10C, TNFRSF10D ve TNFRSF1A genlerini 3,45-6,8 arasındaki bir kat değişimiyle upregüle ettiği görülürken, CRADD genlerini -2,23'lük bir kat değişimiyle downregüle etmiştir. Benzer olarak, Hs-Met ekstreleri uygulamaları sonrası pek çok proapoptotik gen (TNF, FASLG, CRADD, TNFRSF10D ve TNFRSF1A) üzerinde upregüle bir etki göstermiştir. Bunlardan farklı olarak, Hs-Chl ekstrelerinde sadece TNFRSF1A ve CRADD genlerini sırasıyla 3,9 ve 4,57'lik kat artışıyla upregüle ettiği görülürken, diğer proapoptotik genlerde önemli azalmalara yol açmıştır. Yeşil alg *E.linza* etkileri incelendiğinde, El-Chl proapoptotik FADD, CRADD, TNFRSF1A ve TNFSF8 üzerinde 2,04-5,6 arasında kat artışlarına yol açarken, El-Hex proapoptotik genlerin çoğunda downregülasyonlar görülmüştür. Kırmızı alg *G.gracilaria*'da ise Gg-Hex ve Gg-Met ekstreleri, proapoptotik ekstrinsik yollar

öncüleri olan TNF ve FAS reseptörlerinde 2 kata kadar kat artışına neden olurken, özellikle Gg-Hex ekstreleri TNFRSF10A (4,19) ve TNFRSF1A (7,24) gibi zar proteinlerini önemli derece kat artışlarına neden olmuştur. CaCo-2 ve MCF-7 hücre hatları incelendiğinde, HeLa hücrelerine kıyasla ekstrelerin aynı etkinliği gösteremediği görülmüştür. CaCo-2 hücrelerinde Hs-Hex ekstreleri FAS ve TNFSF10 reseptörlerinde önemli kat artışlarına yola açarken, diğer proapoptotik genlerde azalmalar tespit edilmiştir. Benzer etkiler Hs-Met ekstrelerinde de görülmüş FASLG, TNFRSF10D ve TNFSF10 genleri dışında diğer proapoptotik genlerde kat artışları kaydedilememiştir. *E.linza* etkileri incelendiğinde ise, El-Chl ve El-Hex ekstreleri TNF ve FAS aileleri üzerinde benzer kat artışlarına yol açarken, El-Chl ayrıca proapoptotik TNFRSF1A, TNFRSF11B ve TNFSF8 genleri üzerinde de sırasıyla 1.28, 2.54 ve -3.51'lik önemli kat artışlarına neden olmuştur. MCF 7 kanser hücre hatlarında, Hs-Chl ve Hs-Met ekstreleri TNF (9.19 ve 11.21, sırasıyla) ve CRADD (14.21 ve 2.42, sırasıyla), El-Chl ekstresi ise FASLG, TNFRSF11B ve TNFSF8 üzerinde sırasıyla 2.14, 2.47 ve 27.12'lik kat artışlarına yol açarken, diğer proapoptotik genlerin downregülasyonlarına engel olamamıştır.

Alg ekstreleri uygulamaları sonrasında hücre hatlarında intrinsik yolda görevli BCL2 aile üyeleri arasında apoptotik gen ekspresyonunda önemli farklılıkların olduğu görülmüştür. HeLa hücreleri incelendiğinde, Hs-Hex (2.87-15.2 aralığında kat artışı) ve Hs-Met (2.4-12.4 aralığında kat artışı) ekstreleri, proapoptotik birçok geni upregüle ederken, antiapoptotik genler üzerinde de down regülasyonlara neden oldukları görülmüştür. Hs-Chl örneklerinde ise antiapoptotiklerdeki artışlar ve proapoptotik genlerdeki down regülasyonlar intrinsik yolda etki gösteremediklerini göstermektedir. Yeşil alg El-Hex ekstresi BAX ve BAK1 ve El-Chl ekstresi BAX genleri üzerinde kat artışlarına yol açmasına rağmen, özellikle antiapoptotik BCL2 genindeki kat artışlarının görülmesi hücrelerin direnç mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *G.gracilis* alg ekstrelerinin etkileri incelendiğinde, Gg-Hex ve Gg-Met ekstrelerinin BAX (15.5 ve 1.31), BAD (3.62 ve 5.97) ve BBC3 (1.32 ve 2.17) genlerinde kat artışlarına neden olduğu görülürken, antiapoptotik BCL2 (4.01 ve 9.49) ve MCL1 (1.47 ve 15.37) genlerinin kat artışları da dikkate değer bulunmuştur. CaCo-2 hücrelerinde intrinsik yola genleri incelendiğinde, Hs-Hex

ve Hs-Met ekstrelerinin proapoptotik genler üzerinde etkili olmadığı, El-Hex ve El-Chl ekstrelerinin ise BAX, BOK ve BAK1 gibi proapoptotik genelerde kat artışlarına yol açtıkları tespit edilmiştir. Diğer bir kanser hücre hattı MCF-7’de ise Hs-Chl ekstrelerinin hem proapoptotik üyeler üzerinde 1.58-5.45 aralığında bir kat artışına hem de antiapoptotik genler üzerinde downregülasyonlar gösterdikleri saptanmıştır. Hs-Met etkilerine bakıldığında BAK1, BOK, BID ve BIK proapoptotik genlerinde kat artışlarına yol açarken, BCL2 geni üzerinde downregülasyonlara yol açtığı görülmüştür. Yeşil alg El-Chl ekstreleri ise öz

ellikle BAD ve BOK genlerinde sırasıyla 22.63 ve 4.44’lük kat artışlarına yol açtıkları belirlenmiştir.

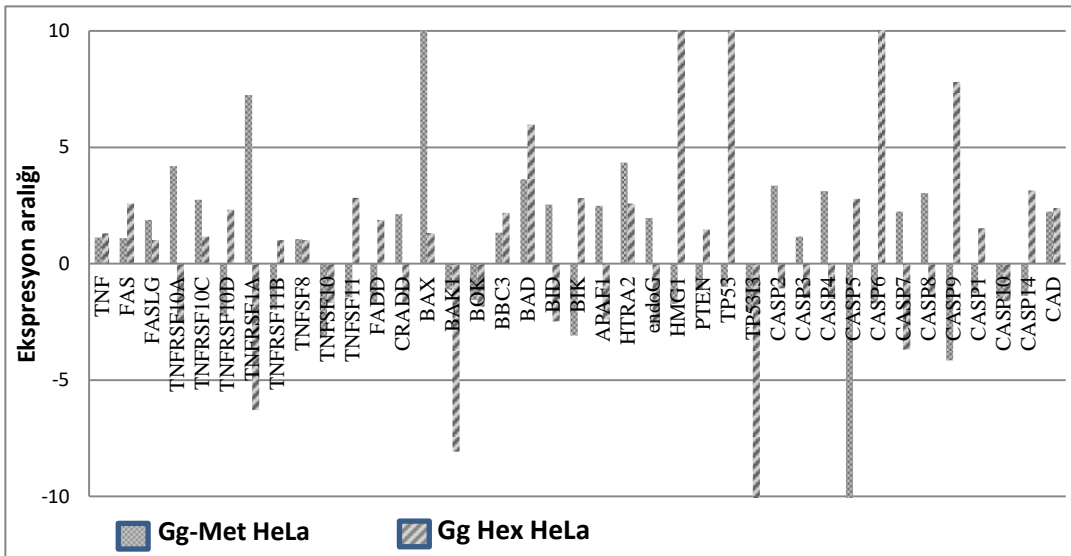
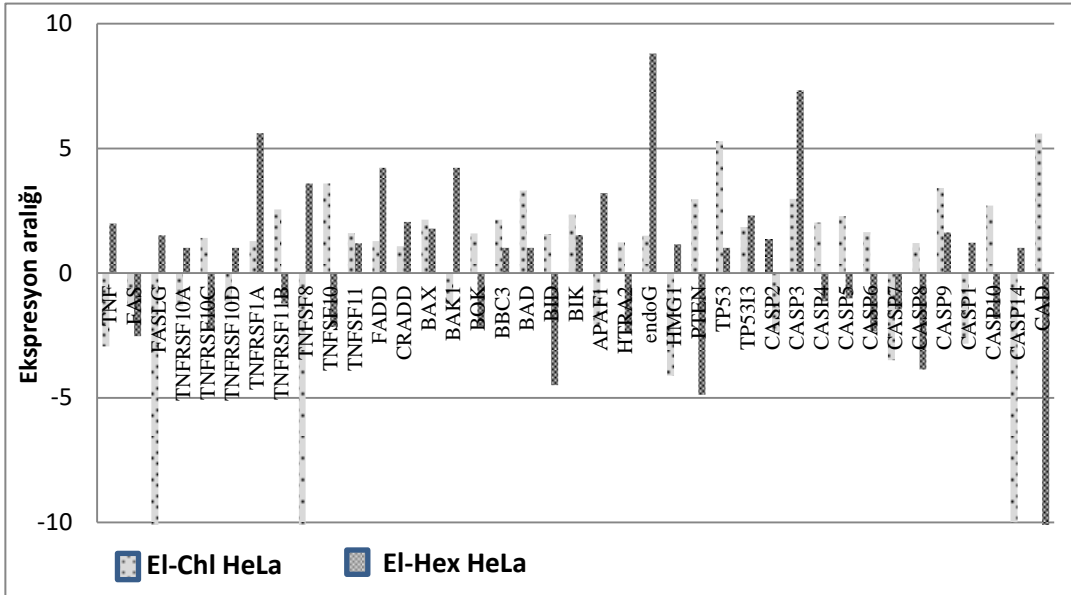
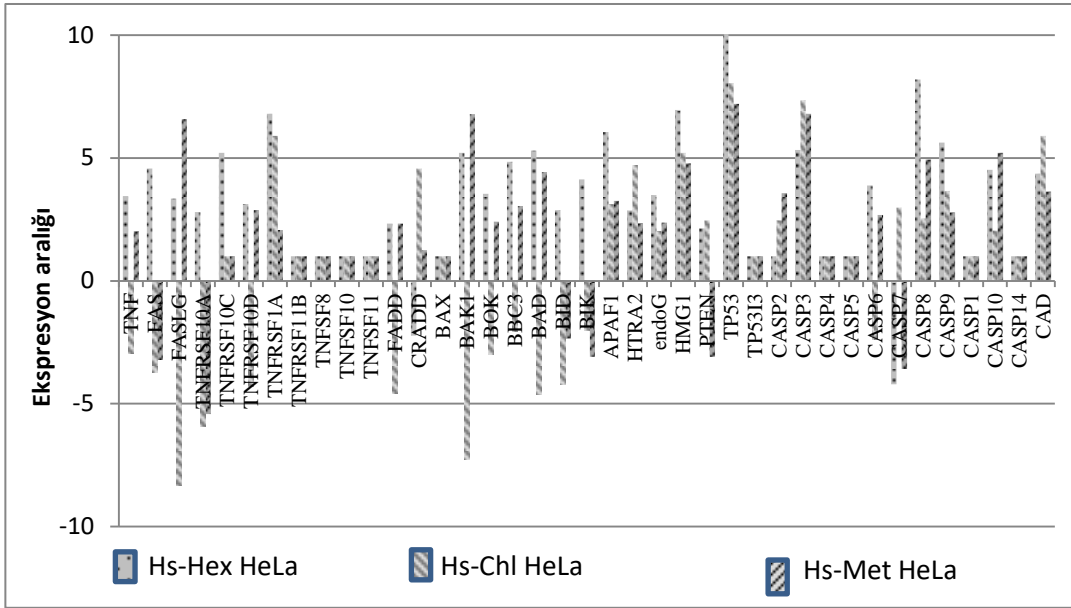
Apoptoz ile ilişkili genlerin daha anlamlı bir şekilde yorumlanması için kaspaz en ekspresyonları da ifade edilmiştir. Öncelikle HeLa hücrelerinde Hs-Hex, Hs-Chl ve Hs-Met ekstrelerinin etkilerine bakıldığında, ekstrinsik ve intrinsik yollar için kavşak noktası olan Casp-3, Cas-8, Cas-9 ve Cas-10 gibi genlerde önemli kat artışlarına yol açtığı tespit edilmiştir. El-Chl ekstreleri incelendiğinde sadece Casp-3 genlerinde upregülasyonlar oluştururken, El-Hex örneği Casp-2, Casp-3, Casp-4, Casp-5, Casp-8 ve Casp-9 genlerinde kat artışına yol açmıştır. Gg-Hex ekstreleri uygulaması sonrası ise Casp-2, Casp-3, Casp-4 ve Casp-8’da kat artışları görülürken, Gg-Met’de Casp-6 (22.40) ve Casp-9 (7.80)’daki kat artışları dikkate değer bulunmuştur. CaCo-2 hücre hatları incelendiğinde, Hs-Hex Casp-6, Casp-7 ve Casp-9’da upregülasyonlara neden olurken, Hs-Met Casp-2, Casp-6 ve Casp-10 aynı etkileri göstermiştir. El-Hex ve El-Chl Casp-2, Casp-7, Casp-8 ve Casp-9 üzerinde kat artışlarına sebep olurken, Casp-3 sadece El-Chl uygulamaları sonrası upregüle olmuştur. Alg uygulamaları sonrası MCF-7 hücrelerinde ise, Hs-Chl Casp-3, Casp-6 ve Casp-7 genlerinde, Hs-Met ise Casp-6, Casp-8, Casp-9 ve Casp-10 ekspresyonlarında kat artışlarına neden olmuştur. Son olarak El-Chl etkileri incelendiğinde Casp-3 ve Casp-7’de sırasıyla 15.21 ve 3.43 değerlerinde ekspresyon artışı olmuştur. Bu kaspaz aileleri dışında, özellikle Casp-9 ile kompleks oluşturan APAF-1 genlerine bakıldığında, HeLa hücre hatlarında Hs-Hex, Hs-Chl, Hs-Met, El-Chl ve Gg-Hex ekstre uygulamaları sonrası 2.48 ile 6.05 arasında değişen kat artışları bulunmuştur. CaCo-2 hücre hatlarına bakıldığında, El-Hex dışında diğer ekstreler önemli kat artışlarına neden olmuştur. MCF-7’de ise sadece Hs- met ekstreleri 2.45 değeriyle

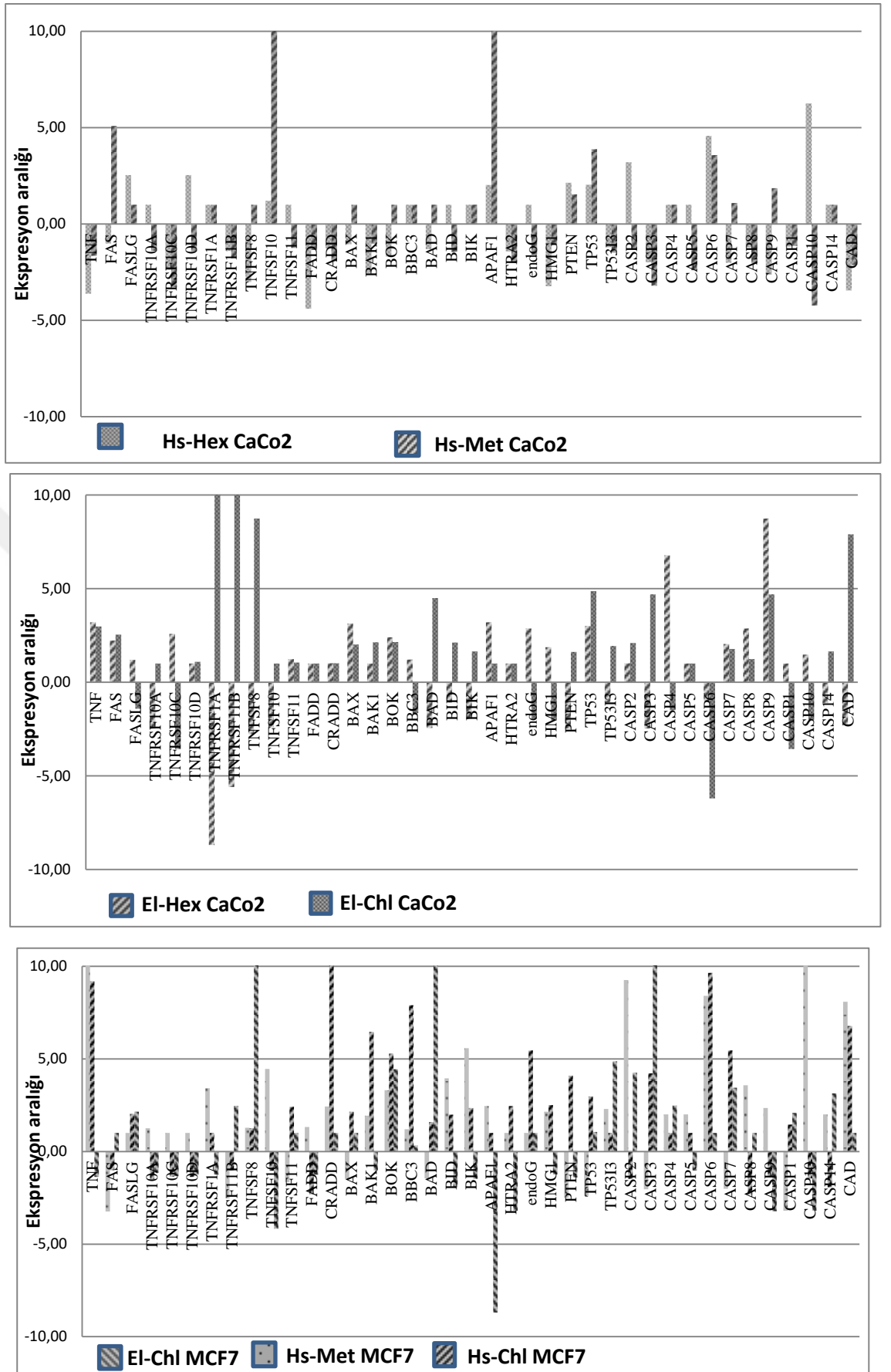
kat artışlarına yol açmıştır. Apoptozise yardımcı diğer proteinlerin etkinlikleri incelendiğinde ise, CAD proteinleri HeLa hücre hatlarında Hs-Met dışında önemli kat artışlarına neden olurken (2.23 ile 11.36 arası), CaCo-2 hücrelerinde El-Chl (7.90), MCF-7’de ise Hs-Chl (6.78) ve Hs-Met (8.09) ekstreleri kat artışına neden olmuştur. TP53 protein aktivasyonu incelendiğinde ise, HeLa’da Gg-Hex ve El-Chl dışındakiler, CaCo-2’da hepsi ve MCF-7 hücre hatlarında ise Hs-Met dışındaki tüm ekstreler 1.05 ile 38.4 aralığında önemli upregülasyonlara yol açtığı belirlenmiştir. Kaspaz bağımsız yolda görevli endoG proteini incelemeleri sonucunda, HeLa hücrelerinde Gg-Met, CaCo-2’da Hs-Hex ve El-Chl dışındakiler ile MCF-7’de bütün ekstreler kat artışlarına neden olmuştur. Kaspaz bağımlı yolda görevli HTRA-2 geni, HeLa hücre hatlarında El-Chl dışındaki ekstre uygulamaları sonrası kat artışlarına sahip olurken, MCF-7’de sadece Hs-Chl artışlara neden olmuştur. Bununla birlikte, CaCo-2 hatlarında ekstrelerin herhangi bir ekspresyon değişikliğine yol açmadıkları belirlenmiştir. Apoptotik panelde antiapoptotik olarak NFkB ailesi, DFFA, IAP ailesi ve TRAF gibi hücre survival mekanizmalarını da değerlendirdiğimiz bu çalışmada, DFFA genleri HeLa hücrelerinde El-Chl ve Gg-Met ile Hs-Chl ekstreleri dışında önemli derecede azalmalara yol açmıştır. IAP ailelerinden BIRC2 HeLa hücrelerinde Hs-Met, Hs-Chl ve El-Chl, CaCo-2 Hs-Hex ve Hs-Met ile MCF7’de Hs-Met downregülasyonlara yol açmıştır. BIRC3 HeLa hücrelerinde El-Hex ve El-Chl dışındaki tüm ekstreler ile CaCo-2’da Hs-Met ekspresyonda azalamalara neden olmuştur. BIRC5 HeLa hücrelerinde *H.scoparia* ekstreleri etkili olmazken, diğer alg ekstreleri downregülasyonlara yol açarken, MCF-7’de tüm ekstreler ekspresyonda azalmalara neden olmuştur. NFkB aileleri incelendiğinde, NFkB1 ve NFkB2 HeLa hücrelerinde Hs-Hex ve Hs-Chl dışındaki ekstre uygulamalarında azalma eğilimi gösterirken, REL, RELA ve RELB antiapoptotik genlerin pek çoğundada alg uygulamaları sonrası ekspresyonda downregülasyona eğilim olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.12. Alg uygulamaları sonrası hücre hatlarındaki fold change değişimleri (Hs: *H.scoparia*; El: *E.linza*; Gg: *G.gracilis*) (Hex: Hekzan; Chl: Kloroform; Met; Metanol)

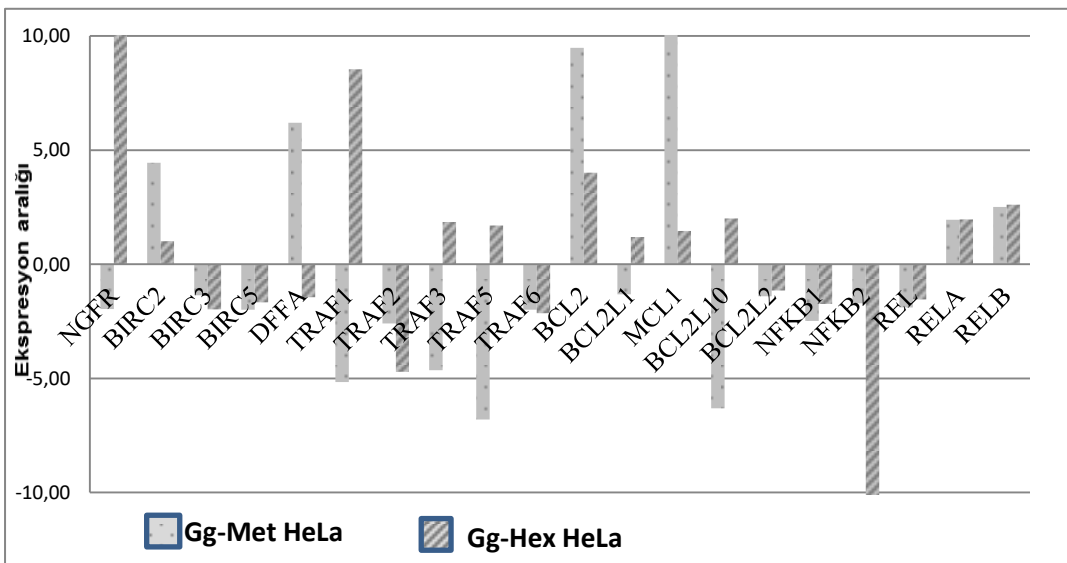
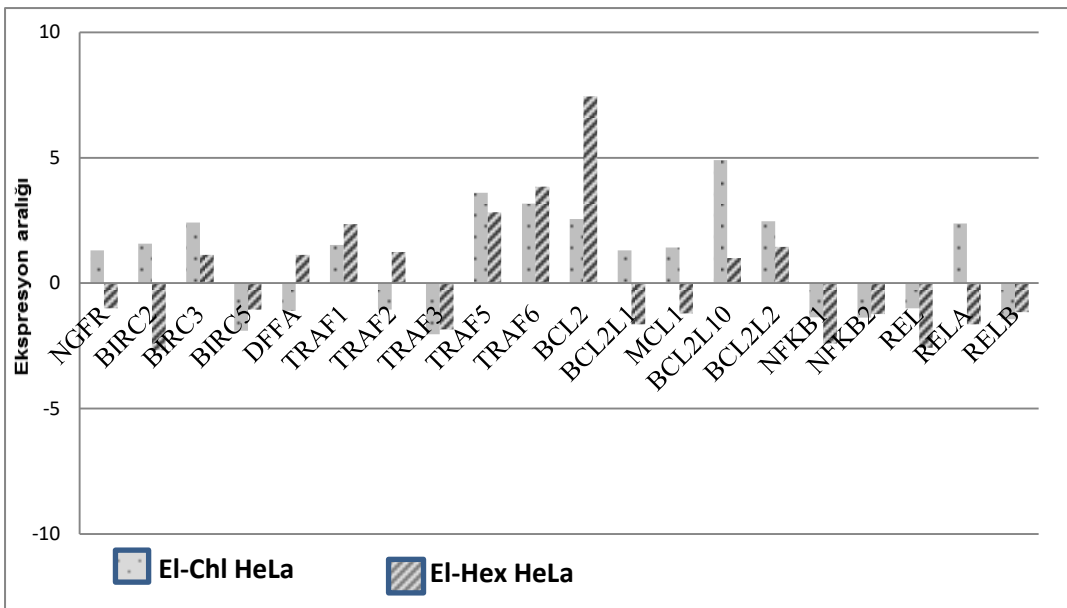
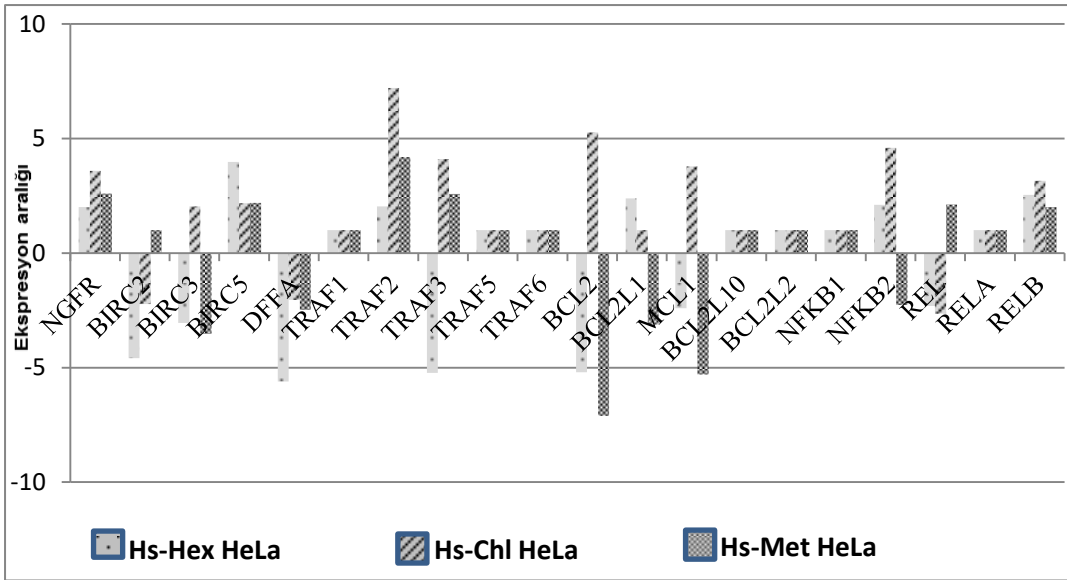
Hücre Hatları	HeLa							CaCo2				MCF-7			
Gen Sembolleri	Hs-Hex	Hs-Chl	Hs-Met	El-Hex	El-Chl	Gg-Hex	Gg-Met	Hs-Met	Hs-Hex	El-Chl	El-Hex	Hs-Chl	Hs-Met	El-Chl	
TNF reseptör															
TNF/TNF- α	3,45	-2,8	2,01	1,98	-2,9	1,12	1,29	-1,65	-3,61	2,98	3,20	9,19	11,2	-1,38	
FAS	4,56	-3,75	-3,22	-2,54	-1,3	1,09	2,58	5,09	-1,01	2,54	2,23	-1,02	-3,24	1,00	
FASLG	3,34	-8,35	4,57	1,5	-37	1,87	1,00	1,00	2,54	-1,42	1,20	2,03	1,00	2,14	
FADD	2,32	-4,62	-2,32	4,21	1,27	-1,67	1,88	-1,35	-4,40	1,00	1,00	-2,32	1,32	-1,25	
CRADD	-2,23	4,57	1,06	2,04	1,07	2,12	-1,67	-1,92	-1,26	1,01	1,01	14,2	2,42	1,00	
NGFR	2,01	3,59	2,59	-1,01	1,3	11,8	-1,96	1,00	-3,24	1,87	3,20	-1,25	4,07	-1,20	
TNFRSF10 A	2,8	-3,95	-5,43	1,00	-1,3	4,19	-2,54	-1,40	1,00	1,00	-2,48	-1,50	1,25	-1,15	
TNFRSF10 C	5,2	1,00	1,00	-2,3	1,4	2,74	1,16	-3,27	-2,38	-3,57	2,58	-1,36	1,00	-1,33	
TNFRSF10 D	3,12	-4,32	2,87	1,00	-1,2	-2,26	2,32	-1,42	2,54	1,09	1,00	-1,37	1,00	-1,25	
TNFRSF1A	6,8	3,9	2,06	5,6	1,28	7,24	-6,29	1,00	1,00	12,78	-8,70	1,00	3,42	-1,25	
TNFRSF11 B	1,00	1,00	1,00	-1,23	2,54	-1,98	1,00	-1,78	-1,40	14,27	-5,60	-1,02	-2,54	2,47	
TNFSF8	1,00	1,00	1,00	3,58	-31	1,05	1,00	1,00	-3,01	8,74	-2,78	1,25	1,28	27,1	
TNFSF10	1,00	1,00	1,00	-2,16	3,58	-3,2	-1,70	11,9	1,21	1,00	-2,41	-1,04	4,45	-4,18	
TNFSF11	1,00	1,00	1,00	1,18	1,59	-1,46	2,82	-1,24	1,00	1,05	1,24	2,41	-1,65	1,00	
TRAF Ailesi															
TRAF1	1,00	1,00	1,00	2,35	1,52	8,55	-5,16	5,68	10,1	-3,05	-1,21	-1,38	-3,27	1,94	
TRAF2	2,03	7,2	4,19	1,24	-1,6	-4,7	-2,59	1,42	1,00	1,00	1,00	-1,15	-1,42	-3,05	
TRAF3	-5,23	4,1	2,58	-1,85	-2,4	1,86	-4,63	-1,35	1,00	-2,40	-1,28	-2,95	-1,78	1,00	
TRAF5	1,00	1,00	1,00	2,83	3,6	1,7	-6,8	-1,59	-1,77	-14,2	-6,12	-1,33	1,00	-2,40	
TRAF6	1,00	1,00	1,00	3,84	3,17	-2,14	-1,99	-1,19	-5,41	1,00	1,00	-1,25	2,47	1,00	
BCL2 Ailesi															
Antiapoptotik Üyeler															
BCL2	-5,2	5,27	-7,1	7,45	2,56	4,01	9,49	1,00	-2,12	2,04	1,45	-3,57	-1,01	1,00	
BCL2L1	2,38	1,00	-3,12	-1,64	1,31	1,2	-1,31	-1,43	-4,23	-1,54	1,79	-2,01	0,25	-1,43	
MCL1	-2,4	3,78	-5,3	-1,21	1,42	1,47	15,37	2,69	1,00	11,20	14,1	-1,15	2,00	1,21	
BCL2L10	1,00	1,00	1,00	1,00	4,91	2,01	-6,30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,28	2,34	2,00	
BCL2L2	1,00	1,00	1,00	1,45	2,46	-1,15	-1,40	1,00	1,00	3,22	4,21	18,5	1,90	9,32	
Proapoptotik Üyeler															
BH multidomain grubu															
BAX	1,00	1,00	1,00	1,78	2,13	15,5	1,31	1,00	-1,05	2,01	3,14	2,15	-1,48	1,00	
BAK1	5,2	-7,29	6,78	4,21	-1,2	-1,12	-8,09	-1,03	-2,54	2,14	1,00	6,45	1,93	-1,03	
BOK	3,54	-3,02	2,4	-2,13	1,58	-1,57	-1,86	1,00	-1,69	2,15	2,40	5,28	3,31	4,44	
BH-only grubu															
BBC3	4,84	-2,07	3,4	1,00	2,14	1,32	2,17	1,00	1,00	-1,65	1,21	7,90	1,20	0,32	

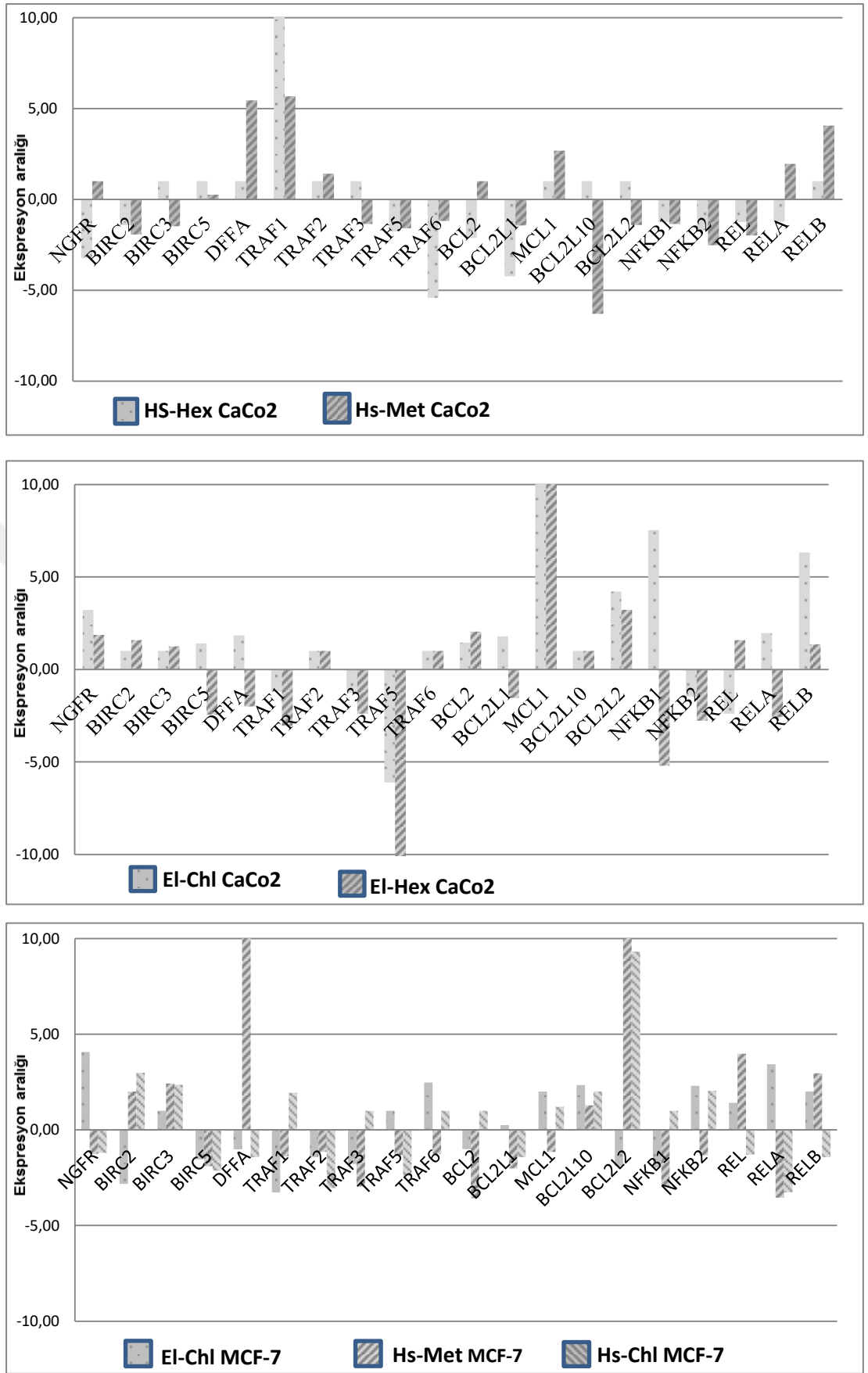
BAD	5,3	-4,61	4,42	1,00	3,3	3,62	5,97	1,00	-1,30	4,5	-2,45	1,58	-1,45	4,6
BID	2,87	-4,21	-2,35	-4,5	1,55	2,54	-2,49	-1,45	1,00	2,12	-1,08	1,98	3,94	-1,93
BIK	4,12	-2,03	-3,38	1,52	2,34	-3,09	2,81	1,00	1,00	1,64	-1,97	2,34	3,58	-1,48
NFkB Ailesi														
NFKB1	1,00	1,00	1,00	-2,41	-1,3	-1,74	-2,48	-1,35	-1,25	-5,21	7,54	-2,95	-1,98	1,00
NFKB2	2,1	4,6	-2,27	-1,24	-1,3	-55,1	-1,70	-2,52	-1,69	-2,78	-1,46	-1,33	2,31	2,04
REL	-2,31	-2,65	2,12	-2,57	-1,1	-1,54	-1,89	-1,98	-1,24	1,58	-2,40	3,98	1,42	-1,29
RELA	1,00	1,00	1,00	-1,65	2,38	1,97	1,95	1,00	-1,21	-2,58	1,96	-3,54	3,43	-3,27
RELB	2,54	3,16	2,01	-1,16	-1,4	2,61	2,51	4,07	1,00	1,35	6,31	2,96	2,00	-1,42
Kaspaz Ailesi														
CASP2	1,00	2,45	3,56	2,32	-1,3	3,35	-1,07	-1,34	3,21	2,09	1,01	-1,48	9,25	4,26
CASP3	4,23	7,34	6,8	5,32	2,97	1,16	-1,48	-3,20	-1,98	4,70	-2,47	4,21	-2,04	15,2
CASP4	1,00	1,00	1,00	-1,14	2,02	3,11	-1,52	1,00	1,00	-1,49	6,78	1,00	2,00	2,48
CASP5	1,00	1,00	1,00	-1,02	2,27	-76	2,78	2,40	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	-1,03
CASP6	3,87	-2,41	2,68	-2,35	1,63	-1,72	22,40	3,58	4,58	-6,21	-1,02	9,65	8,41	1,00
CASP7	-4,21	2,98	-3,59	-1,46	-3,5	2,23	-3,70	1,09	-2,01	1,78	2,04	5,46	-2,01	3,43
CASP8	8,19	2,54	4,93	-3,87	1,2	3,03	-1,44	-2,04	-1,20	1,24	2,87	-2,32	3,58	1,00
CASP9	5,62	3,65	2,78	1,62	3,4	-4,17	7,80	1,86	-2,62	4,70	8,74	-1,35	2,34	-3,23
CASP1	1,00	1,00	1,00	1,21	-2,8	-1,28	1,51	-1,14	-1,16	-3,57	1,00	1,45	-3,20	2,08
CASP10	4,52	2,04	5,21	-1,85	2,7	-1,53	-1,62	-4,23	6,25	-2,01	1,48	-1,45	76,1	-3,20
CASP14	1,00	1,00	1,00	1,00	-10	-1,39	3,14	1,00	1,00	1,65	-1,11	-1,93	2,00	2,59
IAP Ailesi														
BIRC2	-4,58	-2,23	1,00	-2,68	1,57	1,02	4,45	-1,93	-1,42	1,58	1,00	2,00	-2,83	2,99
BIRC3	-3,05	2,04	-3,52	1,12	2,42	-1,97	-1,35	-1,48	1,00	1,24	1,00	2,42	1,00	2,36
BIRC5	3,98	2,17	2,19	-1,06	-1,9	-1,67	-1,98	0,27	1,00	-2,45	1,40	-1,90	-1,54	-2,13
Diğer Yardımcı Proteinler														
APAF1	6,05	3,12	3,25	3,2	-2,7	2,48	-2,41	11,8	2,03	1,00	3,20	1,00	2,45	-8,70
HTRA2	2,86	4,71	2,34	-2,4	1,22	4,34	2,58	-2,01	-1,42	1,00	1,00	2,00	1,00	3,21
endoG	3,48	2,02	2,36	8,79	1,49	1,96	-2,70	-1,59	1,00	-1,95	2,87	5,46	1,00	1,00
DFFA	-5,6	-2,04	-2,48	1,13	-1,1	-1,44	6,21	5,46	1,00	-2,01	1,84	44	-1,02	-1,42
CAD	4,36	5,9	3,63	-12,4	5,58	2,23	2,38	-2,13	-3,45	3,90	-2,30	4,78	6,09	1,00
HMG1	6,65	5,2	4,7	1,14	-4,2	-1,73	8,76	-1,08	-3,23	-2,04	1,87	2,50	2,14	-1,24
PTEN	2,13	2,45	-3,1	-4,89	2,96	-1,14	1,46	1,54	2,14	1,62	-2,48	4,10	-2,49	-1,40
TP53	12,4	8,05	7,2	1,00	5,28	-1,01	15,81	3,88	2,04	4,87	3,01	2,98	-2,40	1,05
TP53I3	1,00	1,00	1,00	2,3	1,84	-2,05	-11,6	-1,48	-1,20	1,94	-1,07	1,00	2,29	4,87





Şekil 3.9 Alg ekstrlerinin kanser hücre hatları üzerinde proapoptotik gen profili



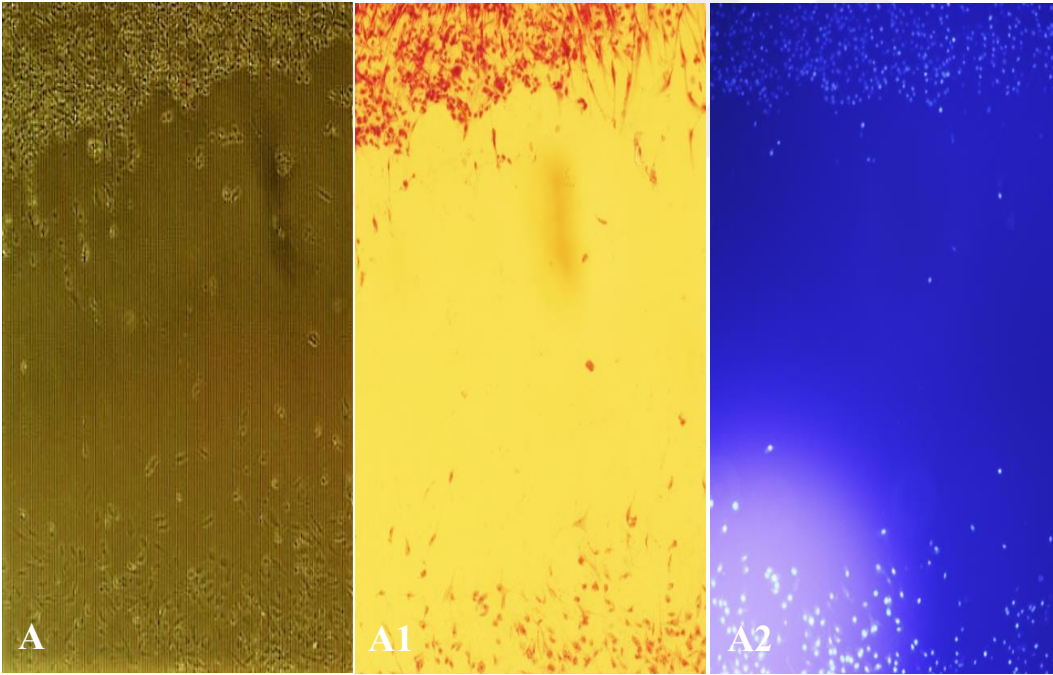


Şekil 3.10 Alg ekstrlerinin kanser hücre hatları üzerinde antiapoptotik gen profili

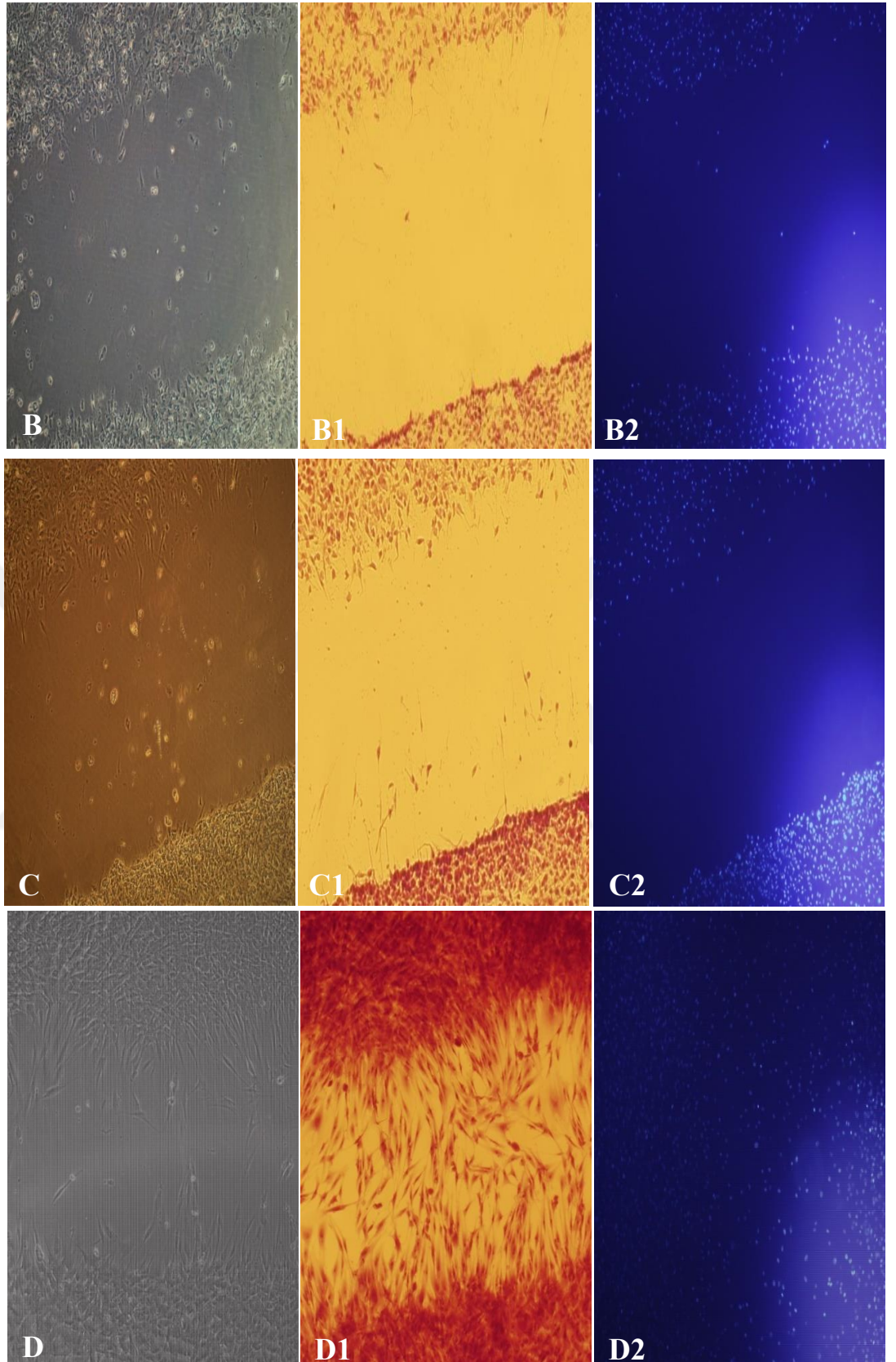
3.6. Anjiyo/Anti-anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi

3.6.1. *In vitro* hücre migrasyon denemesi - yara iyileşme modeli

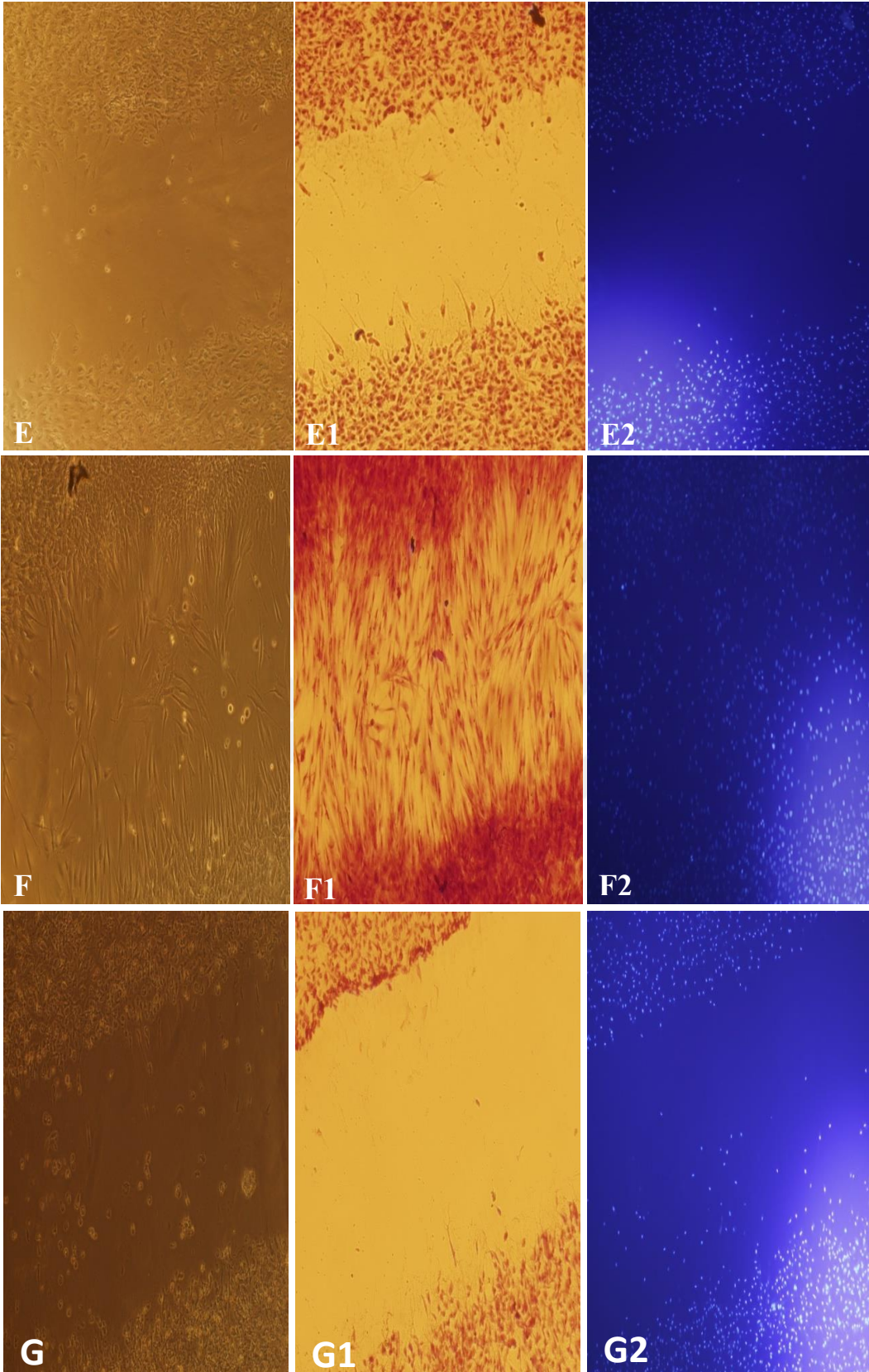
“CytoSelect 24–Well Wound Healing Assay Kit” ile alg ekstrelerinin hücre migrasyonu ve anjiyogenezis gibi süreçlere muhtemel etkileri ortaya konulmuştur. Prosedür kapsamında, fibroblast hücrelerinde insertlerle oluşturulan 0.9 mm çapındaki yara bölgesine doğru göç eden hücre miktarı belirlenmiş, sonuçlar doğrultusunda yara iyileşme yüzdesi ve migrasyon oranı hesaplanmıştır. Öncelikle herhangi bir boyama işlemi yapılamadan, uygulamanın 24. saatinde görüntü alınmıştır. Daha sonra, uygulamanın 48. saatinde giemsa boyama ile tüm hücreler, DAPI boyama ile sadece nükleusların yara alanına göçü görüntülenmiştir (Şekil 3.11, 3.12, 3.12 ve 3.14).



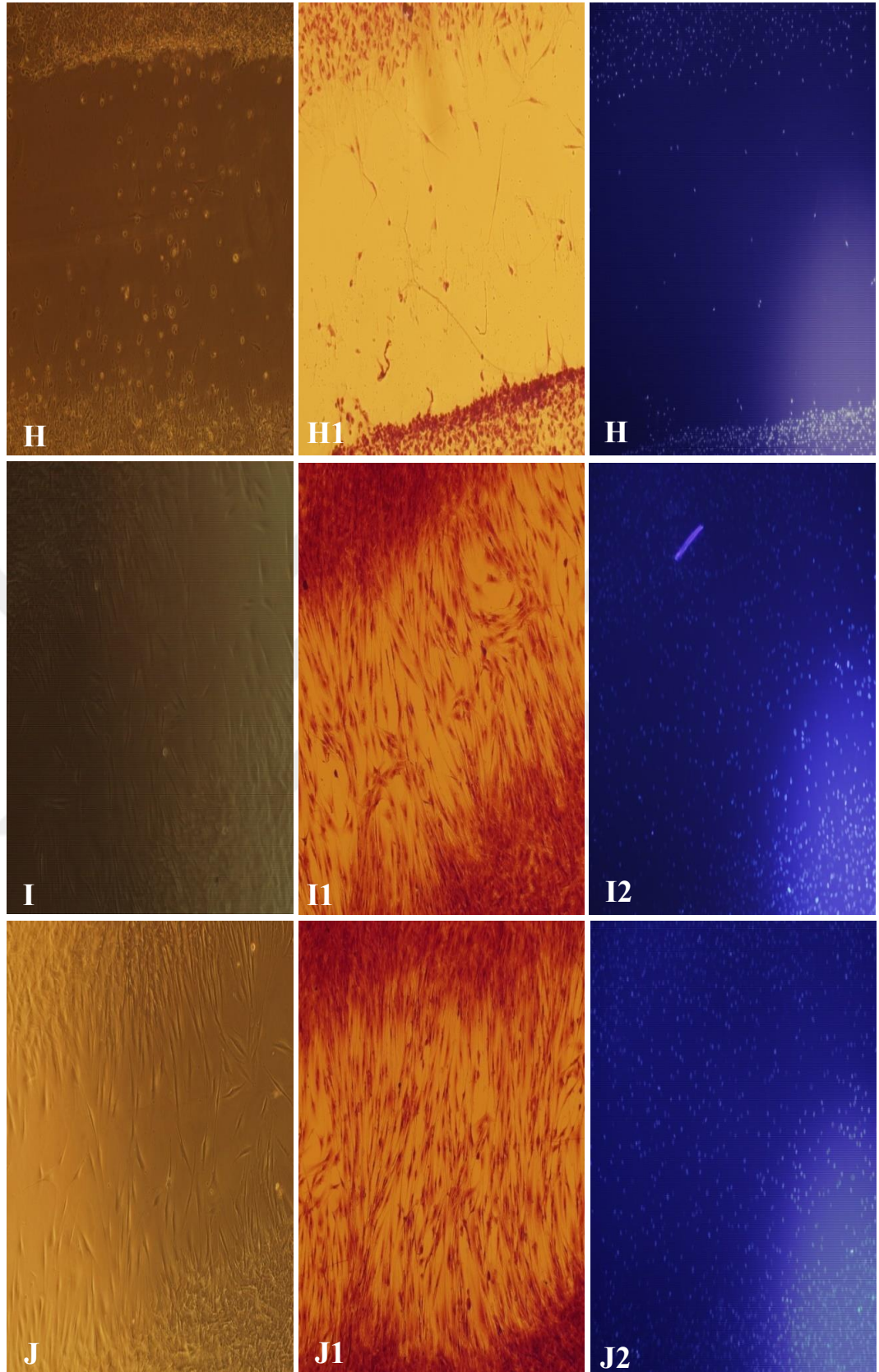
Şekil 3.11 Kontrol gubu yara kapanma potansiyeli. A:24h, A1;48h-Giemsa, A2;48h-DAPI..



Şekil 3.12 *H.scoparia* alg ekstralarının yara kapatma potansiyeli. **B(Hex)**:24h, B1;48h-Giemsa, B2;48h-DAPI. **C(Chl)**:24h, C1;48h-Giemsa, C2;48h-DAPI. **D(Met)**:24h, D1;48h-Giemsa, D2;48h-DAPI.



Şekil 3.13 *E.linza* alg ekstrelerinin yara kapatma potansiyeli. **E(Hex)**:24h, E1;48h-Giemsa, E2;48h-DAPI. **F(Chl)**:24h, F1;48h-Giemsa, F2;48h-DAPI. **G(Met)**:24h, G1;48h-Giemsa, G2;48h-DAPI.



Şekil 3.14 *G.gracilis* alg ekstralarının yara kapatma potansiyeli. **H(Hex):**24h, H1;48h-Giemsa, H2;48h-DAPI. **I(Chl):**24h, I1;48h-Giemsa, I2;48h-DAPI. **J(Met):**24h, J1;48h-Giemsa, J2;48h-DAPI.

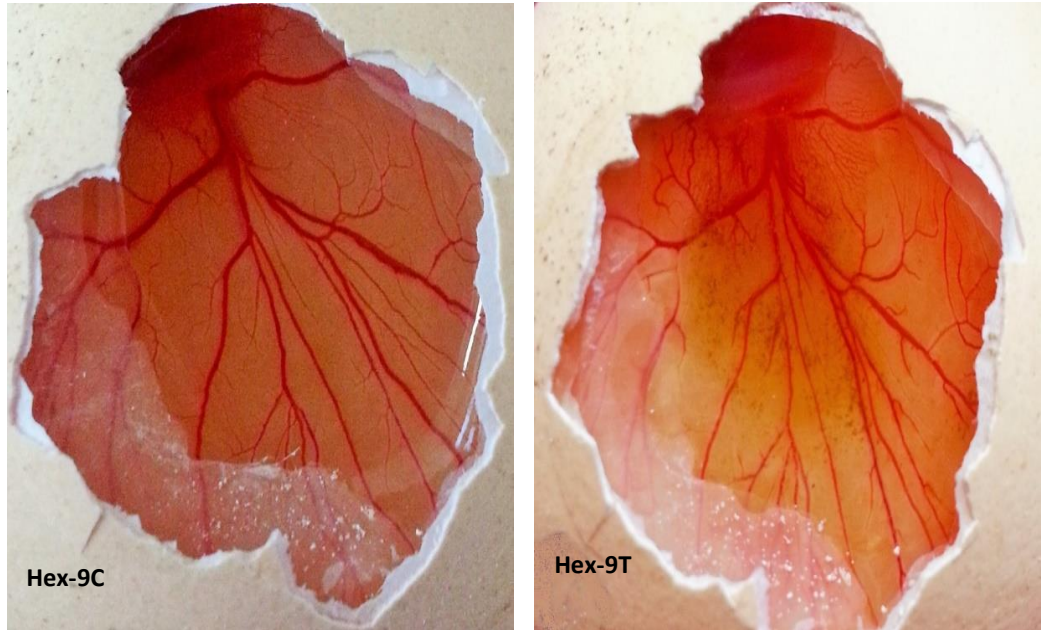
İn vitro koşullarda alg ekstrelerinin yara alanını kapatma potansiyeli Çizelge 3.13'te gösterildiği üzere, tüm Hex ekstrelerinin, diğer ekstrele ve kontrole kıyasla en az yüzdeyle yara alanını kapattığı gözlemlenmiştir. Tüm alg ekstreleri içerisinde en yüksek proliferasyon potansiyeline sahip örnekler kırmızı alg Gg-Met (%85) ve yeşil alg El-Chl (%83)'de tespit edilirken bunları, Gg-Chl (%78), Hs-Met (%76) ve El-Met (%51) örnekleri izlemektedir. Bununla birlikte, Hex ekstrelerinde görülen sırasıyla El-Hex (%37), Gg-Hex (%11) ve Hs-Hex (%9) örnekleri diğer ekstrele kıyasla düşük yüzdeli proliferasyonlara neden olsa da, yara alanı kapatma yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede rapor edilmiştir.

Çizelge 3.13 Alg Ekstrelerinin Yara Alanı Kapatma Yüzdeleri ve Standart Sapmaları

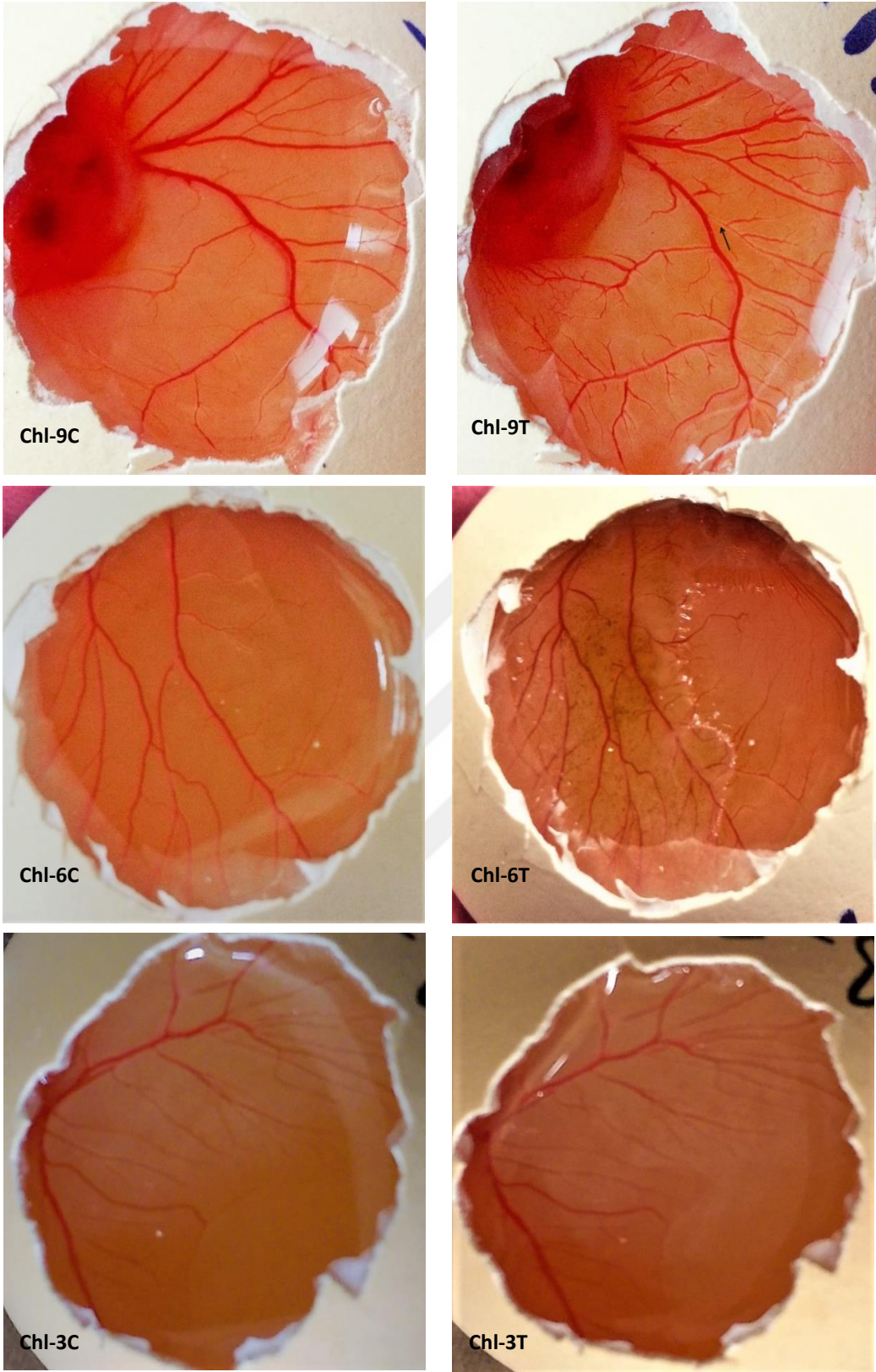
MADDE	Yara Alanı Kapatma Yüzdeleri
Hs-Hex	9±1
Hs-Chl	24±2
Hs-Met	<u>76±4</u>
El -Hex	37±3
El -Chl	<u>83±4</u>
El-Met	51±1
Gg -Hex	11±1
Gg-Chl	<u>78±3</u>
Gg-Met	<u>85±6</u>

3.6.2. *İn vivo* antianjiyogenik aktivite sonuçları

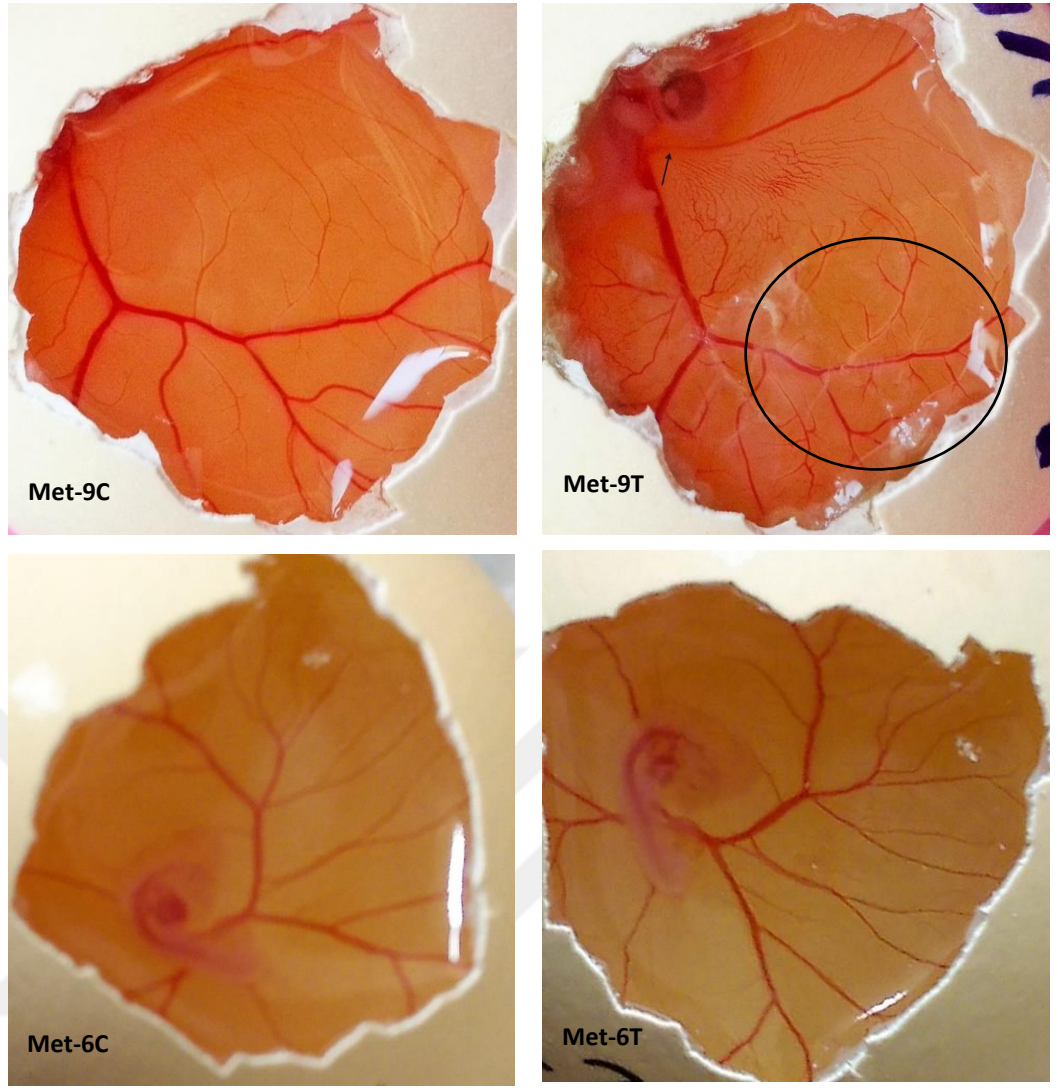
In vivo alg ekstrelerinin uygulamasına yanıt olarak ortaya çıkan lizis, kogülasyon ve hemoroji gibi antianjiyogenik etkinliği kanıtlamak amacıyla HET-CAM yöntemi gerçekleştirilmiş ve değerlendirme sonucunda elde edilen skorlar Çizelge 3.14’de verilen tabloda her bir alg ekstresi için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak anti anjiyogenik etkinliği kanıtlanmış Süramin, negatif kontrol olarak ise NaCl kullanılmıştır. Çalışmada çözücü olarak kullanılan DMSO’nun herhangi bir anjiyogenik etkisi tespit edilmemiştir (Şekil 3.24). Bununla birlikte, ekstre uygulamaları sonucunda elde edilen anjiyogenik etkiler Şekil 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22 ve 3.23’de gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında, El-Chl, El-Met ile Gg-Met ekstreleri 900 µL/mL’de güçlü bir anti anjiyogenik etkinlik sergilerken, 600 µL/mL ise bu ekstrele ek olarak Hs-Chl’da orta derecede etkinlik gözlenmiştir. Aynı zamanda, alg örneklerinin Hex ekstreleri ise en yüksek dozda bile zayıf yada etkisiz olarak etkinliği ortaya konulmuştur.



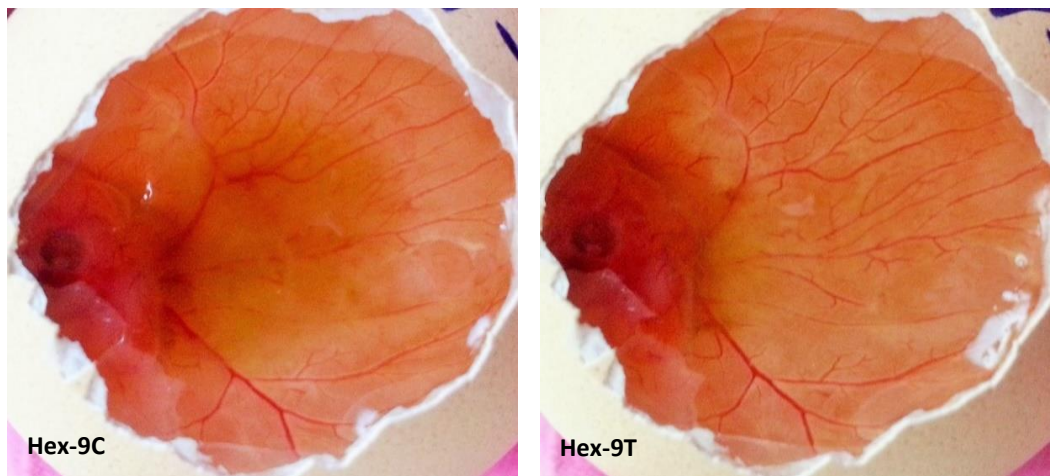
Şekil 3.15 *H. scoparia* hekzan ekstrelerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama,



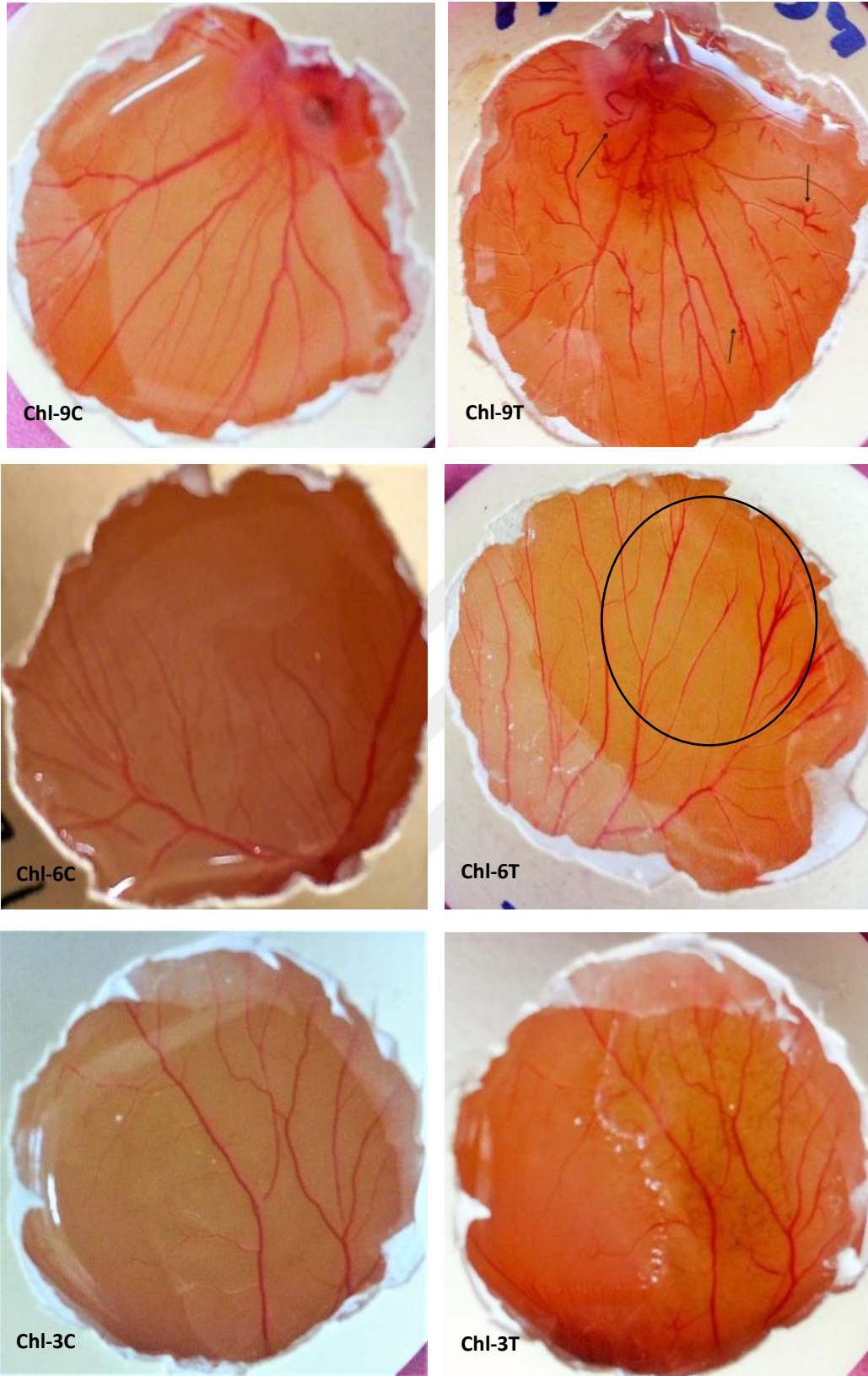
Şekil 3.16 *H. scoparia* klorform ekstrelerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg



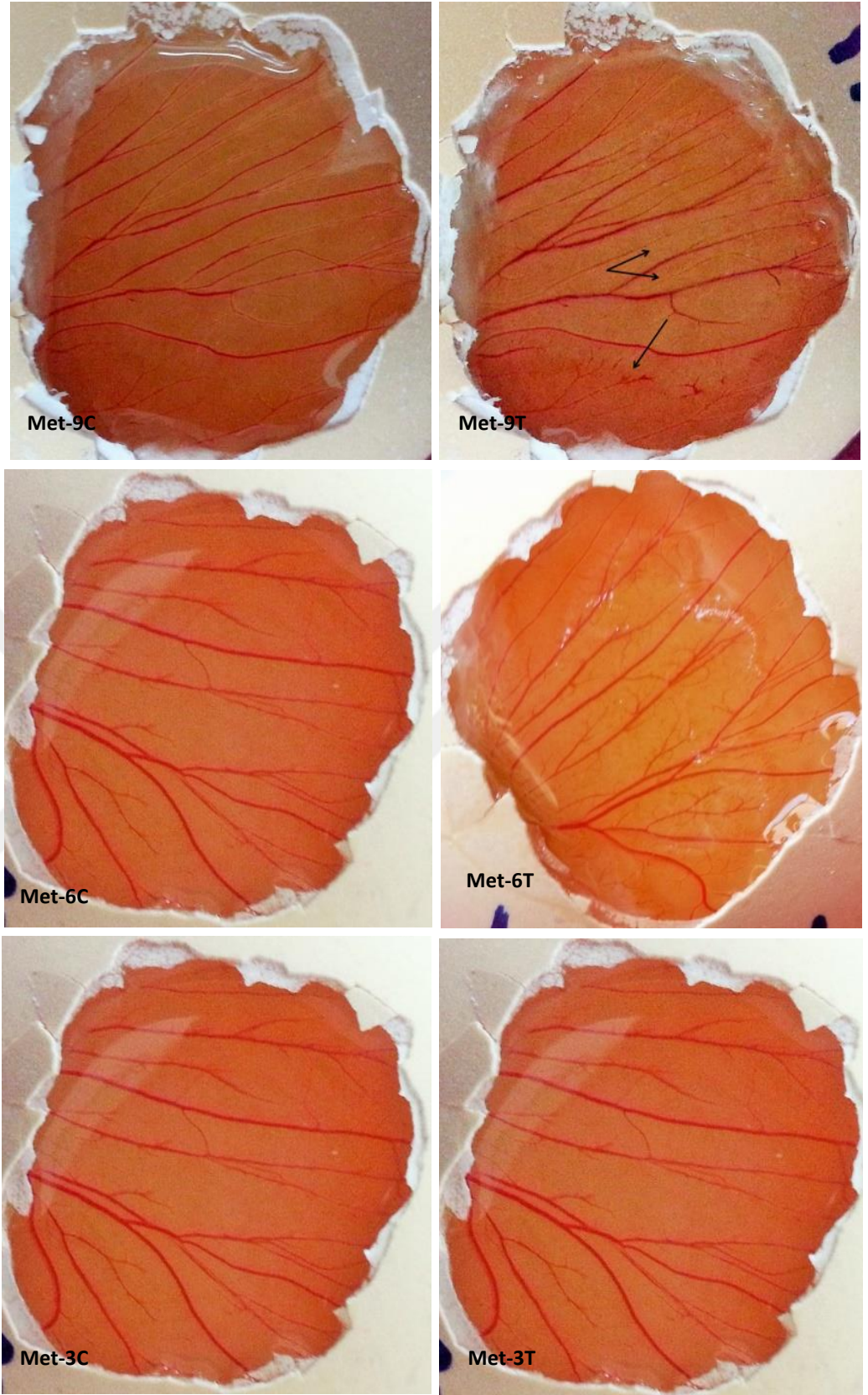
Şekil 3.17 *H. scoparia* metanol ekstrlerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg



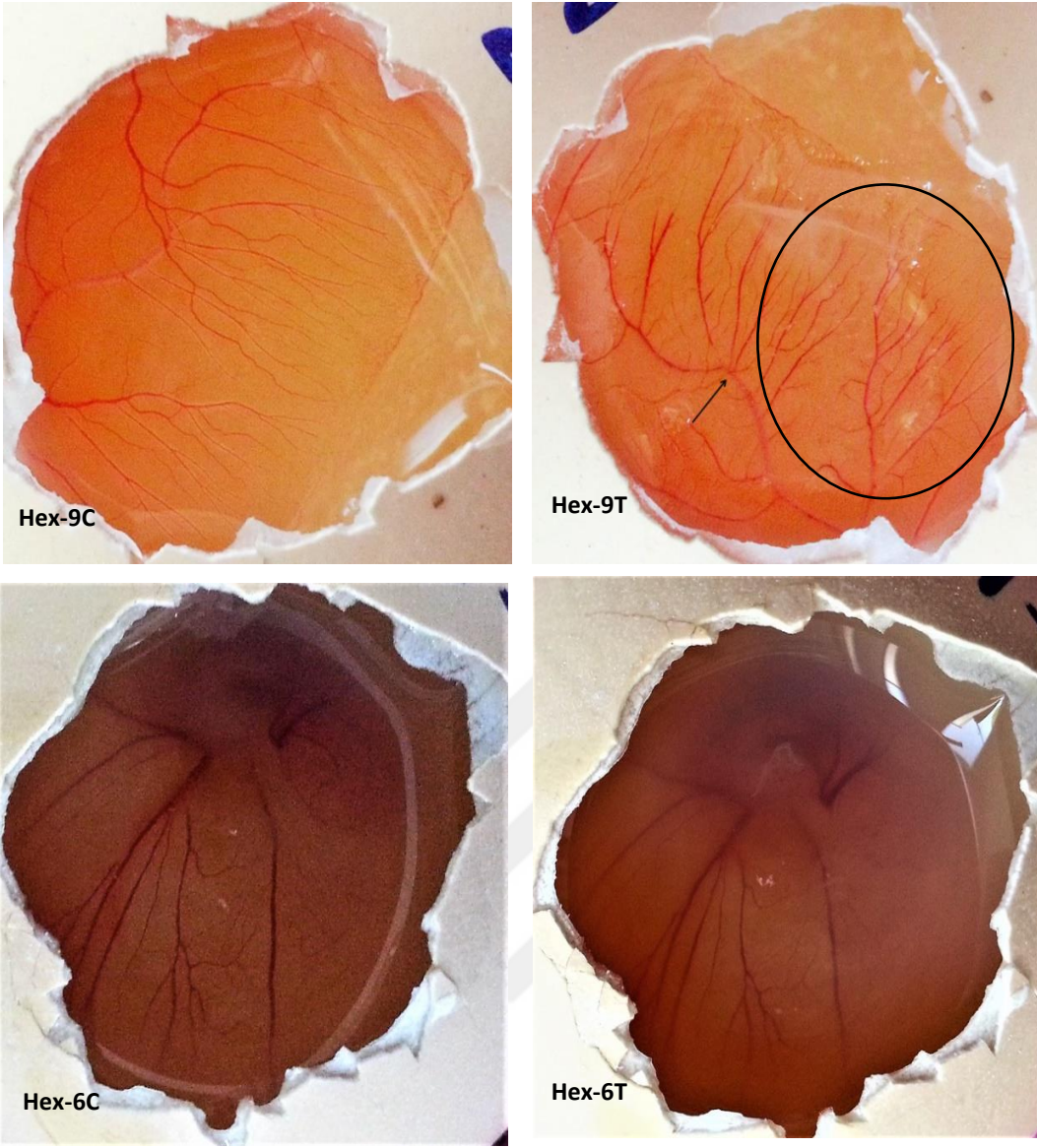
Şekil 3.18 *E. linza* hekzan ekstrlerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama.



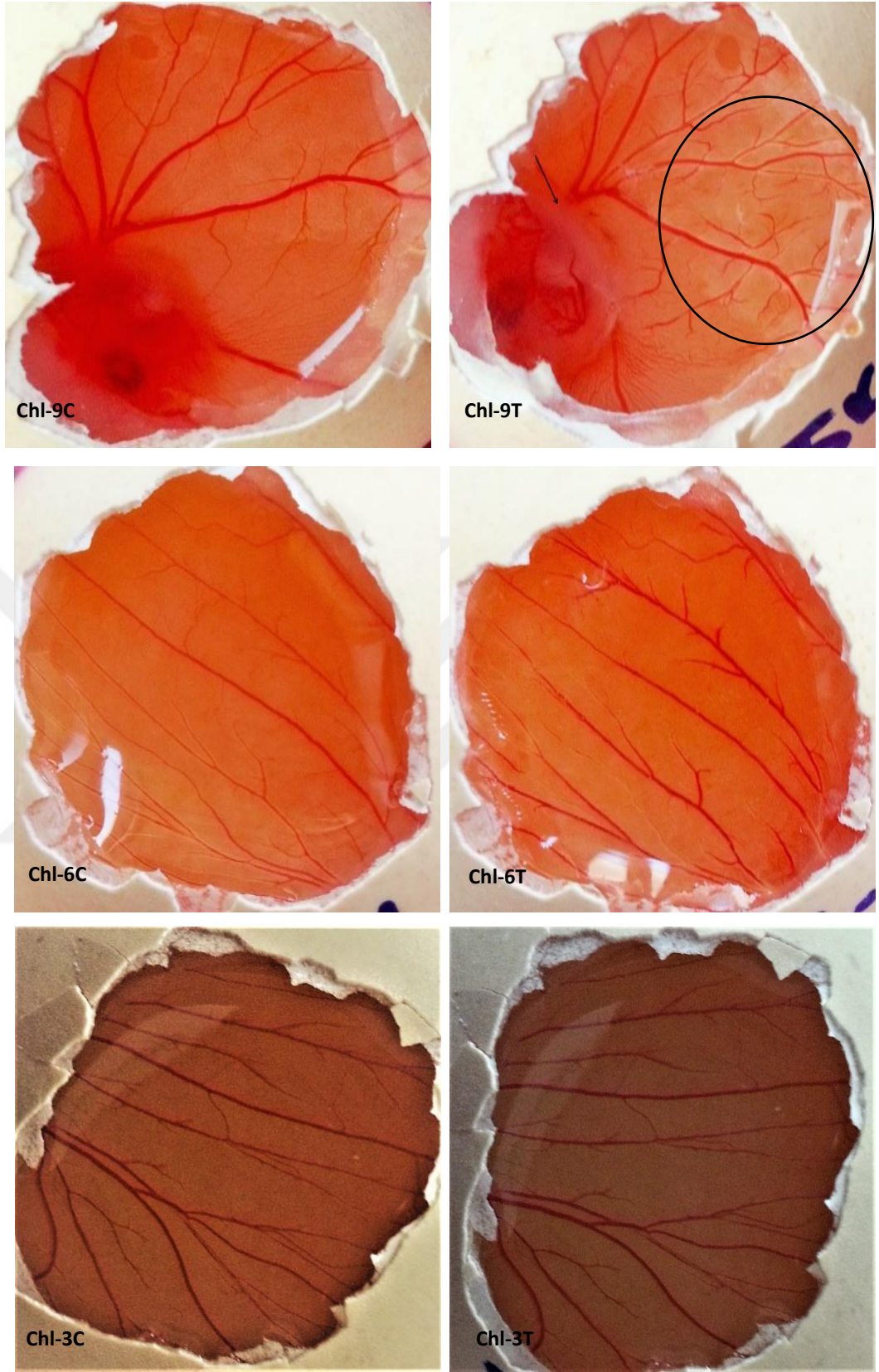
Şekil 3.19 *E.linza* klorform ekstrilerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg



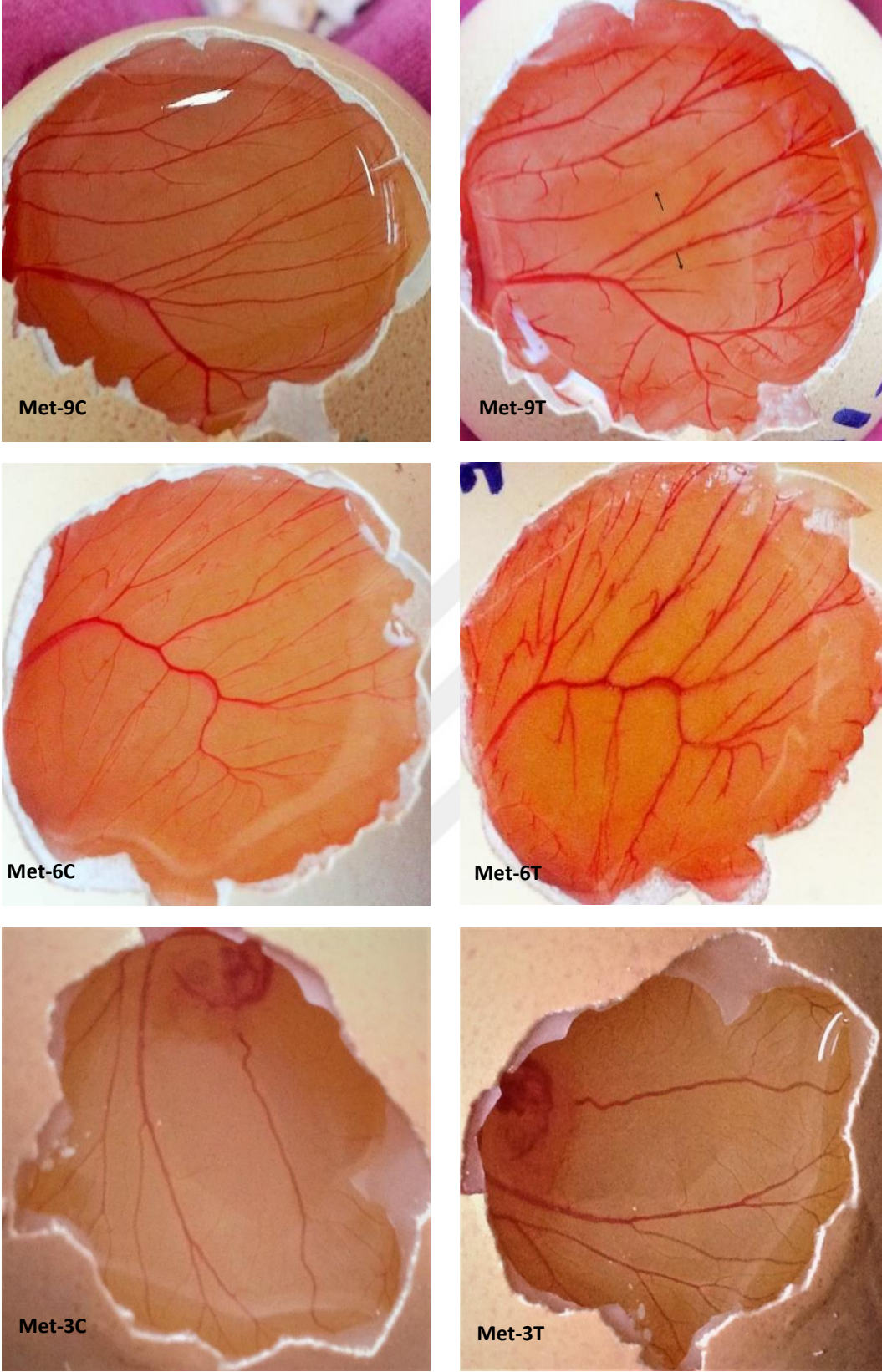
Şekil 3.20 *E.linza* metanol ekstrelerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg.



Şekil 3.21 *G. gracilis* hekzan ekstrilerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg.

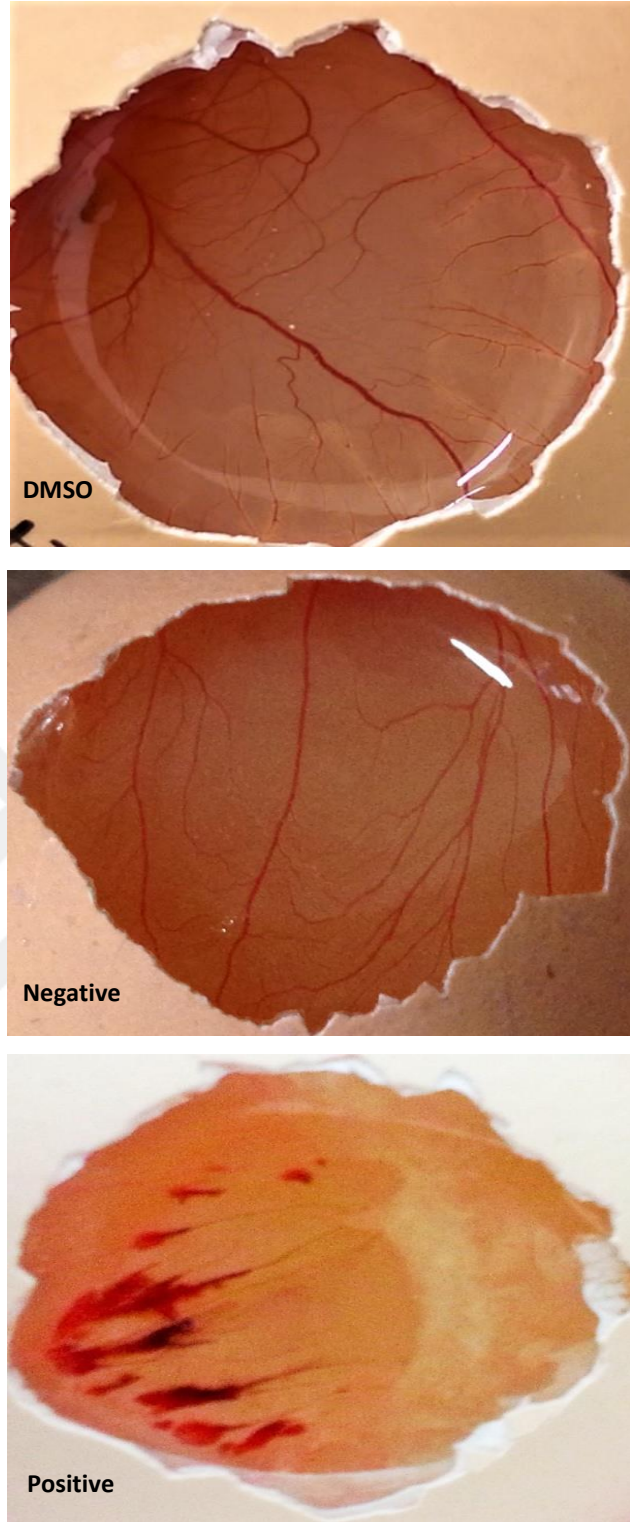


Şekil 3.22 *G. gracilis* klorform ekstrelerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları. C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg



Şekil 3.23 *G. gracilis* metanol ekstrelerinin *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları.

C:Kontrol, T:Uygulama, 3:300mg/kg, 6:600mg/kg, 9:900mg/kg.



Şekil 3.24 Pozitif (0.1N NaOH), negatif kontrol (0.9% NaCl) ve DMSO (300 µL) gruplarının *in vivo* antianjiyogenik uygulamaları.

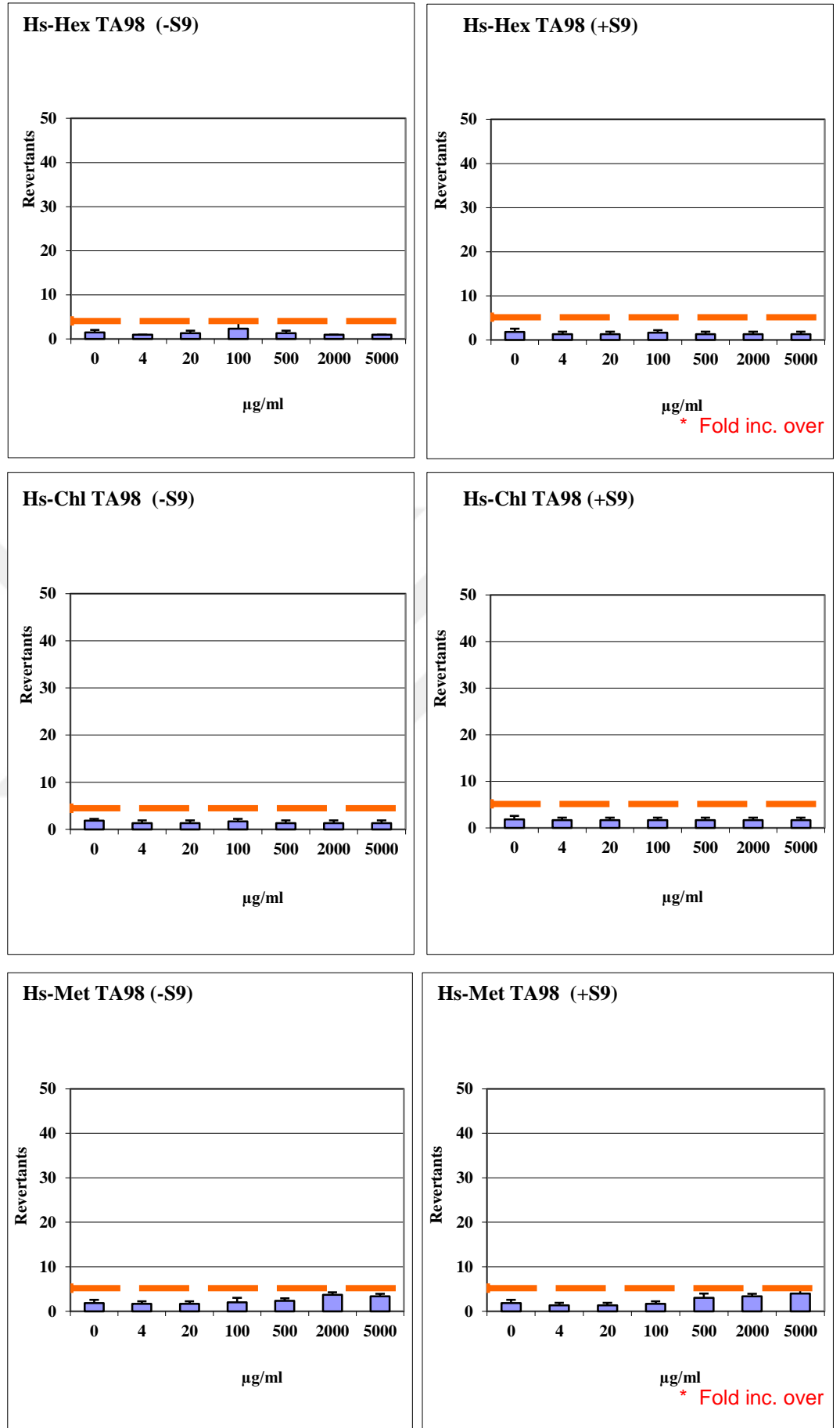
Çizelge 3.14 HET CAM uygulamaları sonucunda elde edilen skorları

	MADDE	Yumurta Sayısı	Skor	Etki
<i>H.scoparia</i>	Hekzan (900mg/kg)	3	0,03± 0.01	Etki yok
	Kloroform (900mg/kg)	3	0,73± 0.03	Orta
	Kloroform (600mg/kg)	3	0,52± 0.04	Orta
	Kloroform (300mg/kg)	3	0,02± 0.01	Etki yok
	Metanol (300mg/kg)	3	0,05± 0.02	Etki yok
	Metanol (600mg/kg)	3	0,58± 0.04	Orta
	Metanol (900mg/kg)	3	0,64± 0.02	Orta
<i>E.tinza</i>	Hekzan(900mg/kg)	3	0,04± 0.01	Etki yok
	Kloroform(300mg/kg)	3	0,03± 0.01	Etki yok
	Kloroform(600mg/kg)	3	0,64± 0.03	Orta
	Kloroform(900mg/kg)	3	<u>2,64± 0.03</u>	Güçlü
	Metanol(300mg/kg)	3	0,04± 0.01	Etki yok
	Metanol(600mg/kg)	3	0,63± 0.01	Orta
	Metanol(900mg/kg)	3	<u>1,84± 0.04</u>	Güçlü
<i>G.gracilis</i>	Hekzan(900mg/kg)	3	0,62± 0.02	Orta
	Kloroform(900mg/kg)	3	0,74± 0.04	Orta
	Kloroform (600mg/kg)	3	0,49± 0.03	Zayıf
	Kloroform (300mg/kg)	3	0,03± 0.01	Etki yok
	Metanol(300mg/kg)	3	0,02± 0.01	Etki yok
	Metanol(600mg/kg)	3	0,47± 0.02	Zayıf
	Metanol(900mg/kg)	3	<u>1,58± 0.01</u>	Güçlü
	NaOH	3	<u>1,89± 0.04</u>	Güçlü
	NaCl	3	0,01± 0.01	Etki yok
	DMSO	3	0,03± 0.01	Etki yok

3.7. Antimutajenite aktivite sonuçları

Çalışmada Ames MPFtm kiti, *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 15357 suşları kullanılmış ve sertifikalandırılması Xenometrix firması tarafından yapılmıştır. Sıçan karaciğer S9 fraksiyonu alg ekstrelerinin biyoaktivasyonunu arttırmak amacıyla kullanılmış, test ortamına S9 karışı ilave edilmesi veya edilmemesi durumları için farklı pozitif kontroller ile analiz gerçekleştirilmiştir. Mutajenik aktivite için değerlendirmelerde, kontrole kıyasla revertant koloni sayısında 2 kattan fazla bir artış ile doza bağlı bir atış meydana gelmesi durumunda kontrole kıyasla revertant koloni sayılarında en az 1 doz için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın ortaya çıkma olasılığı göz önünde bulundurularak yapılmıştır.

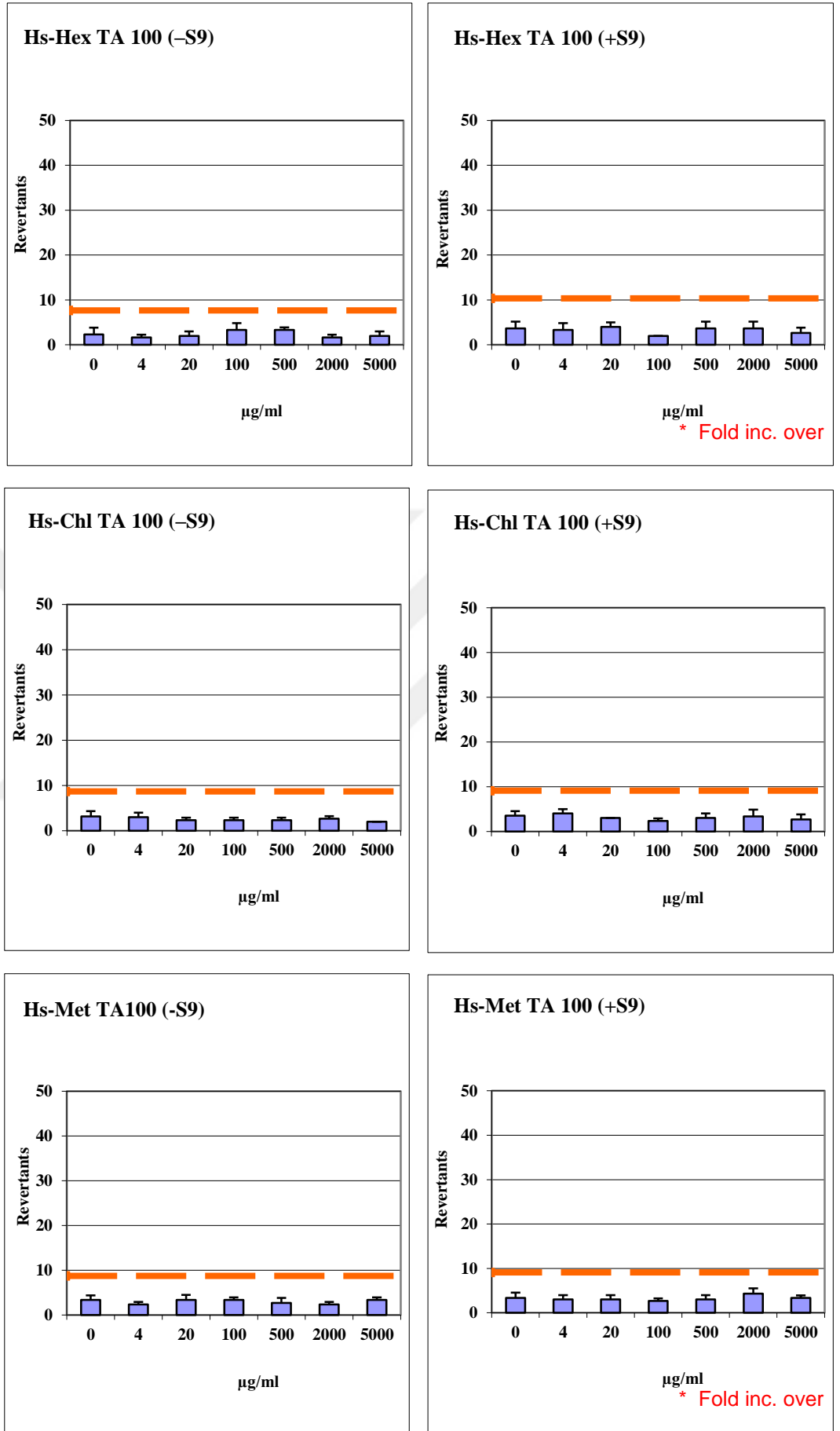
Bu sonuçlara göre kahverengi alg örnekleri incelendiğinde (Çizelge 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.18; Şekil 3.25, 3.26, 3.27 ve 3.28), Hex ve Chl ekstreleri suşlar üzerinde herhangi bir antimutajenik etki göstermezken, Hs-Met örneği 2000 ve 5000 µg/mL konsantrasyonda TA 98, TA 100 ve TA 1537 üzerinde +S9'lu ve –S9'suz olarak doz artışına bağlı olarak bir artış gösterecek şekilde istatistiksel olarak zayıf bir aktivite sergilemiştir. Yeşil alg ekstreleri incelendiğinde (Çizelge 3.17, 3.18, 3.19 ve 3.20; Şekil 3.29, 3.30, 3.31 ve 3.32), TA 98 ve TA 1535 suşlarında herhangi bir etkinlik göstermediği bulunmuştur. Bununla birlikte, Chl ekstresi TA 100 suşlarında –S9'suz da 500, 2000 ve 5000 µg/mL, +S9'lu da ise 5000 µg/mL konsantrasyonlarda ve TA 1537 suşlarında ise sadece –S9'suz ortamda 20 µg/mL'da zayıf dereceli aktivite gösterdiği tespit edilirken, Met ekstreleri TA 100 +S9'da 20 ve 100 µg/mL ile TA 1537'de –S9'suz da 500, 2000 ve 5000 µg/mL ve +S9'lu da 20 ve 100 µg/mL konsantrasyonların da zayıf dereceli aktivite göstermiştir. Kırmızı alg ekstrelerin de ise Hex ekstresi TA 98 +S9'da 500, 2000 ve 5000 µg/mL ile TA 100'de +S9'lu da 4 µg/mL ve –S9'suz da 500 ve 2000 µg/mL konsantrasyonların da zayıf dereceli etkinlik göstermiştir. Chl ekstrelerine bakıldığında TA 98 –S9'da 20 ve 100 ile TA 1535'de –S9'suz 500-2000, S9'lu da 20-100 µg/mL konsantrasyonların da zayıf dereceli aktivite sergilemiştir. Met ekstreleri ise sadece TA 1535 –S9'suz da 500, 2000 ve 5000 ile +S9'lu da 5000 µg/mL konsantrasyonların da istatistiksel olarak anlamlı fakat zayıf dereceli aktivite gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.21, 3.22, 3.23 ve 3.24; Şekil 3.33, 3.34, 3.35 ve 3.36).



Şekil 3.25 *H.scoparia* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 98 Suşları (-S9)(+S9)

Çizelge 3.16 *H.scoparia Salmonella typhimurium* / Mikrozoom Mutajenite Denemesinde TA 100
Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları

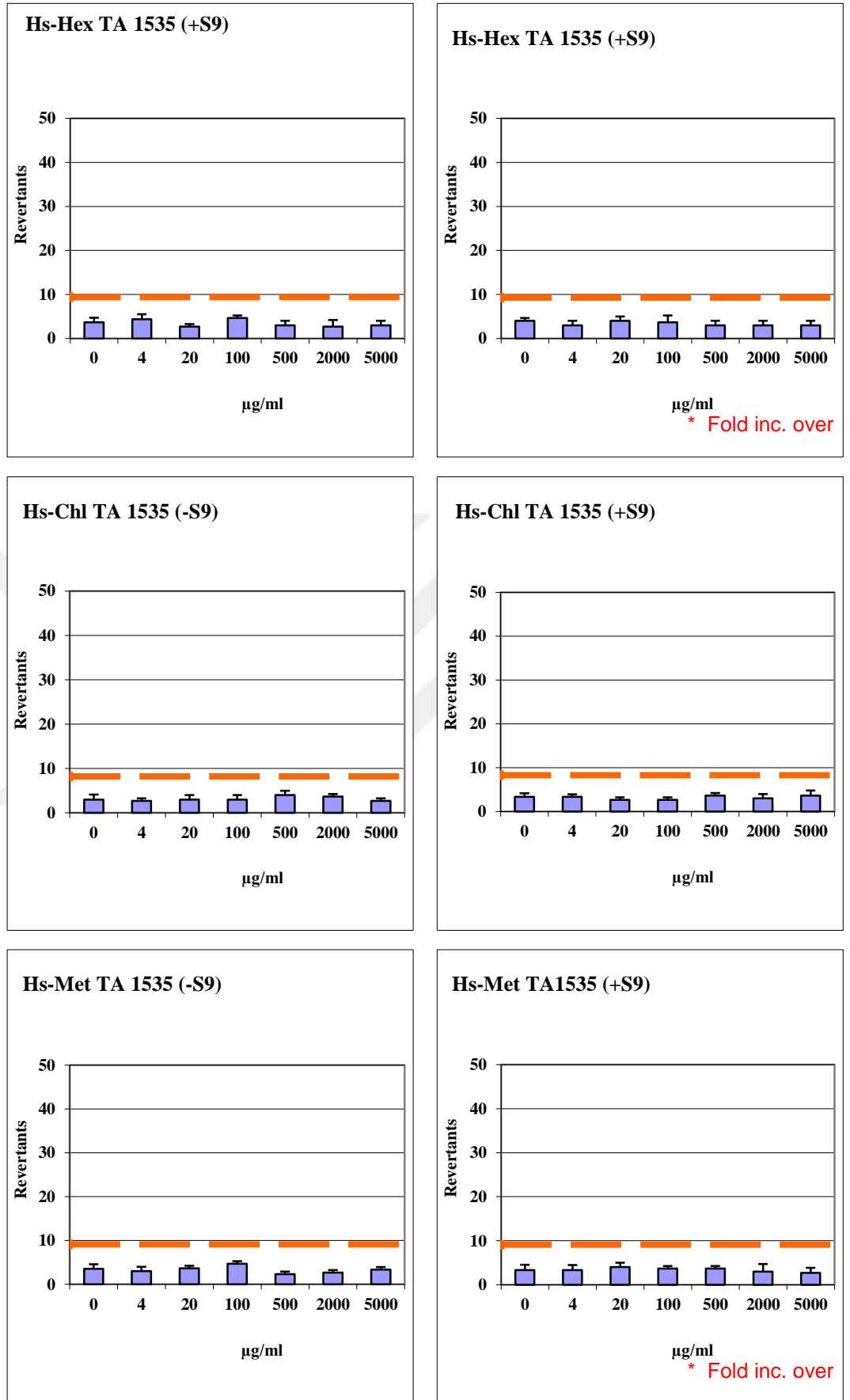
Kons. (µg/m L)	Hex						Chl						Met					
	TA 100-S9			TA 100 +S9			TA 100-S9			TA 100+ S9			TA 100-S9			TA 100+ S9		
	Tekrar																	
4	2	1	2	2	5	3	4	3	2	5	4	3	3	2	2	4	2	3
20	1	3	2	3	5	4	2	2	3	3	3	3	4	4	2	4	3	2
100	5	3	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	3	3	4	3	2	3
500	3	3	4	4	2	5	2	2	3	4	3	2	2	2	4	2	3	4
2000	2	2	1	5	2	4	3	3	2	5	3	2	3	2	2	5	3	5
5000	1	3	2	2	4	2	2	2	2	4	2	2	3	4	3	4	3	3
Pozitif Kont.	48	48	48	46	47	47	46	47	48	48	48	47	48	47	47	48	48	48
Hex																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)										
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9									
Negatif Kontrol	6	1,50	1,83	0,55	0,75													
4	3	1,00	1,33	0,00	0,58	0,49	0,52	0,0852	0,1753									
20	3	1,33	1,33	0,58	0,58	0,65	0,52	0,3423	0,1753									
100	3	2,33	1,67	1,53	0,58	1,14	0,64	0,1248	0,3743									
500	3	1,33	1,33	0,58	0,58	0,65	0,52	0,3423	0,1753									
2000	3	1,00	1,33	0,00	0,58	0,49	0,52	0,0852	0,1753									
5000	3	1,00	1,33	0,00	0,58	0,49	0,52	0,0852	0,1753									
Pozitif Kontrol	3	47,67	45,33	0,58	1,53													
Chl																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)										
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9									
Negatif Kontrol	6	1,83	1,83	0,41	0,75													
4	3	1,33	1,67	0,58	0,58	0,59	0,64	0,0852	0,3743									
20	3	1,33	1,67	0,58	0,58	0,59	0,64	0,3131	0,3743									
100	3	1,67	1,67	0,58	0,58	0,74	0,64	0,0852	0,3743									
500	3	1,33	1,67	0,58	0,58	0,59	0,64	0,0852	0,3743									
2000	3	1,33	1,67	0,58	0,58	0,59	0,64	0,0852	0,3743									
5000	3	1,33	1,67	0,58	0,58	0,59	0,64	0,0852	0,3743									
Pozitif Kontrol	3	46,67	47,67	0,58	0,58													
Met																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)										
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9									
Negatif Kontrol	6	1,83	1,83	0,75	0,75													
4	3	1,67	1,33	0,58	0,58	0,64	0,52	0,3743	0,1753									
20	3	1,67	1,33	0,58	0,58	0,64	0,52	0,3743	0,1753									
100	3	2,00	1,67	1,00	0,58	0,77	0,64	0,3924	0,3743									
500	3	2,33	3,00	0,58	1,00	0,90	1,16	0,1753	0,0437*									
2000	3	3,67	3,33	0,58	0,58	1,42	1,29	0,0040*	0,0100*									
5000	3	3,33	4,00	0,58	1,00	1,29	1,55	0,0100*	0,0039*									
Pozitif Kontrol	3	47,67	45,33	0,58	1,53													



Şekil 3.26 *H.scoparia* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 100 Suşları (-S9)(+S9)

Çizelge 3.17 *H.scoparia Salmonella typhimurium* / Mikrozoom Mutajenite Denemesinde TA 1535 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları

Konsantrasyon (µg/mL)	Hex						Chl						Met					
	TA 98-S9			TA 98 +S9			TA 98-S9			TA 98+ S9			TA 98-S9			TA 98+ S9		
	Tekrar																	
4	5	5	3	4	3	2	3	2	3	3	3	4	4	2	3	4	2	4
20	3	3	2	4	5	3	4	3	2	3	2	3	3	4	4	4	5	3
100	4	5	5	2	5	4	4	2	3	2	3	3	5	5	4	3	4	4
500	3	2	4	2	3	4	5	3	4	4	4	3	2	2	3	4	4	3
2000	4	3	1	3	4	2	4	3	4	2	4	3	3	3	2	2	5	2
5000	2	4	3	3	4	2	2	3	3	3	3	5	4	3	3	4	2	2
Pozitif Kontrol	46	47	48	47	48	48	48	48	47	47	47	47	48	48	47	48	48	48
Hex																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)										
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9									
		Negatif Kontrol	6	3,67	4,00	1,03	0,63											
4	3	4,33	3,00	1,15	1,00	0,49	0,82	0,1137	0,3131									
20	3	2,67	4,00	0,58	1,00	0,57	0,72	0,1831	0,0852									
100	3	4,67	3,67	0,58	1,53	0,57	0,72	0,1831	0,0852									
500	3	3,00	3,00	1,00	1,00	0,65	0,72	0,3423	0,0852									
2000	3	2,67	3,00	1,53	1,00	0,57	0,93	0,1831	0,3610									
5000	3	3,00	3,00	1,00	1,00	0,57	0,82	0,2124	0,3131									
Pozitif Kontrol	3	47,00	47,67	1,00	0,58													
Chl																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)										
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9									
		Negatif Kontrol	6	3,00	3,33	1,10	0,82											
4	3	2,67	3,33	0,58	0,58	0,65	0,80	0,3219	0,5000									
20	3	3,00	2,67	1,00	0,58	0,73	0,64	0,5000	0,1262									
100	3	3,00	2,67	1,00	0,58	0,73	0,64	0,5000	0,1262									
500	3	4,00	3,67	1,00	0,58	0,98	0,88	0,1137	0,2763									
2000	3	3,67	3,00	0,58	1,00	0,90	0,72	0,1831	0,3030									
5000	3	2,67	3,67	0,58	1,15	0,65	0,88	0,3219	0,3131									
Pozitif Kontrol	3	47,67	47,00	0,58	0,00													
Met																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)										
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9									
		Negatif Kontrol	6	3,50	3,33	1,05	1,21											
4	3	3,00	3,33	1,00	1,15	0,60	0,60	0,1431	0,1431									
20	3	3,67	4,00	0,58	1,00	0,77	0,60	0,5000	0,1431									
100	3	4,67	3,67	0,58	0,58	0,60	0,68	0,1431	0,3219									
500	3	2,33	3,67	0,58	0,58	0,86	0,77	0,2909	0,5000									
2000	3	2,67	3,00	0,58	1,73	0,68	0,77	0,2909	0,5000									
5000	3	3,33	2,67	0,58	1,15	0,77	0,86	0,5000	0,3423									
Pozitif Kontrol	3	47,67	48,00	0,58	0,00													

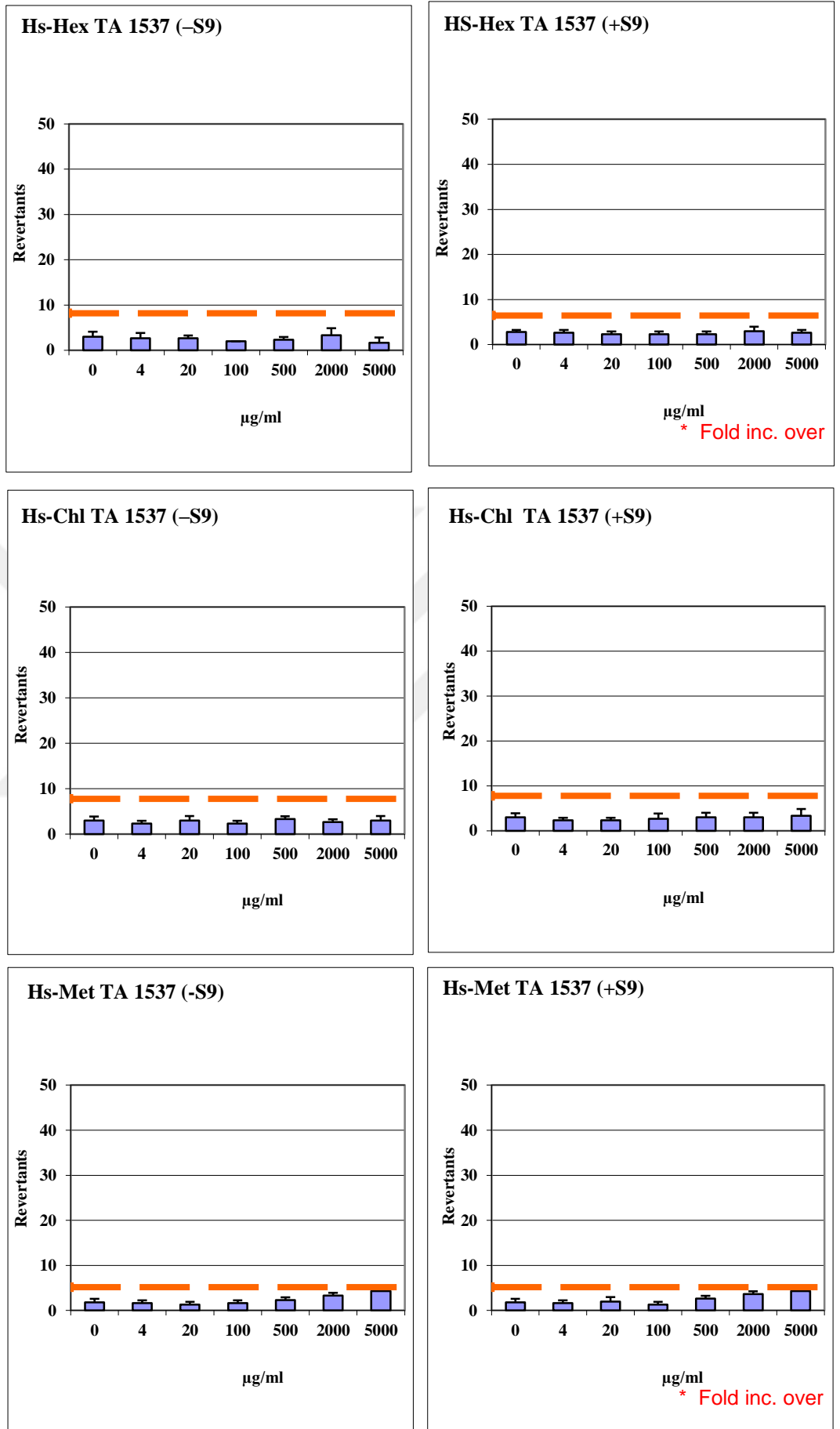


Şekil 3.27 *H.scoparia* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 1535 Suşları (-S9)(+S9)

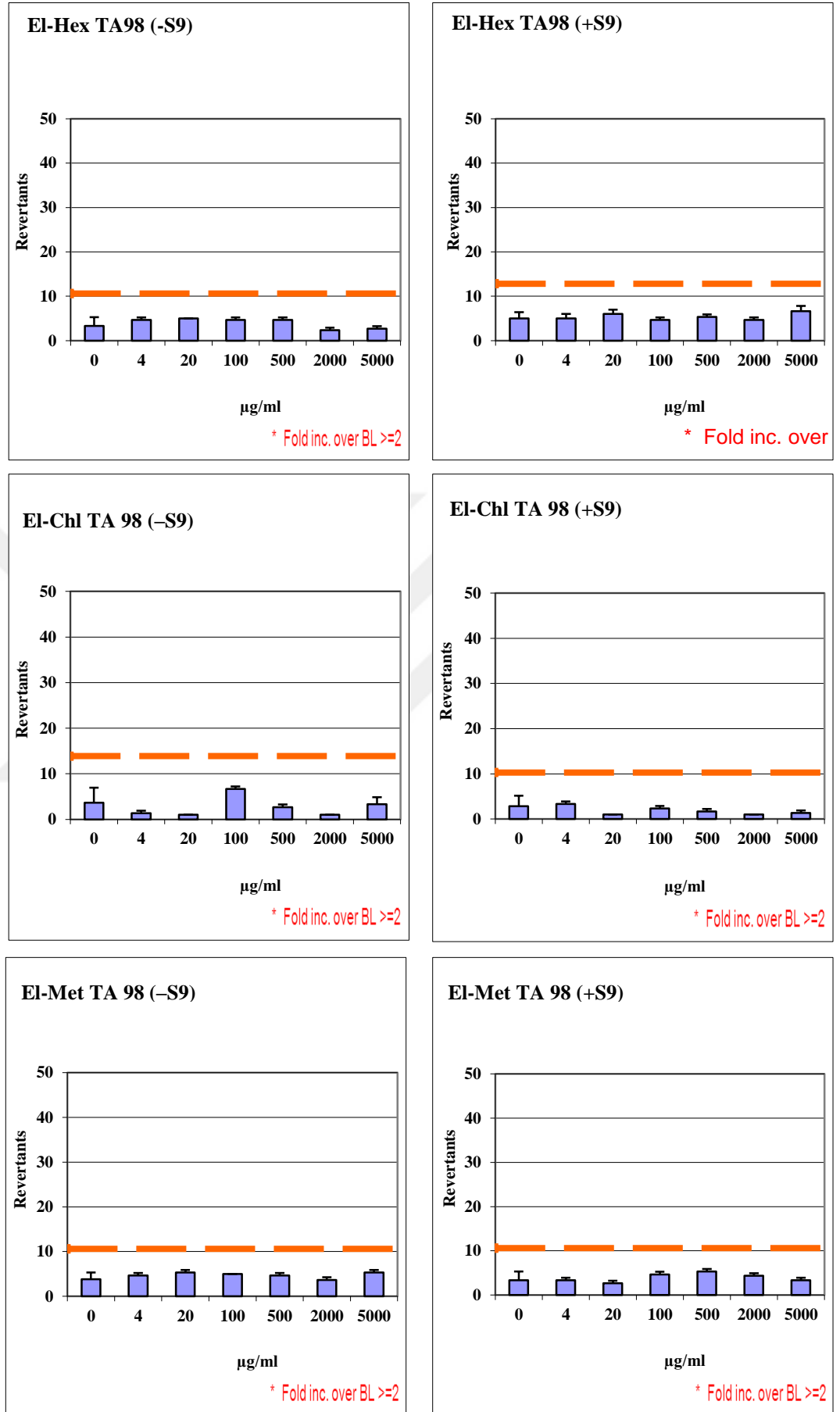
Çizelge 3.18 *H.scoparia Salmonella typhimurium* / Mikrozoom Mutajenite Denemesinde TA 1537

Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları

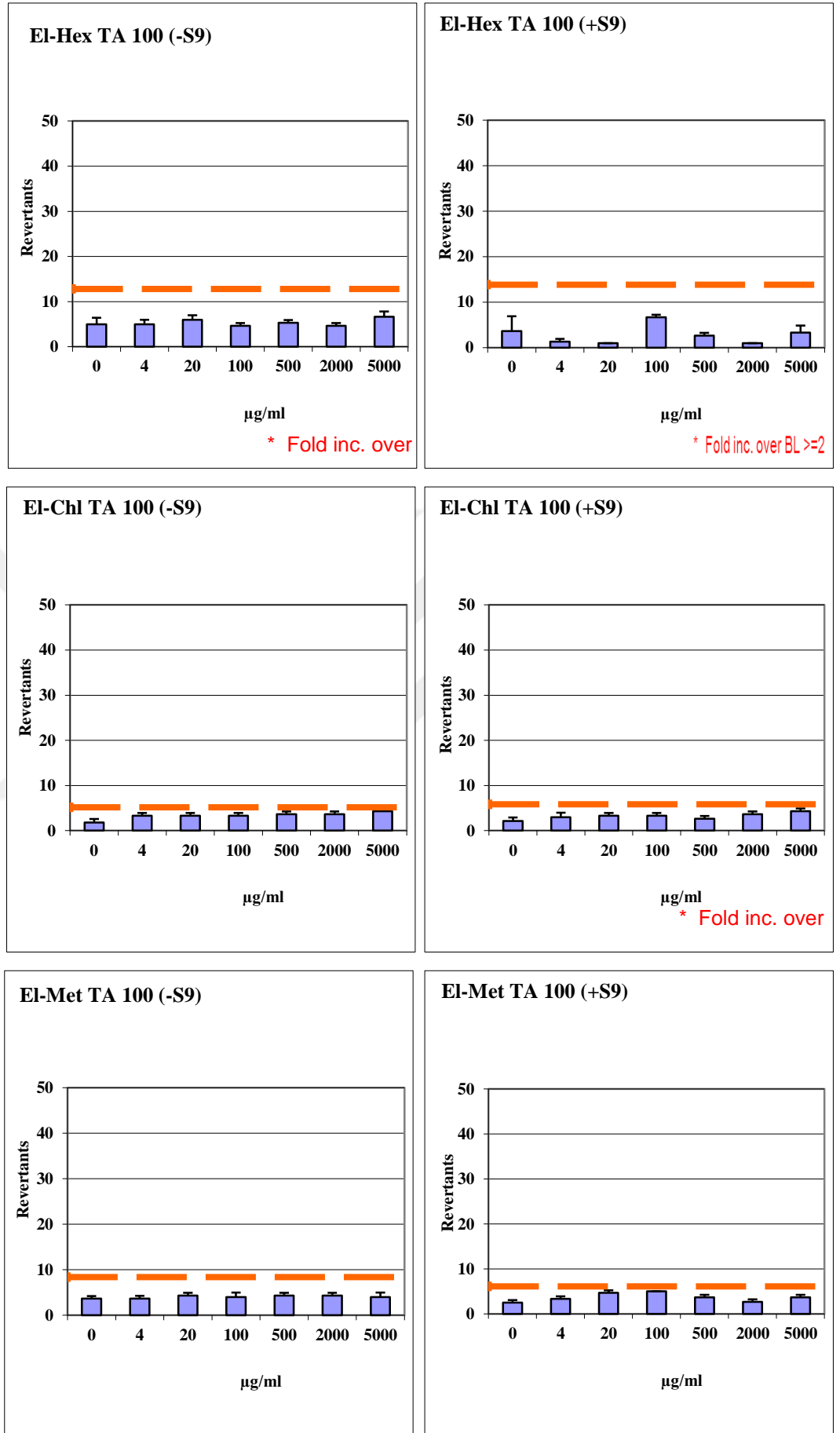
Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hex						Chl						Met					
	TA 1537-S9			TA 1537 +S9			TA 1537-S9			TA 1537+ S9			TA 1537-S9			TA 1537+ S9		
	Tekrar																	
4	3	1	2	3	2	3	2	3	2	2	3	2	2	1	2	2	1	2
20	2	2	3	2	2	3	4	3	2	3	2	2	2	1	1	3	2	1
100	3	2	2	2	2	3	3	2	2	4	2	2	2	1	2	1	2	1
500	4	2	2	2	2	3	3	4	3	3	4	2	3	2	2	3	2	3
2000	2	2	3	2	3	4	3	3	2	3	2	4	4	3	3	4	3	4
5000	3	3	1	3	3	2	4	3	2	2	3	5	4	5	4	4	4	5
Pozitif Kontrol	48	47	48	48	47	48	46	47	47	48	48	47	48	46	48	47	44	45
Hex																		
Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler				Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)								
		-S9		+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9							
		Negatif Kontrol	6	3,67		4,00		1,03	0,63									
4	3	4,33		3,00		1,15	1,00	0,60	0,60	0,1431	0,1431							
20	3	2,67		4,00		0,58	1,00	0,77	0,60	0,5000	0,1431							
100	3	4,67		3,67		0,58	1,53	0,60	0,68	0,1431	0,3219							
500	3	3,00		3,00		1,00	1,00	0,86	0,77	0,2909	0,5000							
2000	3	2,67		3,00		1,53	1,00	0,68	0,77	0,2909	0,5000							
5000	3	3,00		3,00		1,00	1,00	0,77	0,86	0,5000	0,3423							
Pozitif Kontrol	3	47,00		47,67		1,00	0,58											
Chl																		
Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler				Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)								
		-S9		+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9							
		Negatif Kontrol	6	3,00		3,33		1,10	0,82									
4	3	2,67		3,33		0,58	0,58	0,65	0,80	0,3219	0,5000							
20	3	3,00		2,67		1,00	0,58	0,73	0,64	0,5000	0,1262							
100	3	3,00		2,67		1,00	0,58	0,73	0,64	0,5000	0,1262							
500	3	4,00		3,67		1,00	0,58	0,98	0,88	0,1137	0,2763							
2000	3	3,67		3,00		0,58	1,00	0,90	0,72	0,1831	0,3030							
5000	3	2,67		3,67		0,58	1,15	0,65	0,88	0,3219	0,3131							
Pozitif Kontrol	3	47,67		47,00		0,58	0,00											
Met																		
Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler				Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)								
		-S9		+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9							
		Negatif Kontrol	6	1,83		1,83		0,75	0,75									
4	3	1,67		1,67		0,58	0,58	0,64	0,73	0,3743	0,3743							
20	3	1,33		2,00		0,58	1,00	0,52	0,88	0,1753	0,3924							
100	3	1,67		1,33		0,58	0,58	0,64	0,81	0,3743	0,1753							
500	3	2,33		2,67		0,58	0,58	0,90	0,81	0,1753	0,0698							
2000	3	3,33		3,67		0,58	0,58	1,29	0,66	0,0100*	0,0040*							
5000	3	4,33		4,33		0,58	0,58	1,68	0,59	0,0008*	0,0008*							
Pozitif Kontrol	3	47,33		45,33		1,15	1,53											



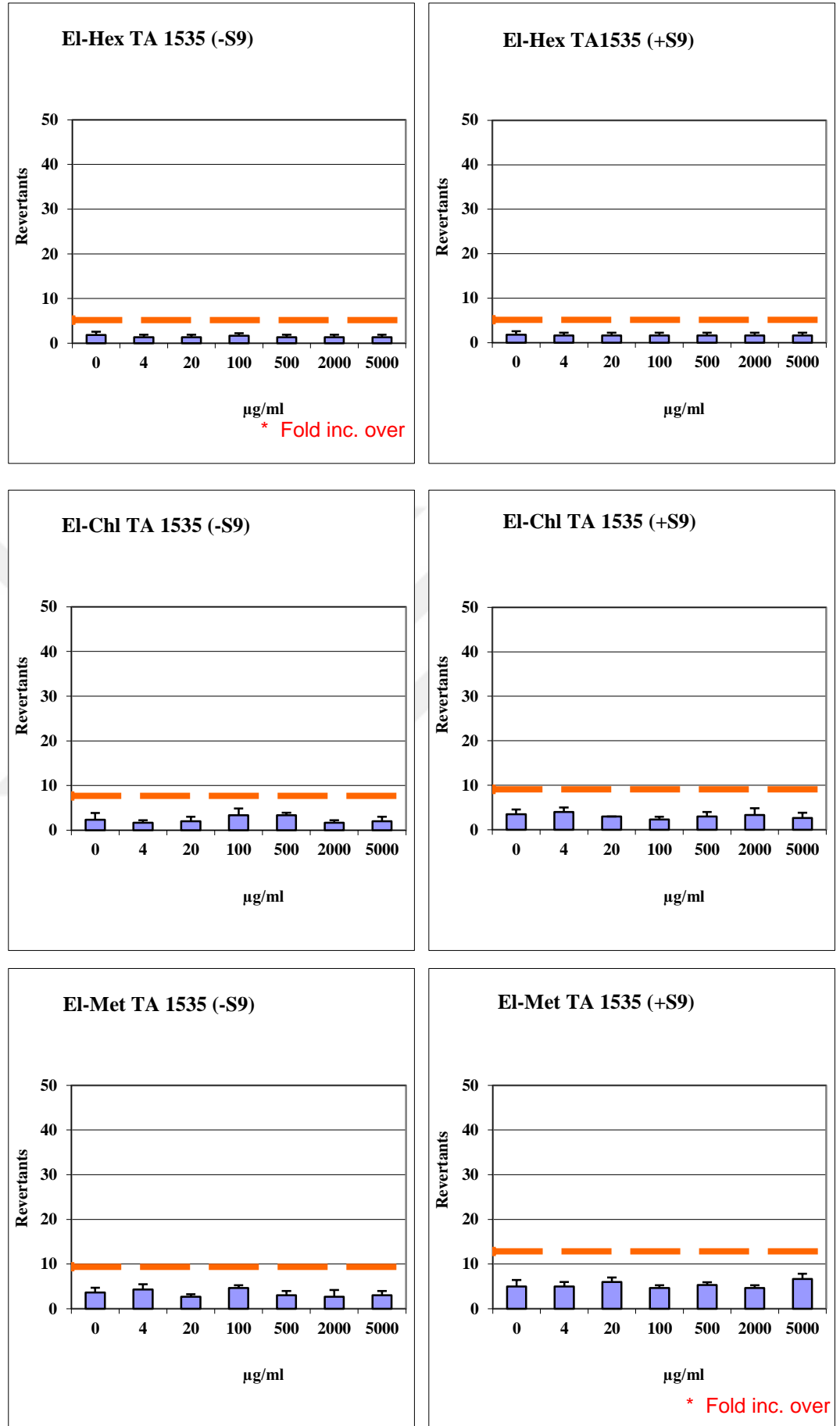
Şekil 3.28 *H.scoparia* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 1537 Suşları (-S9)(+S9)



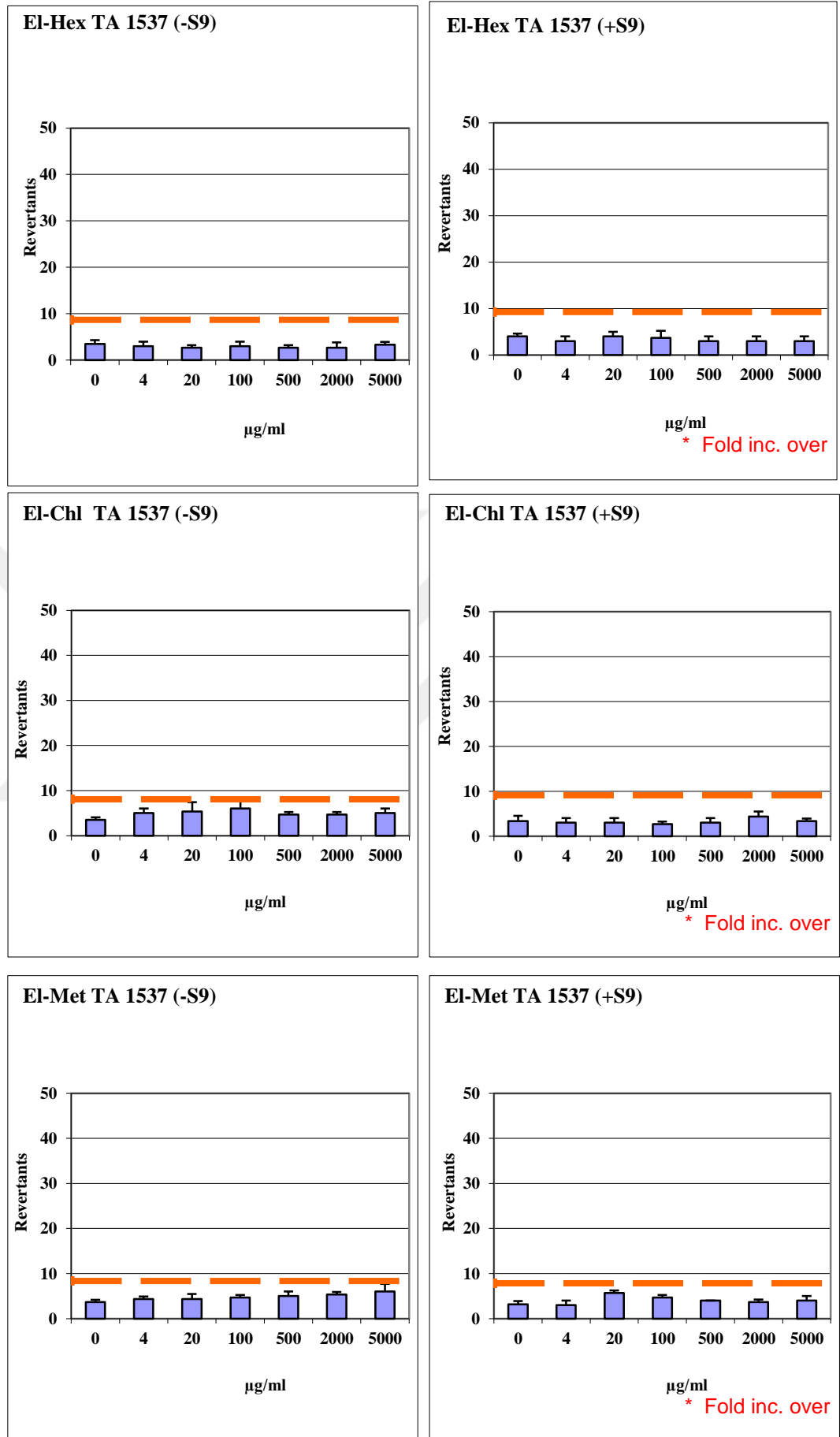
Şekil 3.29 *E.linza* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 98 Suşları (-S9)(+S9)



Şekil 3.30 *E. linza* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 100 Suşları (-S9)(+S9)



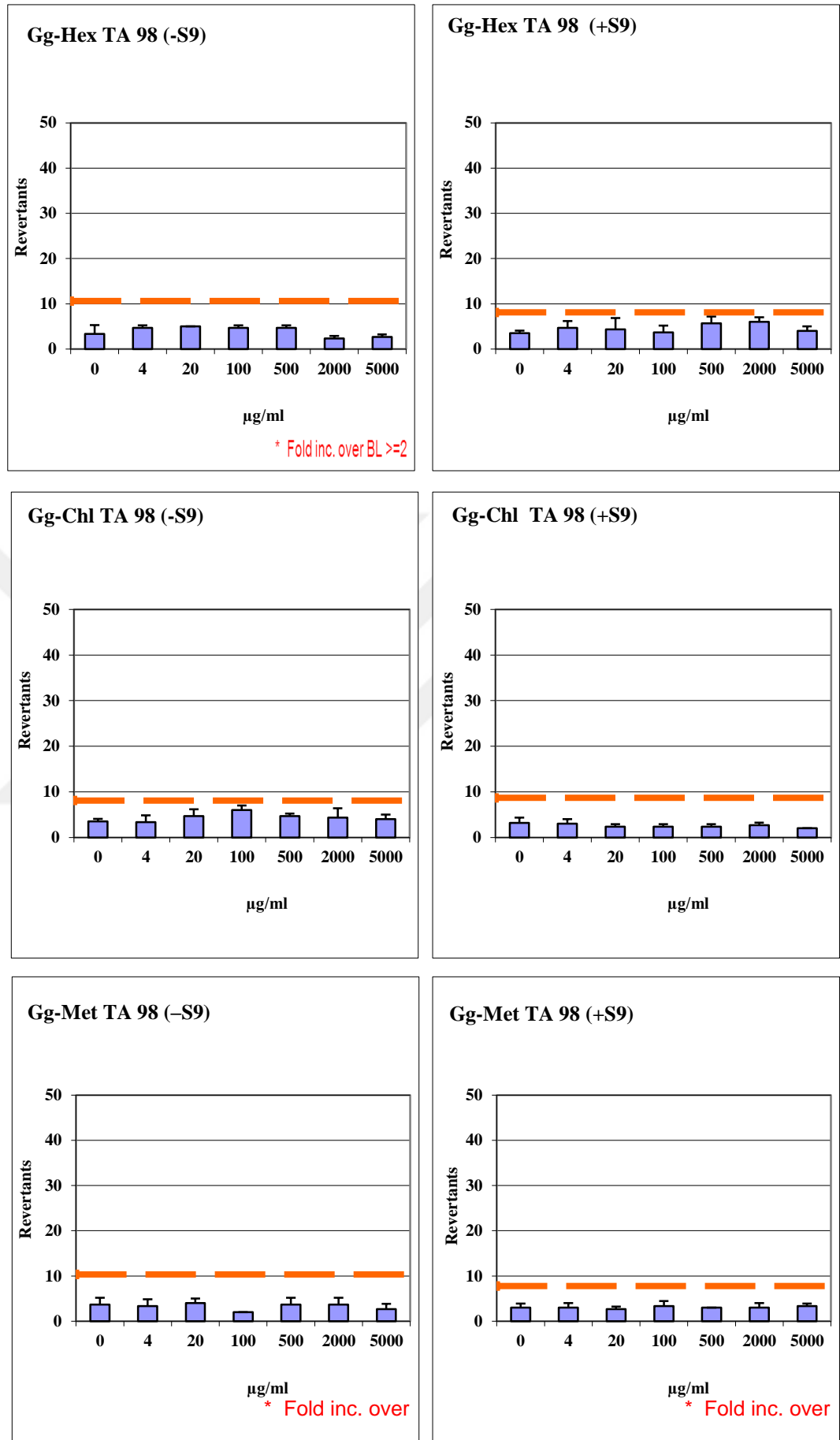
Şekil 3.31 *E.linza* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 1535 Suşları (-S9)(+S9)



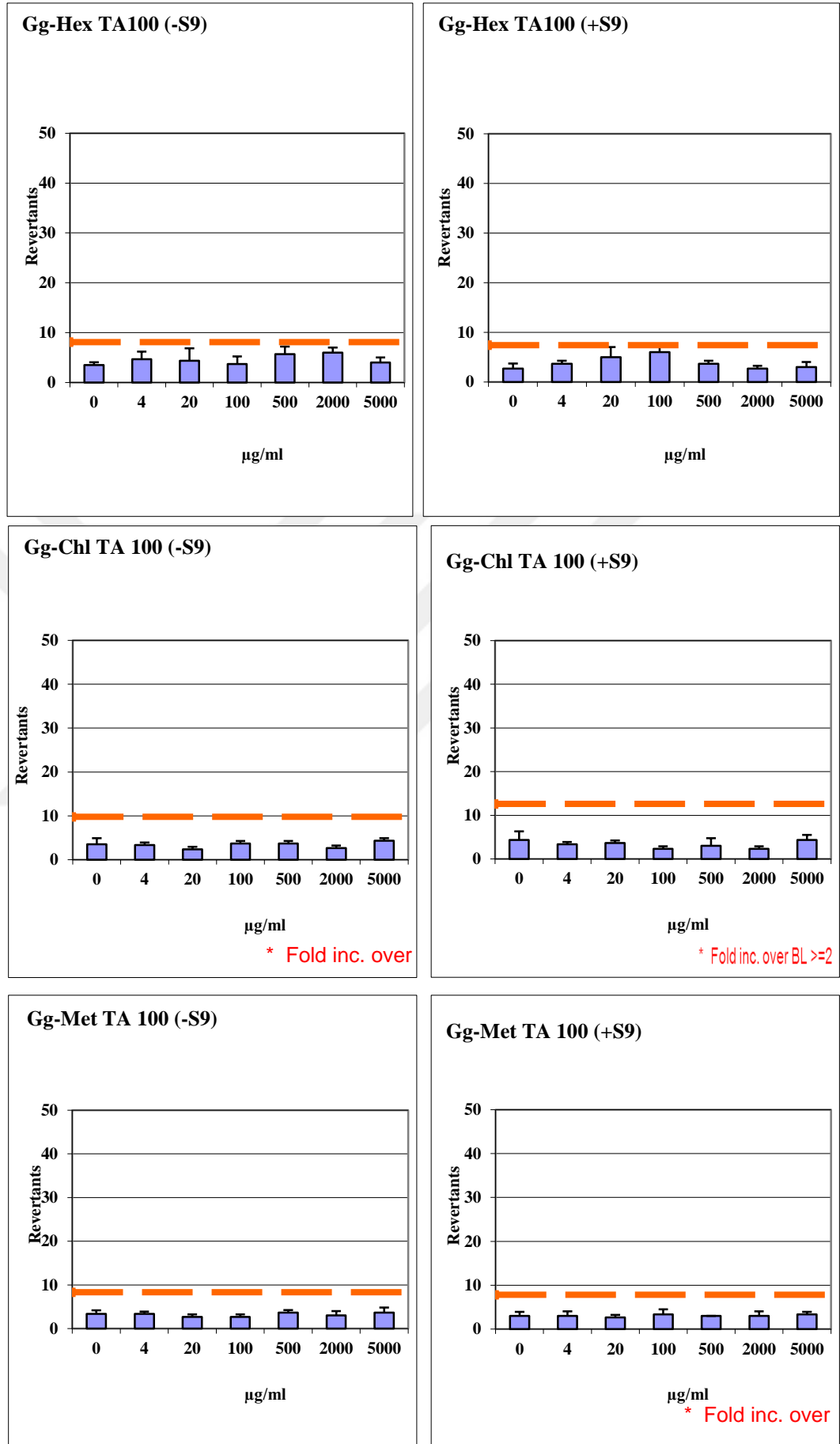
Şekil 3.32 *E. linza* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 1537 Suşları (-S9)(+S9)

Çizelge 3.23 *G.gracilis Salmonella typhimurium* / Mikrozoom Mutajenite Denemesinde TA 98 Suşundan Elde Edilen Revertant Koloni Sayıları ve Mutajenite Denemesinin Sonuçları

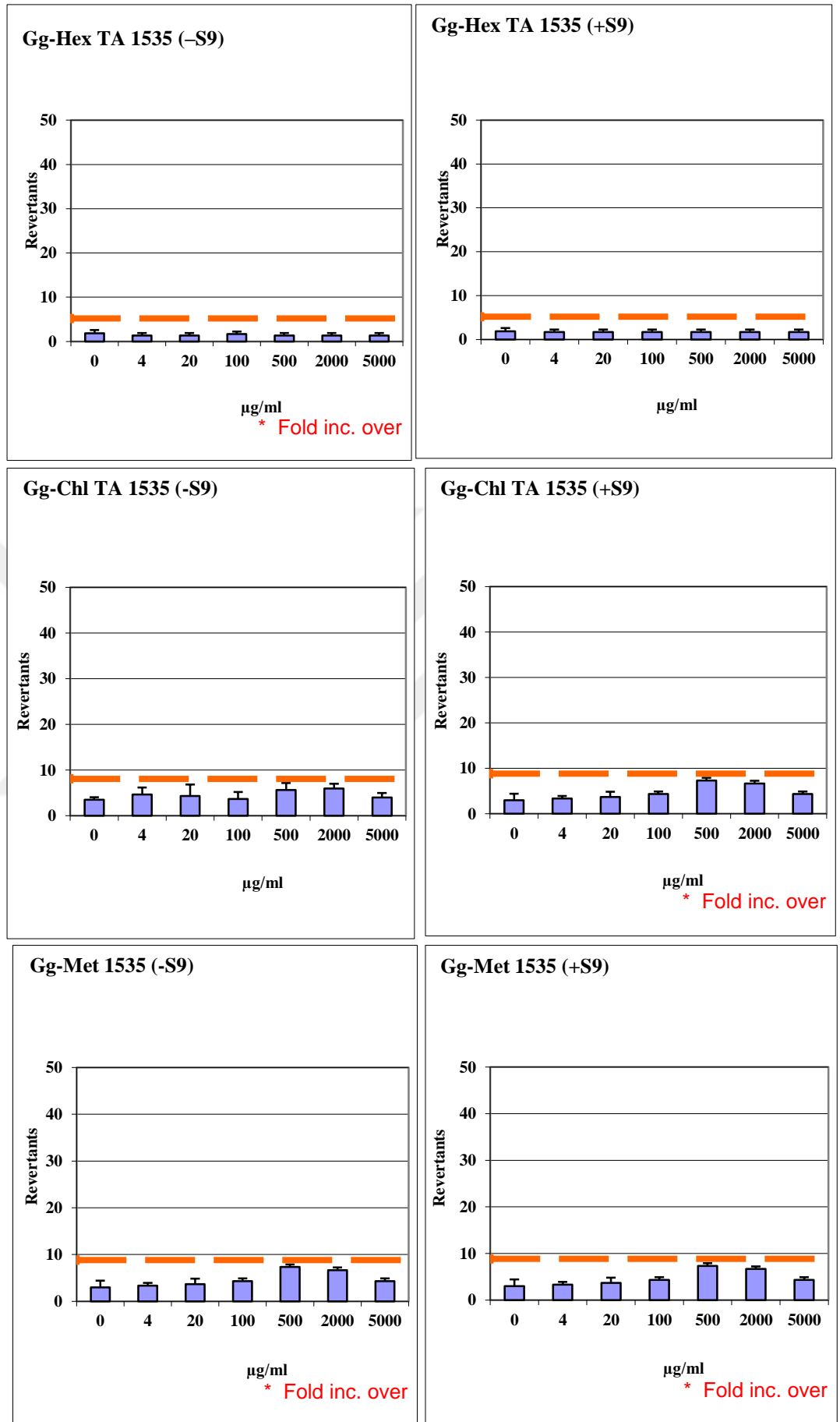
Konsantrasyon (µg/mL)	Hex						Chl						Met					
	TA 98-S9			TA 98 +S9			TA 98-S9			TA 98+ S9			TA 98-S9			TA 98+ S9		
	Tekrar																	
4	3	4	2	5	3	6	3	5	2	2	3	2	4	5	4	4	2	3
20	3	2	3	2	4	7	6	3	5	3	2	2	5	5	3	5	6	6
100	4	3	2	2	5	4	7	5	6	4	2	2	4	5	5	5	4	5
500	2	3	3	6	4	4	5	4	5	3	4	2	6	4	5	4	4	4
2000	2	4	2	5	6	5	6	2	5	3	2	4	5	6	5	4	3	4
5000	3	4	3	4	7	7	5	4	3	2	3	5	4	7	7	4	3	5
Pozitif Kontrol	48	46	46	48	46	48	46	47	47	48	48	47	48	46	48	47	44	45
Hex																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler				Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)								
		-S9		+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9							
		Negatif Kontrol	6	2,83		3,50		1,41	0,55									
4	3	3,33		4,67		1,00	1,53	0,61	1,15	0,2515	0,0611							
20	3	1,00		4,33		1,00	2,52	0,42	1,07	0,1222	0,2174							
100	3	2,33		3,67		0,58	1,53	0,90	0,91	0,1222	0,4045							
500	3	1,67		4,67		0,58	1,15	0,76	1,15	0,2515	0,0349*							
2000	3	1,00		5,33		0,58	0,58	0,76	1,32	0,1222	0,0012*							
5000	3	1,33		6,00		1,15	1,73	0,94	1,48	0,3016	0,0056*							
Pozitif Kontrol	3	46,33		47,33		1,53	1,15											
Chl																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler				Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)								
		-S9		+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9							
		Negatif Kontrol	6	3,50		3,17		0,55	0,89			0,4045	0,2431					
4	3	3,33		3,00		1,53	0,58	0,82	0,60	0,0611	0,3531							
20	3	4,67		2,33		1,53	0,58	1,15	0,60	0,0008*	0,3219							
100	3	6,00		2,33		1,00	1,15	1,48	0,68	0,0105*	0,3100							
500	3	4,67		2,33		0,58	1,00	1,15	0,77	0,1804	0,5000							
2000	3	4,33		2,67		2,08	1,00	1,07	0,77	0,1753	0,3423							
5000	3	4,00		2,00		1,00	1,53	0,99	0,86	0,4045	0,2431							
Pozitif Kontrol	3	46,67		47,00		0,58	0,58											
Met																		
Konsantrasyon (µg/mL)	N	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler				Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)								
		-S9		+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9							
		Negatif Kontrol	6	3,67		3,00		0,75	0,41									
4	3	3,33		3,00		0,58	0,58	0,79	0,67	3,33	3,00							
20	3	4,00		2,67		0,58	0,58	0,61	0,58	4,00	2,67							
100	3	2,00		3,33		0,58	0,58	0,59	0,76	2,00	3,33							
500	3	3,67		3,00		0,58	0,58	0,41	0,67	3,67	3,00							
2000	3	3,67		3,00		0,58	0,58	0,61	0,57	3,67	3,00							
5000	3	2,67		3,33		0,58	0,58	0,67	0,86	2,67	3,33							
Pozitif Kontrol	3	46,67		47,00		1,53	0,58											



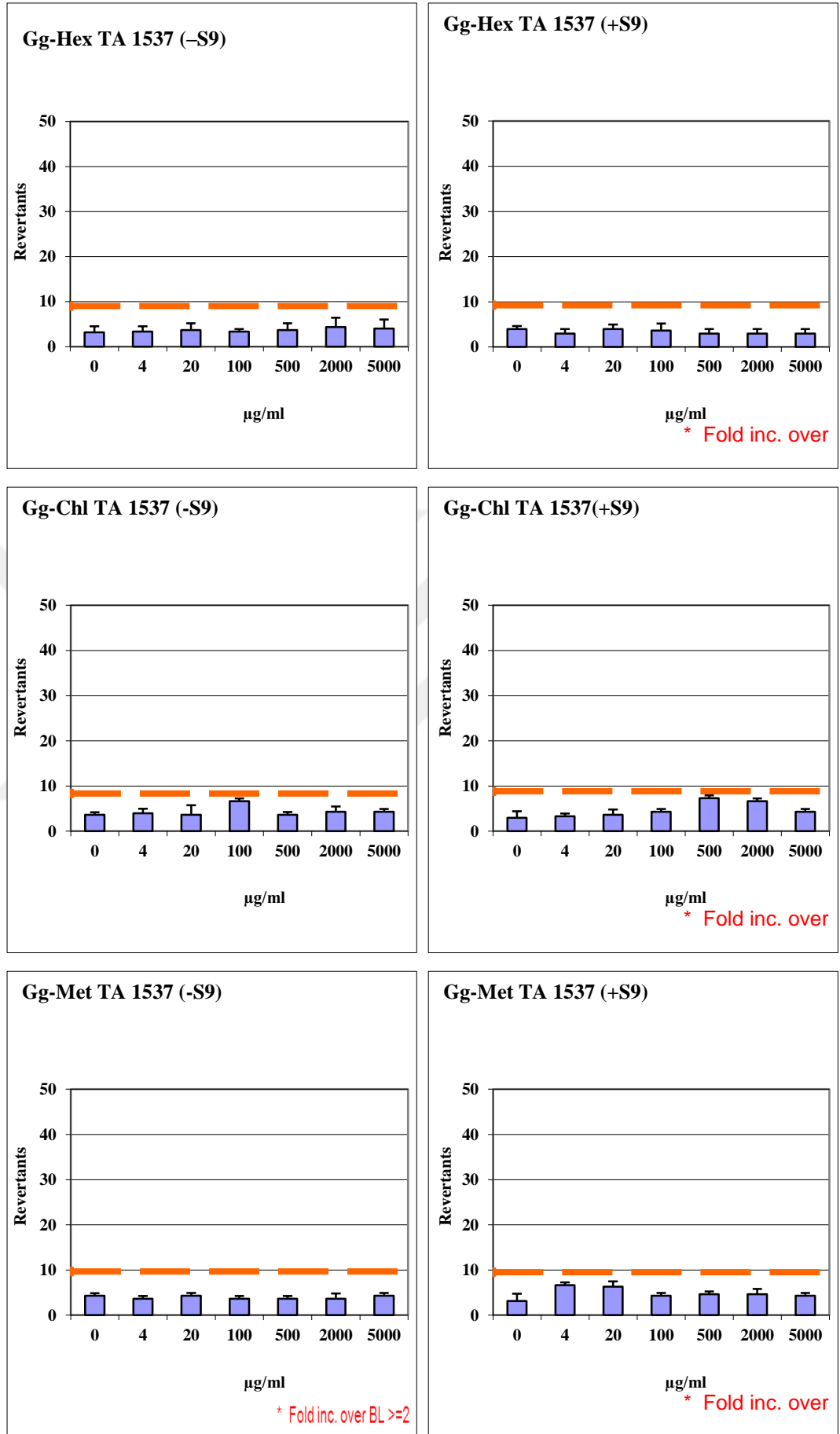
Şekil 3.33 *G.gracilis* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 98 Suşları (-S9)(+S9)



Şekil 3.34 *G. gracilis* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 100 Suşları (-S9)(+S9)



Şekil 3.35 *G.gracilis* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 1535 Suşları (-S9)(+S9)



Şekil 3.36 *Ggracilis* Hex, Chl ve Met Ekstrelerinin *S. typhimurium* TA 1537 Suşları (-S9)(+S9)

3.8. *In vivo* test sonuçları

3.8.1. Total vücut ağırlıkları ile ilgili bulgular

Çalışma süresince ve sonunda farelerin 0, 7 ve 14. gün ağırlıkları not edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.27). Deneme sonunda, kontrol grubunda deney öncesi ve deney sonrası farelerin vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında farelerin vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Kadmiyum grubunda deney öncesi ve sonrası farelerin vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, farelerin vücut ağırlıklarında düşüş görülmüş ve istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmiştir. Yalnız alg uygulama gruplarında kontrole benzer sonuçlar izlenmiş ve deney sonrası vücut ağırlığı, istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. Protaktif etkilerin değerlendirildiği gruplarda, doz artışına bağlı olarak ağırlık kaybının baskılandığı görülmüştür. Alg 900 mg/kg+Cd grubunda artış gösteren vücut ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı iken, alg 600 mg/kg+Cd grubundaki artış anlamlı fark oluşturmamıştır. Alg 300 mg/kg+Cd ise diğer gruplara kıyasla vücut ağırlıklarında düşüşler saptanmış fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Çizelge 3.27 Farelerin total vücut ağırlığı ortalamaları

Grup	Vücut Ağırlıkları (gr) (ort ±ss)		
	0.gün	7.gün	14.gün
Kontrol	30.92±0.96	31.21±0,82	32.50±0.70*
Alg 900 mg/kg	30.66±1.65	31,17±1,48	31.25±1.57
Alg 900 mg/kg +Cd	31.03±1.96	31,70±1,38	32.14±1.65*
Alg 600 mg/kg +Cd	31.07±2.14	31,084±1,96	31.61±1.88*
Alg 300 mg/kg +Cd	31.14±2.71	31,03±2,87	30.87±2.93
Cd	31.62±1.63	30,67±1,52	30.23±1.32*

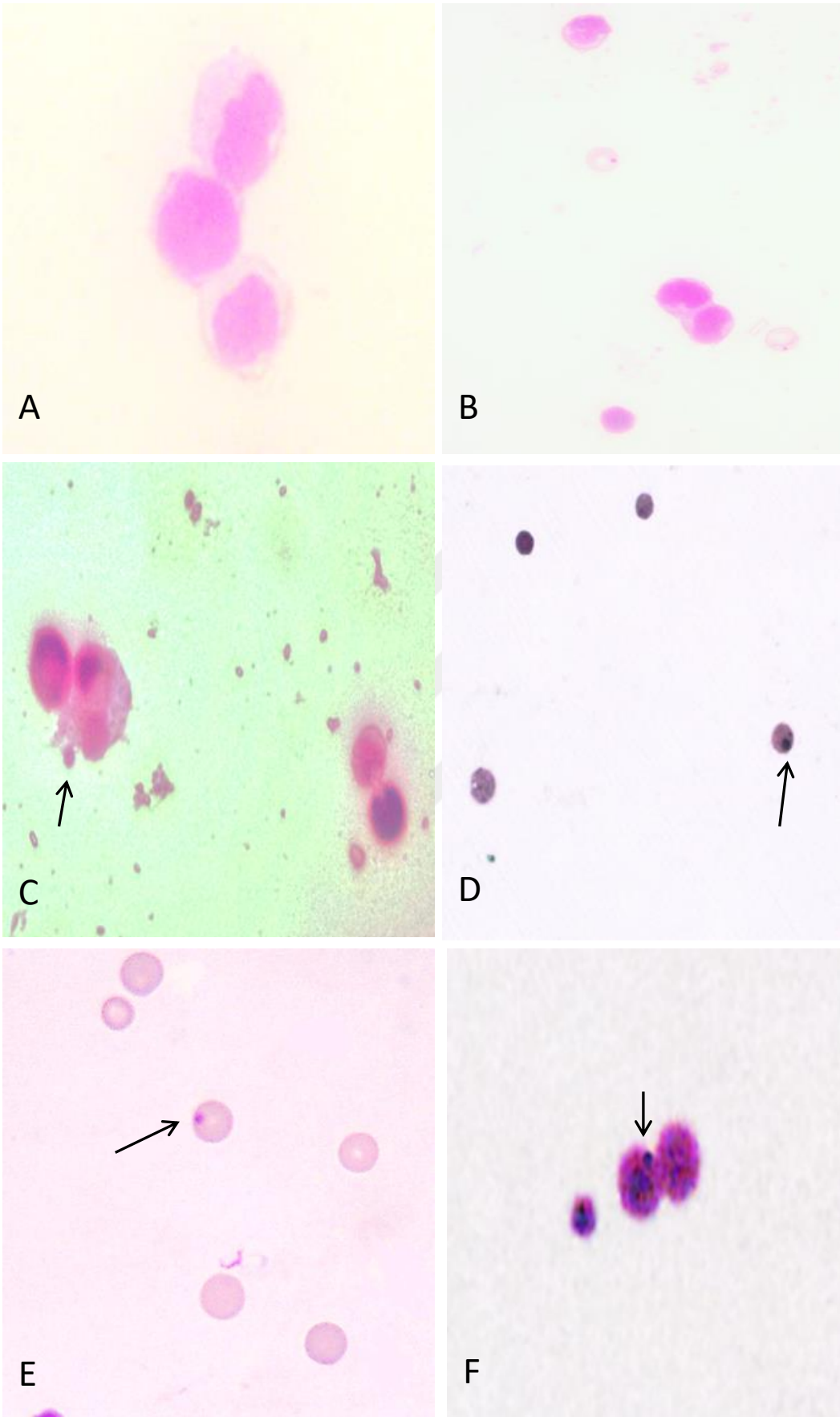
*Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (p<0,05)

3.8.2. Mikronukleus (MN) ve kromozom aberrasyon (KA) yöntemi

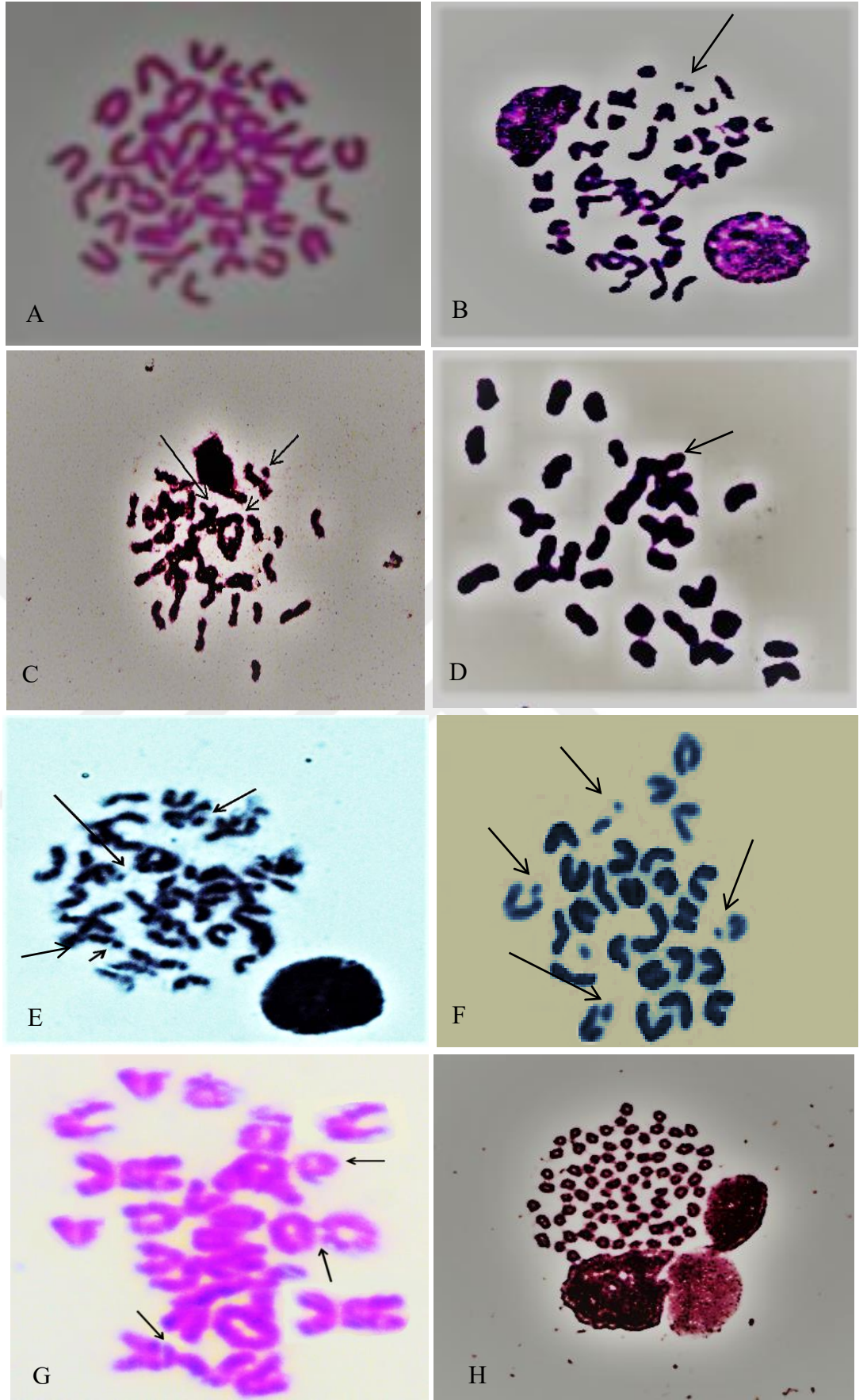
Mikronukleus testi kromozomal hasarın bir göstergesi olarak mutajenler ve klastojenlerin genotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde hassas bir biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Her bir konsantrasyon ve muamele süresi için 1000 eritrosit sayılmış, MN'lu hücreler belirlenerek, kontrole göre anlamlılığı test edilmiştir. Farelerden elde edilen verilere göre, kontrole karşılaştırıldığında kadmiyum uygulanan grupta MN'li hücre sayısında önemli artışlar gözlemlenirken, *H.scoparia*'nın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak MN hücre sayısında belirgin azalmalar tespit edilmiştir (Çizelge 3.26, şekil 3.37). Benzer sonuçlar KA testinde de gözlenmiştir. 400 metafaz plağı sayım sonucunda kontrol ve yalnız alg uygulamalarında anlamlı değişiklikler görülmezken, Cd istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. Protaktif etkilerin değerlendirildiği alg+Cd gruplarında doz artışına paralel KA sayılarında azalmalar gözlenmiştir. Özellikle alg 900+Cd olmak üzere alg 600+ Cd grubuyla birlikte istatistiksel olarak anlamlı azalışlar tespit edilirken, alg 300+Cd uygulamalarındaki azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 3.26, Şekil 3.38).

Çizelge 3.28 *H.scoparia*'nın farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş dişi fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen Mikronukleus ve Kromozom Aberrasyon sayıları (TCA: Total Kromozom Aberrasyon; MN: mikronukleus)

Grup	Kırık	Fragment	Gap	Ring	Diğer Anomaliler	Total TCA	% TCA	%MN (1000 hücre)
Kontrol	2	1	1	-	-	4	1,5	2,66
Alg(900mg/kg)	3	-	-	-	2	5	2,3	4,33
Alg(900mg/kg)+Cd	30	13	5	4	12	64	14	22,49
Alg(600mg/kg)+Cd	36	17	9	12	11	85	19	32,04
Alg(300mg/kg)+Cd	40	22	12	10	13	97	27	34,16
Cd	42	19	14	10	16	101	32	36,8



Şekil 3.37 Farelerin kemik iliği hücrelerinde görülen MN'lu (C, D, E ve F) ve MN'suz (A ve B) hücreler.



Şekil 3.38 Farelerin kemik iliğinde KA. A, Normal; B, (F); C, (F, R); D, (Disentrik, Aneuploidi); E, (KK, G, R); F, (F ve KK); G, (R, G); H, (Kromozom pulverizasyon). F:Fragment, R:Ring, KK: Kromatid kırığı, G:Gap.

4. TARTIŞMA

Deniz canlıları, rekabetçi ve düşmanca bir çevrede karmaşık topluluklar içinde yaşamını sürdürme mücadelesi vermektedir. Yaşadıkları çevre şartları, gelgitler, avlanma ve rekabet gibi pekçok ekolojik baskıya maruz kalmakta ve yanıt olarak kompleks sekonder metabolitleri üretmektedirler. Denizel ve tatlısu ekosistemlerinin birincil üretim kaynağını oluşturan algler, günümüze kadar hücreleri içerisindeki değerli metabolitleri nedeniyle, destek gıda olarak tüketilmelerinin yanında sahip oldukları renk pigmentleri, yağlar, yağ asitleri, polisakkaritler, kül ve proteinlerinin de antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antifungal, antianjiyogenik ve antienflamatuar gibi eczacılık etkinlikleri pek çok çalışmada kanıtlanmıştır (Bhadury and Wright, 2004; Gökpınar vd., 2013). Mevcut çalışmamızda zengin alg çeşitliliğine sahip Ege kıyılarından toplanan alg türlerinin farklı ekstraksiyon ürünlerinin mevcut antioksidan, antikanser, antianjiyogenik, antimutajenik ve antimikrobiyal potansiyellerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Organik solventler yardımıyla ekstraksiyon, fitokimyasal maddelerin bitki materyalinden elde edilmesi ve sonrasında kromatografik yöntemlerle izole edilmesi için esas adımdır. Ekstraksiyon verimi polarite, pH, sıcaklık, ekstraksiyon zamanı ve numunenin bileşimi ile kullanılan solvante bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmamızda, *H.scoparia* (Hs), *E.linza* (El) ve *G.gracilis* (Gg) alg ekstreleri aynı sıcaklık ve zaman aralığında %99.8 saflığa sahip hekzan, kloroform ve metanol kullanılarak elde edilmiştir. Alg örneklerinin ürün verimi hekzan (Hex) (Hs %0,15, El %0,23 ve Gg ise %0,26) ve kloroform (Chl) (Hs %0,21, El %0,22 ve Gg %0,24) ekstreleri için benzer sonuçlar gösterirken, metanol ekstreleri (Met) için farklılıklar gösterdiği ortaya konulmuştur. Hs-Met ekstresi %3,6'lık içeriği ile Gg-Met (%2,6) ve El-Met (%1,11) içeriklerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, ürün veriminin çözücü polaritesinin artışına paralel olarak artış göstermesi mevcut literatür bilgilerini destekler niteliktedir (Ganesan et al., 2008; Sultana et al., 2009; Grosso et al., 2015). Aynı zamanda alg örneklerinin metanol ekstrelerinde görülen verim farklılıklarının da, fenolik maddelerin yanısıra bu çözücü içerisinde alg sınıfına

özgü farklı nitelikte protein ve karbonhidratların çözülmesine bağlı olmasıyla açıklanabilmektedir.

Oksijen yeryüzündeki kompleks yaşamın devam ettirilmesinde önemli bir faktör olmasına rağmen, üretim ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması canlılar için tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir. Bu normal redoks halindeki bozulmalar, hücrenin tüm bileşenlerine zarar veren peroksitler ve serbest radikallerin üretimi (ROS) yoluyla DNA'yı parçalamakta, hücre membranlarını yok etmekte ve hücrenin temel enzimatik metabolik süreçleri arasında tahribata neden olabilmektedir (Dröge, 2002). ROS'ların neden olduğu bu etkileri ortadan kaldırmak için sayısız araştırmalar gerçekleştirilmiş ve sentetik ve doğal olarak pekçok antioksidan hayatımıza girmiştir. Antioksidan kavramı hedef bir molekülün oksidatif hasarını geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran bir madde olarak kabul edilebilir (Halliwell, 1994). Sentetik orjinli doğal ürünlerin iyileştirici etkisinin yanısıra yan etkilere yol açmasıyla birlikte, doğal orjinli kaynaklara ilgiyi gittikçe arttırmıştır. Doğal kaynaklı alglerden türevlenen metabolitlerin potansiyel antioksidan kaynağı olarak kullanılabilceği sayısız çalışmalara konu olmuş ve bu maddelerin antioksidan aktivitesi esas olarak süperoksit ve hidroksil radikallerine karşı süpürücü etki, şelatlama yeteneği, tekli veya üçlü oksijenin söndürülmesi ve gücünü azaltması şeklinde olabileceği ortaya konulmuştur. (Nahas et al., 2007; Demirel et al., 2009; Güner et al., 2015; Vadlapudi, 2012). Bu çalışmamızda, antioksidan aktivite tayininde sıklıkla kullanılan DPPH ve ABTS⁺ yöntemleri kullanılarak alg ekstelerinin mevcut potansiyeli ortaya konulmuştur. DPPH % inhibisyon deneme sonuçlarına göre, *E.linza*'nın Met ekstresi Chl'dan daha yüksek bir aktivite gösterirken, Hex ekstresi için ise hesaplanılabilir bir sonuca ulaşamamıştır. Bununla birlikte, *H.scoparia* ekstreleri arasında en aktif maddenin % 14'la inhibisyonla Hex grubu olurken, bunu sırasıyla Chl (% 15) ve Met (%400) ekstreleri izlemektedir. Benzer sonuçlar *G.gracilis* solvan ekstelerinde de tespit edilmiştir. Bu alg grubu içerisinde en aktif maddenin Hex (% 6,94) olduğu bunu Met (% 15) ve Chl (% 224) örneklerinin izlediği görülmüştür. Bitkilerde genelde antioksidan özellik gösteren metabolitlerin polar çözücülerde daha yüksek aktivite gösterdiği rapor edilirken (Yusnawan, 2013), *H.scoparia* ve *G.gracilis* örneklerinde apolar çözücülerde yüksek aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bilgiler

doğrultusunda, Hex ekstresindeki DPPH aktivitesindeki artışların polarda çözücüler fenol ve flavonoid bileşiklerinin etkinliğinden çok tokoferol, renk pigmenti ve doymamış yağ gibi lipofilik antioksidanların varlığından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Benzer sonuçlara literatür incelemeleri sonucunda ulaşılmış, kırmızı alg örneklerinin DPPH yönteminde metanol, etanol ve sulu ekstrelerinin apolar çözücülere göre daha zayıf etkinlik gösterdiği ortaya konulmuştur (Matsukawa et al., 1997; Yan et al., 1998). *G.gracilis* alg türünün hekzan, etil asetat ve metanol ekstraksiyonuyla DPPH aktivitesinin belirlendiği başka bir çalışmada, bu kırmızı alg türünün mevsimsel şartlara bağlı olarak hekzan ekstresinin DPPH inhibisyon etkisinin metanolden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Francavilla et al., 2013). Bhuvaneswari et al., (2013) *Chondrococcus hornemanni* ve *Spyridia fusiformis* alg türlerinin DPPH yöntemiyle aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmada, en zayıf etkiyi metanol ve sulu ekstrelerde gösterdiklerini tespit etmişlerdir. *Sargassum fusiforme*, *Sargassum kjellmanianum*, *Sargassum pallidum*, *Sargassum thunbergii* ve *Sargassum horneri* gibi kahverengi alg türlerinin farklı solvan ekstrelerinin antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, DPPH analiz yönteminde metanol ekstrelerinin antioksidan süpürücü etkisi en az olarak saptanmıştır (Luo et al., 2010). *H.scoparia* ve *G.gracilis* analiz sonuçlarına ilave olarak yeşil alg *E.linza* ekstrelerinin DPPH aktiviteleri incelendiğinde, diğer alg gruplarından farklı olarak en yüksek inhibisyonun metanol örneklerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Benzer çalışmalar incelendiğinde, Unnikrishnan et al., (2015) DPPH yöntemiyle 4 farklı yeşil alg türü (*Chaetomorpha aerea*, *Enteromorpha intestinalis*, *Chlorodesmis*, ve *Cladophora rupestris*) antioksidan kapasitelerini belirledikleri çalışmada, örneklerin metanol ekstrelerinde inhibisyon göstererek aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. *Desmococcus olivaceous* ve *Chlorococcum humicola* yeşil alglerinin metanol, etanol ve aseton gibi farklı solvanlar kullanılarak antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı çalışmada, her iki alg türünde metanolde en iyi etkiyi gösterdiğini tespit etmişlerdir (Uma et al., 2011). Sivakumar and Rajagopal, (2011) 8 farklı yeşil alg türünün farklı polaritedeki solvan ekstrelerini değerlendirdikleri çalışmalarında inhibisyona en iyi sahip olan grubun metanol olduğunu ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar DPPH aktiviteleriyle El-Met'in total fenolik içeriklerinin Chl ve Hex ekstrelerinininkinden daha yüksek olması bu durumu açıklayabilmektedir.

Alg örneklerinin antioksidan aktivitelerini değerlendirdiğimiz ABTS⁺ yöntemi ile ise organik solvan karakterli DPPH'dan farklı olarak hem organik hem de sulu fazda çözünen hidrofilik ve lipofilik karakterli bileşiklerin neden olduğu etkinlik değerlendirilmektedir (Shalaby and Shanab, 2013). Çizelge 3.6'daki sonuçlar incelendiğinde, tüm test örnekleri içinde *H.scoparia*'nın en yüksek aktiviteye sahip olmak üzere *E.linza* ve *G.gracilis*'in Met ekstresiyle birlikte Hex ve Chl'ye göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ve literatürde alg ekstraktlarıyla yürütülen çalışmalarla benzer sonuçlar sergilediği ortaya konulmuştur. Rafiquzzaman et al., (2015) kırmızı alg *Hypnea musciformis*'in metanol, butanol, kloroform ve etil asetat solvanları yardımıyla antioksidan aktivitelerini belirledikleri çalışmada, ABTS⁺ yönteminde en aktif maddenin metanol olduğunu ortaya koymuşlardır. Metanol, kloroform ve etil asetat kullanılarak *Amphiroa fragilissima*'nın antioksidan aktivitelerini belirlemek için yürütülen başka bir çalışmada, en güçlü inhibisyon etkisinin metanol ekstresinde olduğu tespit edilmiştir (Viswanathan et al.,2014). Farklı antioksidan test yöntemleriyle esmer alg *Colpomenia sinuosa*'nın aktivitesinin incelendiği başka bir çalışmada, bu alg türünün metanol ekstresinin ABTS⁺'de %74 inhibisyon en güçlü etkiyi gösterdiği ortaya konulmuştur (Lekameera et al., 2008). Anggadiredjal et al., (1997) tarafından farklı alg türleri üzerinde yürütülen çalışmada ise *Sargassum polycystum* türünün metanol ekstraktlarının hekzan ve dietileterden daha iyi inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

Alglerin mevcut antioksidan aktivitesi, polisakkaritler, çoklu doymamış yağ asitleri, florotanninler ve diğer fenolik bileşikler ve karotenoidler gibi birçok farklı metabolit ve doğal biyoaktif bileşik tarafından sağlanmaktadır. Yeşil, kahverengi ve kırmızı alglerin ana bileşenleri genellikle depolama ve yapısal işlevleri olan polisakkaritlerdir. Bu algal makromolekülleri kırmızı alglerden elde edilen agar ve karageenan; kahverengi alglerden alginat, fukan ve laminarin ve yeşil alglerden selüloz ve ulvan gibi aileye özgün sülfatlanmış polisakkaritleri içermekte (Usov, 2013) ve bu metabolitlerin antioksidan aktivite dahil pek çok mekanizmada rol oynadığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Qi et al., 2005; Li et al., 2008; Li et al., 2009). Benzer şekilde alg örneklerinin antioksidan kapasitesinin değerlendirildiği çalışmalarda, fenolik içeriklerinin de antioksidan etkinlik üzerine önemli katkılarda bulunduğu rapor edilmiştir (Michalak and

Chojnacka, 2015; Pérez et al., 2016). Fenolik bileşiler fenolik asitler (benzoik veya hidroksisinnamik asit türevleri), flavonoidler, stilbenler ve lignanlar gibi gruplara ayrılmaktadır. Literatür doğrultusunda *H.scoparia*, *G.gracilis* ve *E. linza* organik solvan örneklerinin göstermiş oldukları total fenolik içerik tayini Folin-Ciocalteu, total flavonoid içerik ise alüminyum klorür metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total fenolik ve flavonoid içerik sonuçları karşılaştırıldığında, kahverengi alg *H.scoparia*'nın Met ekstresinin sırasıyla 33,20 mgGAE/g ve 1,26 mgQE/g değeriyle, yeşil alg *E.linza* (25,58 mgGAE/g ve 0,94 mgQE/g) ve kırmızı alg *G.gracilis*'in (8,31 mgGAE/g ve 0,4 mgQE/g) Met ekstrelerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Gupta ve Abu-Ghannam, (2011) farklı alg gruplarının fenolik içeriklerini değerlendirdikleri çalışmalarında, yeşil alglerde hidroksisinnamik, benzoik asitler ve türevleri gibi basit fenollerin ve flavonoidlerin varlığı bildirilmiş olmasına rağmen, kahverengi alglerin fenolik içeriklerinin yeşil ve kırmızı alglerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hindistan kıyılarından toplanan *Halimeda tuna*, *Turbinaria conoides* and *Gracilaria foliifera* Met ekstrelerinin antioksidan etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, *T. conoides*'in toplam fenol içeriği 1.231 mgGAE/g, 1.675 mgGAE/g oranıyla kırmızı ve yeşil alg türlerine göre daha yüksek bulunmuştur (Devi et al., 2011). Benzer şekilde *Halimeda opuntia* (yeşil), *Padina pavonica* (kahverengi) ve *Halymenia* sp. (kırmızı) alglerinin Met ekstrelerinin değerlendirildiği çalışmada, toplam fenolik içeriğin en yüksek değeri kahverengi ve yeşil yosunlarda (sırasıyla 55 ve 49 mg/gdw) görülürken, kırmızı alglerde en düşük toplam fenolik içeriği (42 mg/gdw) kaydedilmiştir. Bununla birlikte, yeşil, kahverengi ve kırmızı makroalglerdeki fenolik bileşiklerin varlığı, bazı olumsuz koşullar altında koruyucu mekanizmalarıyla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Hamza et al., 2014). Yeşil, kırmızı ve kahverengi alglerin antioksidan aktivitelerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada, kullanılan test yöntemine göre fenolik maddelerin olası farklı düzeylerde etkilediği ortaya konulmuştur. Hs-Met ekstresi tüm örnekler içerisinde en iyi ABTS⁺ aktivitesine ve aynı zamanda en yüksek total fenolik içeriğine sahiptir. Bu sonuçlar, Nagai and Yukimoto, (2003) tarafından yürütülen çalışmayla, fenolik bileşiklerin esmer alglerin antioksidan kapasitesini daha fazla etkilediği görüşünü desteklemektedir. Bununla birlikte, El-Met ekstresine kıyasla, Gg-Met ekstresinin ABTS⁺ aktiviteleri yüksek olup, total fenolik içerikleri daha düşük bulunmuştur. Benzer farklılıkların DPPH

yönteminde alg örneklerinin kendi ekstre grupları arasında da görülmektedir. Gg-Hex ekstresi Gg-Met örneği ile karşılaştırıldığında, DPPH aktivitesi bakımından yüksek fakat total fenolik içerikleri daha düşüktür. Aynı şekilde Hs-Hex örneği, Hs-Chl ve Hs- Met ekstreleri karşılaştırıldığında DPPH süpürücü aktiviteleri daha yüksek fakat daha düşük fenolik içeriklere sahiptir. Bu sonuçlar, DPPH radikal süpürücü etkinliğin, alglerin antioksidan aktivitesinde total fenolik içerik ilişkili bileşiklerin doğrudan etkileri olmayabileceğini işaret etmektedir. Alglerin antioksidan aktivitesi, klorofiller ve karotenoidler gibi pigmentler, α - tokoferol, β -karoten, niasin, tiamin ve askorbik asit içeren vitamin ve vitamin öncülleri, polifenolikler ve hidrokuinonlar gibi fenolikler ve özellikle fosfatidilkolin, terpenoidler, peptidler gibi fosfolipidlerin oksidasyon süreçlerinin inhibisyonu veya bastırılmasına doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunan diğer antioksidan maddeleri olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur (Shahidi, 2009). Çalışmamızda bu noktalar göz önünde bulundurularak, antioksidan ve fenolik içerikteki farklılar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Tüm alg örnekleri içerisinde en yüksek DPPH etkiye sahip madde olan Gg-Hex ve Hs-Hex örneklerinde görülen yüksek antioksidan etkiyi belirlemek için HPLC analizi ile içerik tayini yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, Gg-Hex'in 0,5418 mg/100g ekstre düzeylerinde tokoferol ve Hs-Hex'in kafeik (0,036 mg/100g ekstre), p-kumarik asit (0,017 mg/100g ekstre) ve kersetin (0,41 mg/100g ekstre) içeriklerinden kaynaklanabileceği ortaya konulmuştur (Bkz. Şekil 3.1 ve 3.2).

Deniz ekosisteminde deniz yosunları patojenik ajanlara doğrudan maruz kalmakla birlikte bakteri, mantar ve maya gibi ortam mikroorganizmalarına karşı duyarlılık kazanmaktadır. Özellikle alg yüzeylerinde bakteri biyofilmlerinin oluşumu sürüklenme, besin maddeleri için rekabet, ışığı ve gaz değişimini engelleme gibi yosun üzerinde birçok olumsuz etkiye sahiptir. Bu faktörler göz önüne alındığında, alglerin bu ortam şartlarına ayak uydurması için sahip oldukları metabolitlerin insan sağlığına yönelik kullanılma amacıyla ilgi odağı haline gelmiştir (Vairappan, 2001; Watson and Cruz-Rivera, 2003). Bununla birlikte, bazı alglerin antimikrobiyal aktiveleri çalışılmış olmakla birlikte, ekstrelerin bakterilerin yol açtığı gıda bozunmalarına ve insan hastalıklarına karşı kullanılması için yaygın olarak çalışma bulunmamaktadır. Mevut çalışmalara bakıldığında, alg sekonder bileşiklerin antimikrobiyal özelliklerini organik

çözücüler kullanarak belirlenmesi için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Farklı alglerden ekstre edilebilen maddeler ve antimikrobiyal verimleri, kullanılan solvane göre değişkenlik göstermektedir. Ayrıca, özütlerin doğru ve tekrarlanabilir şekilde hazırlanması için çözücünün sistematik olarak değerlendirilmesi ve optimizasyonu gereklidir. Sonuç olarak, en iyi etkinliği ortaya çıkarmak için genellikle kullanılan çözücülerin su, metanol ve etanol olduğu belirlenmiş ve muhtemel önleme mekanizmaları kısmen yağlı ürünler gibi bazı bileşenlerin hidrofobik doğasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Pérez et al., 2016). Çalışmamızın bu basamağında, antioksidan etkili *H.scoparia*, *E.linza* ve *G.gracilis* alg örneklerinin Hex, Chl ve Met ekstrelerinin antimikrobiyal etkileri MIC yöntemiyle, gram negatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Salmonella typhimurium*) ve gram pozitif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*) bakteri suşları kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Alg ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde, gram pozitif *Bacillus cereus*'a karşı Hs-Met, Hs-Chl, Gg-Met ve El-Met ekstrelerinin 64 µg/mL dozda bakterilerin büyümesini inhibe ettiği görülürken, diğer ekstrelerin orta dereceli inhibisyon gösterdiği görülmüştür. Bir diğer gram pozitif *Staphylococcus aureus* bakterileri incelendiğinde, Hs-Met ve El-Met örnekleri düşük konsantrasyonda inhibisyonlar gösterirken Gg-Met ve -Hex ekstreleri orta derecede etkinlik göstermiştir. *Enterococcus faecalis* bakterileri incelendiğinde Hs-Chl, El-Met ve El-Chl ekstreleri 64 µg/mL büyümeyi inhibe ederek, diğer ekstreler de 128 µg/mL orta etkili inhibisyonlar tespit edilmiştir. Deneme sonuçlarına bakıldığında, özellikle kahverengi alg *H. scoparia* olmak üzere *E.linza* ve *G.gracilis*'in -Met ekstreleri Chl ve Hex örneklerine göre daha fazla antimikrobiyal etkili olduğu görülmüştür. Benzer olarak yürütülen çalışmalarda, kahverengi alg kombu (*Laminaria japonica*), wakame (*Undaria pinnatifida*), arame (*Eisenia bicyclis*) ve kırmızı alg (*Porphyra tenera*)'nın organik solvanlar kullanılarak etkilerinin belirlendiği çalışmada, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı kahverengi alglerin metanol ekstrelerinin kırmızı alglere ve diğer sovenlere göre daha iyi inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir (Al Hazzani et al., 2014). Karthikeyan et al., (2014) farklı alg türlerinin ettiklerini belirledikleri çalışmalarında, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı *Enteromorpha* sp-Met., *S. aureus*'a karşı *Gracilaria corticarta*-Met, *K. pneumoniae*'ye karşı *Caulerpa taxifolia*'nın Met ve Chl ekstreleri yüksek oranda

inhibisyon sergilemiştir. Başka bir çalışmada, kahverengi alg *Eisenia bicyclis*'in akne bakterisi *Propionibacterium acnes*'e karşı en etkili solvanın metanol ekstresi olduğu bildirilmiştir. Tüketilebilen yeşil alg *Caulerpa*'nın gıda patojeni *E.coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* sp., ve *Salmonella* sp. bakteri türlerine karşı metanol ekstreleri inhibisyon göstermiştir. Rhimou et al., (2010) 26 farklı kırmızı alg türünün *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesini belirledikleri çalışmada, tüm örneklerin metanol ekstresinin en iyi inhibisyon gösterdiği, özellikle *Hypnea musciformis* 10-35 mm çapında geniş bir spektrumda inhibisyonu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Çalışma sonucumuzda Met ekstrelerinin Chl ve Hex'e göre daha düşük konsantrasyonlarda büyümeyi inhibe etmesi, literatürden elde edilen polar ekstrelerin daha yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu görüşüyle desteklenmektedir. Benzer şekilde, alkollü solüsyonların ve/veya hidrofilik solven karışımlarının daha iyi aktivite sağladığı teyit edilmiş; diğer bir deyişle, metanol ve aseton özleri, kloroform gibi apolar solvanlarda bulunanlara kıyasla daha aktif olduğu ifade edilmiştir. Bu durum fenolik bileşiklerin, Met ekstrelerinde antioksidan aktiviteye benzer etkiler sergilemiş olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bir veya daha fazla hidroksil grubu olan aromatik bir halka ile karakterize fenolik bileşiklerin, antimikrobiyal etki mekanizması, mikrobiyal hücre geçirgenliğinin değişmesi, hücre içi makromoleküllerin kaybı, membran fonksiyonu etkilenerek hücre bütünlüğünün kaybı veya nihai hücre ölümü şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Ayrıca kahverengi alglerde bulunan floroglukinol, eckol ve dieckol gibi antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış fenolik bileşiklerin olduğu bilinmektedir. Fenolik bileşiklerin yanısıra alglerin diğer önemli bir bileşimini oluşturan karotenoitlerin de bakteriyel hücre duvarlarını sindiren bağışıklık enzimi olan lizozim'in birikmesine yol açarak antimikrobiyal etkiler sergilediği bilinmektedir (Abu-Ghannam and Rajauria, 2013). Bununla birlikte, alg Chl ve Hex ekstrelerinin bakteri suşlarında daha az etkili olması, bu ekstrelerde bakterilerin büyümesini arttıran bazı şekerlerin ve proteinlerin varlığı ile açıklanabilmektedir. (Galland-Irmouli et al., 1999). Antimikrobiyal aktivite sonuçlarımızda diğer önemli bir nokta, gram negatif bakterilere kıyasla gram pozitif bakterilerin alg ekstrelerine karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Tuney et al., (2006), gram-pozitif bakterilerin, gram-negatif bakterilere kıyasla, çalışmalarında kullanılan alg ekstreleri tarafından daha etkili bir şekilde kontrol

edildiğini bildirmişleridir. Taskin et al., (2001) benzer gözlemler yapmış, bunun da Gram pozitif bakterilerin alg ekstrelerine duyarlılığının hücre duvarı yapısındaki ve bileşimindeki farklılıklardan kaynaklanmasının yanısıra (Paz et al., 1995) gram-negatif bakterilerdeki dış zar (Tortora et al., 2001) ve hücre duvarı içindeki kalın murin tabakası (Martin, 1995) antibiyotikler de dahil olmak üzere birçok çevresel maddeye karşı bir bariyer görevi görerek inhibitörlerin girişini engellediği ortaya konulmuştur.

Kanser, yaşam biçiminin değişmesi, beslenme ve küresel ısınmayla birlikte artış gösteren korkunç bir insan hastalığı olup, başlama (initiation), çoğalma (promotion) ve ilerleme (progression) gibi en az üç aşamada tanımlanan çok kademeli bir süreçtir. Bu safhaların ortaya çıkmasında en etkili faktörlerin, çeşitli ajanlar tarafından hücrelerde uyarılmış oksidatif stres kaynaklı olduğu bilinmektedir. İlk aşamada, ROS DNA'da gen mutasyonları ve yapısal değişiklikler oluşturarak DNA hasarı üretebilir. İkinci aşamada, ROS, anormal gen ekspresyonuna, hücre-hücre iletişiminin bloke edilmesine ve ikinci mesajcı sistemlerin modifikasyonuna yol açarak hücre çoğalmasında bir artışa veya başlatılan hücre popülasyonunun apoptozunda bir azalmaya neden olur. Son olarak, oksidatif stres, başlatılan hücre popülasyonuna başka DNA değişiklikleri ekleyerek kanser sürecinin ilerleme aşamasına katılabilir. Bu kritik etkilerinden dolayı kanserin herhangi bir sürecine etki ederek, oksidatif stresi azaltmaya yönelik doğal bileşiklerin ortaya çıkarılması hayati önem taşımaktadır (Guyton and Kensler, 1993; Klaunig et al., 1998). Antioksidan özelliğe sahip alglerin antikanser aktiviteleri de yoğun olarak çalışılmakta ve muhtemel hücrelerdeki kemoprotektif metabolizmaları aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Alg ekstrelerinin sitotoksik etkilerini belirlediğimiz çalışmamızın ilk ayağında, *in vitro*'da kanser hücre hatları (U-87-MG, MCF-7, CaCo-2 ve HeLa) üzerine etkileri daha önce çalışılmamış *H.scoparia*, *E.linza* ve *G.gracilis* alglerinin Hex, Chl ve Met ekstrelerinin muhtemel etkileri MTT yöntemi kullanılarak ortaya konulmuştur. Uygulanan farklı alg ekstrelerinin maruziyetine bağlı olarak her kanser hücre hattı tipinde gözlemlenen IC₅₀ değerlerinde farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 3.10). HeLa kanser hücre hatları incelendiğinde, kahverengi alg Hs-Met ekstresi 6.5 µg/mL değeriyle en etkili inhibisyona neden olurken, Hs-Chl 7.6 µg/mL ve Hs-Hex 12.2 µg/mL değerleriyle dikkate değer bir inhibisyona yol açtığı görülmüştür.

Yeşil alg El-Hex ve El-Chl ekstreleri sırasıyla 22 µg/mL ve 27.6 µg/mL değerleriyle HeLa hücrelerini inhibe ederken, kırmızı alg Gg-Met'in 13.3 µg/mL değerine karşılık Gg-Hex ekstreleri 22.4 µg/mL oranıyla nispeten daha düşük inhibisyona yol açmıştır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, alg ekstresindeki, yüksek antioksidan özellik gösteren polifenol bileşiklerin potansiyel kanserojenlerin metabolik aktivasyonunu değiştiren ksenobiyotik metabolize edici enzimler tarafından kanser hücrelerini inhibe ederek antiproliferatif aktiviteden sorumlu olabileceğini önermektedir (Yuan and Walsh, 2006). Çalışma sonucunda HeLa hücre hatlarında en etkili inhibisyon gösteren örneğin, total fenolik içerik ve antioksidan aktivite bakımından en yüksek içeriğe sahip *H.scoparia* Met ekstrelerinin olması bu bilgiyi doğrulamaktadır. Özellikle de bazı fenoliklerin östradiol gibi hormon üretimini etkileyerek ve kanser hücrelerinin gelişimini önlemek için östradiolün metabolizmasında görevli cyt P450 enzimi olan aromatazı inhibe edebilmesi bu durumu daha iyi açıklayabilmektedir (Zhao et al., 2007). Bununla birlikte, fenoliklerin anti-kanser aktivitesinin etki mekanizması, gelişme evresindeki mitoz sırasında istenmeyen hücre bölünmesiyle de ortaya çıkabilir. Ayrıca, fenolikler kanser hücrelerinin hücre proliferasyonu sırasında hücre protein ve mitotik indeksin yanı sıra koloni oluşumunu azalttığı ortaya konulmuştur (Gawron and Kruk, 1992). Alghazeer et al., (2008) tarafından, kırmızı, yeşil ve kırmızı alg gruplarının antioksidan, fenolik içerik ve antikanser etkilerini inceledikleri çalışmalarda, en yüksek fenolik (800.28 ± 36.23 mg/g) ve antioksidan (50.5 ± 3.20) aktiviteye sahip *C.crinita* kahverengi alginin kanser hücre hatlarında en etkili inhibisyona neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer olarak kahverengi alg *Padina boergesenii* antioksidan ve antikanser etkilerinin belirlendiği çalışmada, total fenol ve flavonoid içeriği yüksek metanol ekstrinin HepG2 kanser hücre hatlarına karşı (IC_{50} 1.67 mg/ml) yüksek inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Alg ekstrelerinin CaCo-2 kanser hücre hatları üzerine etkileri incelendiğinde, El-Chl 1.7 µg/mL inhibisyon gösterirken, yeşil alg El-Hex örneği 16 µg/mL ile daha düşük bir inhibisyon göstermiştir. Kahverengi alglerde ise Hs-Hex (4.53 µg/mL) ve Hs-Met (22 µg/mL) birbirine yakın değerlerde kanser hücrelerinin inhibisyonuna yol açarken, Hs-Chl için dikkate değer bir hesaplama bulunamamıştır ($IC_{50} >50$ µg/mL). Sonuç olarak, kanser hücrelerinin büyümesini en iyi inhibe eden El-Chl örneği olduğu ve bu etkinliğinin HPLC analizleri sonucunda elde ettiğimiz kersetin (0.23 mg/100g

ekstre) ve kumarik asit (0.043 mg/100g ekstre) gibi aktif bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bkz. Şekil 3.3). Mevcut literatür çalışmaları bu sonuçlarımızı desteklemektedir. İnsan kolorektal karsinoması (HCT-15) üzerinde kumarik asitin inhibe edici etkisinin incelendiği çalışmada, bu bileşiğin $IC_{50}=1400$ $\mu\text{mol/L}$ değeriyle hücreleri inhibe ederek apoptosisi uyardığı tespit edilmiştir (Jaganathan, 2012). Senawong et al., (2014) HeLa, HCT116 ve HT29 kanser hücre hatlarında farklı fenolik içeriklerin (protokateşik, p-hidroksibenzoik, vanilik, syrik, p-kumarik, ferulik ve sinapik asitler) etkilerini belirledikleri çalışmada, p-kumarik asitin her üç kanser hücre hattında da en yüksek inhibisyonu gösterdiği ortaya konulmuştur. Diğer önemli bir bileşik olan kersetinin meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) etkinlikleri incelenmiş ve kersetinin özellikle MCF-7 hatlarında IC_{50} 37 μM değeriyle inhibisyona yol açtığı bildirilmiştir (Ranganathan et al., 2015). antioksidan özelliğe sahip kersetin bileşiğinin insan hepatoma hücre hattında (HepG2) antioksidan kapasitesi ve inhibisyon etkisi incelendiğinde, ROS üretimini baskılayarak hücre hatlarında inhibisyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Mario et al., 2006). İnsanlardaki yüksek diyet flavonoidlerin alımıyla bu popülasyonlardaki mide ve kolon kanser insidansının daha düşük olmasındaki korelasyonuna ilişkin yürütülen çalışmada, kersetinin insan kolon kanseri hücre hatları ve primer kolorektal tümörler üzerindeki inhibisyon etkisi ile kısmen bu duruma açıklık getirmiştir (Ranelletti et al., 2000). Bir diğer kanser hücre hattı MCF-7 kanser hücre hatları üzerine etkileri incelendiğinde, Hs-Chl ekstraları 13 $\mu\text{g/mL}$ 'lik değeriyle Hs-Met'ten (26.8 $\mu\text{g/mL}$) daha iyi bir inhibisyon gösterdiği fakat Hs-Hex ekstraları için hesaplanabilir bir IC_{50} değeri olmadığı bulunmuştur. Yeşil alg ekstraları arasından sadece El-Chl örneği 20.2 $\mu\text{g/mL}$ değeriyle önemli bir inhibisyon sağlarken, El-Met ve El-Hex için $IC_{50} >50$ $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kırmızı alg *G.gracilis* ekstralarının MCF-7 hücreleri üzerinde önemli bir inhibisyon sağlamadığı görülmüştür ($IC_{50} >50$ $\mu\text{g/mL}$). Bu hücre hatlarının büyümesini en iyi inhibe eden maddenin Hs-Chl olması, antikanser etkinliği kanıtlanmış p-kumarik asit içeriğinden (0.13 mg/100g ekstre) kaynaklandığı düşünülmektedir. U-87-MG hücre hatları incelendiğinde ise her üç alg türü ekstresinde etkili bir inhibisyon sağlamadığı tespit edilmiştir ($IC_{50} >50$ $\mu\text{g/mL}$). Alg ekstralarının HEK 293 sağlıklı hücre hatları üzerine olan etkilerine bakıldığında, Hs-Met, Hs-Hex, Hs-Chl, El-Chl, El-Hex ve Gg-Met ekstralarının

kanser hücrelerindeki inhibisyonuna benzer sitotoksik etkiler sergilediği ve sağlıklı hücre proliferasyonu durdurarak aktivitelelerin kanser hücrelerine spesifik olmadığını ortaya koymuştur (Onbas et al., 2016). Bu sonuçlar ışığında alg ekstrelerinin, hücre hatlarında farklı değerlerde inhibisyon göstermesi veya bazı hücre hatlarında herhangi bir etki göstermemesi, alg ekstrelerinin sahip olduğu farklı özellikteki içeriklerden kaynaklanmanın yanısıra agresif bir yapıya sahip kanser hücrelerinin hayatta kalma isteğine bağlı olarak göstermiş olduğu direncinde önemli bir faktör olduğu ortaya konulmuştur. Harada and Kamei, (1997) bazı insan lösemik hücre hatlarında farklı alg örneklerinin etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, kırmızı alg *Amphiroa zonata*, test edilen tüm insan lösemik hücre hatları ve L1210 murin lösemi hücrelerinde 5-375 ug ml⁻¹ aralığında güçlü sitotoksikite sergilerken, normal insan fibroblast (HDF) ve sıçan normal hücrelerinde NIH-3T3 sitotoksikite göstermemiştir. Aynı zamanda kahverengi alg *Dilophus okamurae* L1210 hücrelerine karşı zayıf selektif sitotoksik aktiviteye sahipken, insan lösemi hücreleri, HL60 ve MOLT-4'de güçlü bir sitotoksikite sergilemiştir. Yeşil alg, *Cladophoropsis vaucheriaeform* ekstresi ise sadece NIH-3T3 hücre hatlarında sitotoksik etkiliyken, diğer insan lösemik hücre hatlarında sitotoksikite göstermediğini bildirmişlerdir. Kahverengi alg *Sargassum swartzii* ve *Cystoseira* sp. türlerinin hekzan, kloroform, etilasetat ve metanol ekstrelerinin HT-29, Caco-2, T47D, MDA-MB468 ve NIH 3T3 üzerinde inhibisyon etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, *S. swartzii* ve *C. myrica*'nın hekzan fraksiyonu Caco-2 ve T47D hücre hatlarında (IC₅₀ <100 ug/ml) seçici sitotoksikite gösterirken, *C. sinuosa*'nın toplam ekstresi ve fraksiyonları, incelenen hücre hatlarına karşı önemli bir sitotoksikite göstermediği tespit edilmiştir (Khanavi et al., 2010). MDA-MB-231, MCF-7 ve T-47D kanser hücre hatları kullanılarak alg örneklerinin seçici sitotoksik etkilerinin belirlendiği başka bir çalışmada, *Gracilaria foliifera* ve *Cladophoropsis* sp. türlerinin her üç hücre hattında sitotoksik etkili olduğu fakat diğer alg türlerinin herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur (Erfani et al., 2015). Bu sonuçlarımıza paralel olarak, Şekil 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5'deki hücre kültür fotoğrafları da incelendiğinde MTT yönteminin sonuçlarını doğrulayıcı sonuçlara ulaşılmaktadır. Hex, Chl ve Met ekstrelerinin çokgen şekilli, sağlıklı bir görünüme sahip ve normal hücre büyümesini sürdüren hücre hatlarına uygulaması sonrası kanser

hücrelerinin, kültür plakalarına yapışma yeteneğini kaybedip yuvarlak şekil alarak canlılıklarını sürdüremedikleri gözlemlenmiştir.

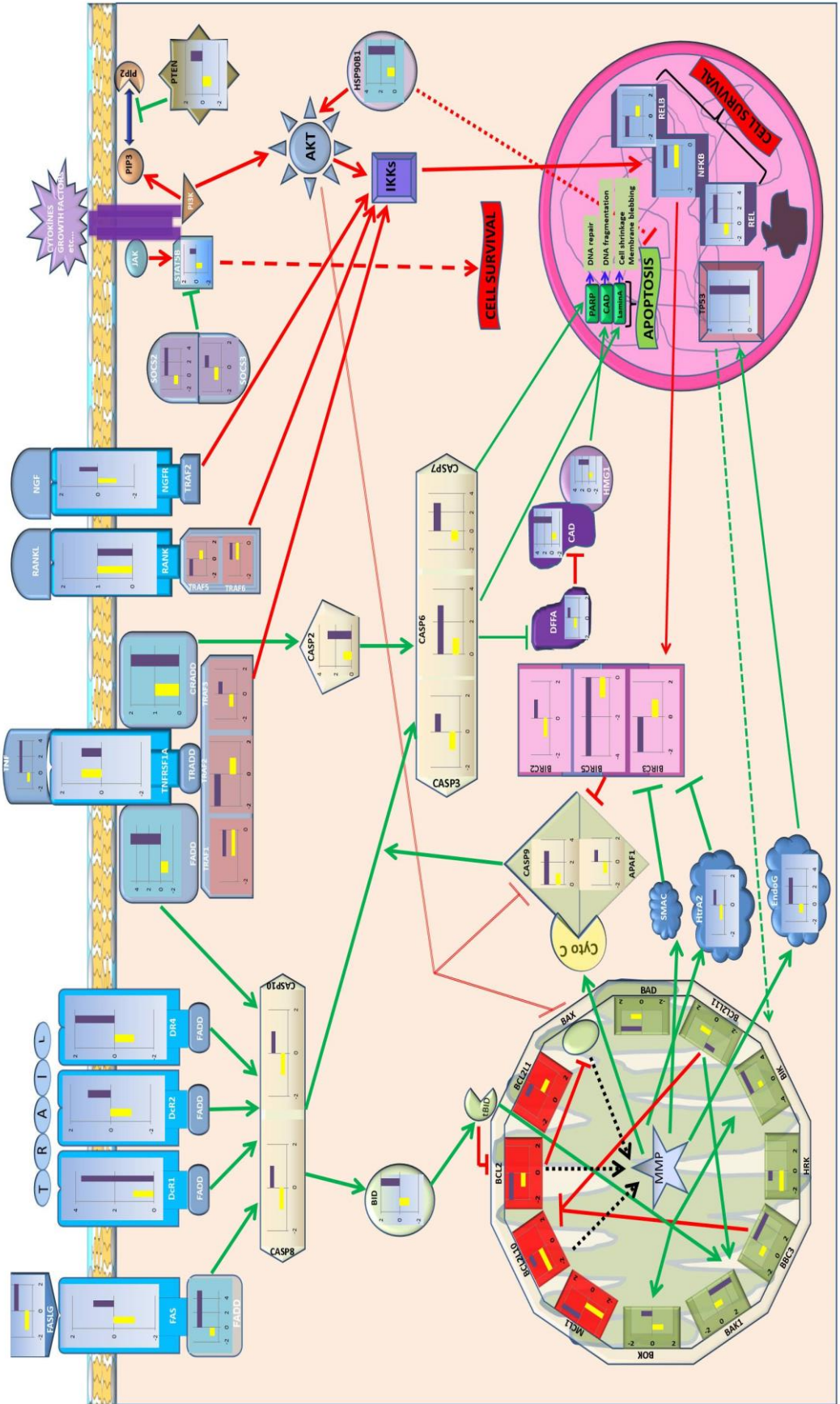
Sitotoksik etkili alg ekstrelerinin kanser hücrelerinde sergiledikleri hücre inhibisyonu ve apoptosis mekanizmalarının aydınlatılması, *in vitro* sitotoksikite çalışmalarının diğer basamağını oluşturmaktadır. Apoptosis ekstrinsik ve intrinsik yollar aracılığıyla hem hasarlı hem de anormal hücreleri ortadan kaldıran ve vücudun her hücresinde doku homeostazı bakımını sağlayan bir hücre ölüm programıdır (Kaufmann and Hengartner, 2001). Apoptotik yollardaki her defekt veya anomalilik kanser tedavisinde yararlı bir yaklaşımdır (Ramos, 2008). Besin takviyesi olarak kullanılan deniz makroalglerinin de biyolojik aktif bileşikleri sayesinde birçok antikanser çalışmasına konu olmuştur. Şaşırtıcı bir şekilde, *H.scoparia*, *E.linza* ve *G.gracilis* besin takviyesi olarak yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmasına rağmen, literatürde bu alg ekstrelerinin kanser hücre hatlarında apoptotik mekanizmaları hakkında hiçbir kayıt yoktur. Bu amaçla, mevcut çalışma *H.scoparia*, *E.linza* ve *G. gracilis* Hex, Chl ve Met ekstrelerinin farklı kanser hücre hatlarında antikanser/proliferasyon mekanizmalarını ortaya koyan ilk rapordur (Şekil 4.1).

HeLa hücre hatlarında alg ekstrelerinin uygulamaları sonucunda farklı ekspresyon ifadeleri elde edilmiştir. Öncelikle *H.scoparia* ekstreleri incelendiğinde, Hs-Hex örnekleri hücre zarında yerleşik olan Fas, TNFR-1 ve TNFRSF gibi farklı ekstrinsik yolak başlatıcısı genler ile adaptör protein FADD'nin ekspresyonunda önemli artışlara neden olduğu görülürken, Hs-Met ekstreleri, özellikle TNFRSF-1A ve FADD proteinlerindeki kat artışları ile bu yolaktaki uyarılmanın başladığını göstermektedir. Hs-Chl ekstrelerinin ise membran reseptör TNFRSF-1A ve adaptör protein CRADD'da yol açtığı ekspresyon artışları diğer ekstrelerle kıyasla farklı bir yoldan apoptozisi uyarabileceği düşünülmüştür. Apoptozisde ekstrinsik yolaktaki uyarılmanın devam ettiğinin en iyi göstergesi hücre içinde kaspaz kaskad sisteminde de benzer ekspresyon ifadelerinin gözlenmesidir. Başlatıcı Casp-8 ve -10 ile efektör Casp-3 Casp-6 ve Casp-7'ler bu süreçteki kilit proteinlerdendir. Hs-Hex, Hs-Met ve Hs-Chl ekstrelerinin kaspaz ekspresyonu üzerine etkilerine bakıldığında, her üç ekstrede Casp-8 ve -10 ile Casp-3'nun ekspresyonunda önemli artışlara yol açtıkları görülmüştür. Fakat diğer efektör kaspazlar incelendiğinde, Hs-Hex ile

Hs-Met Casp-6'da ve Hs-Chl ise Casp -7'de kat artışlarına neden olmuştur. Casp-6 ve Casp-7'nin Casp-3 ile anlamlı sekans benzerlikleri göstermesine rağmen, bu farklılıklar kısa domaine sahip Casp-6 ve Casp-7'nin apoptozisin terminal safhasında, yıkım yerine diğer kaspazların aktivasyonlarını düzenlemede etkili olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Slee et al., 2001).

Ayrıca Hs-Chl ekstrelerinin, TNFRSF-1A ve CRADD yolağındaki artışlarına paralel Casp -2 ve Casp -3 genlerindeki kat artışları, ekstre uygulamaları sonrası apoptozisin Casp -8 yerine, Casp -2 üzerinden Casp -3 aracılığıyla apoptozisi indükleyebileceği tespit edilmiştir. Casp -8 ayrıca Bid proteiniyle etkileşerek tBid proteinin yarılanması ve intrinsik yolda anahtar rol oynayan Bcl-2 apoptotik proteinlerinin uyarılmasında da önemli rol oynamaktadır. İntersik yolda, Hs-Hex ekstreleri BID proteinin ekspresyonundaki artışlara paralel, diğer proapoptotik BCL2 ailelerinin ekspresyonunda da önemli kat artışlarına neden olduğu görülmüştür. Hs-Met ekstreleri ise Hs-Chl'ye kıyasla BAK1, BOK ve BBC3 gibi mitokondriyal enzimlerde önemli artışlara yol açarken, diğer proapoptotik genlerde downregülasyonlar görülmüştür. Genlerin uyarılmasıyla birlikte proapoptotik genlerin mitokondride birikimi ve sitokrom c'nin sitosole salınması gerçekleşmektedir. Daha sonra sitokrom c, APAF1 ve kaspaz 9 birleşerek oluşturduğu apoptozom kompleksiyle Casp-3'ü uyararak intrinsik yolağı aracılığıyla apoptozisi başlatmaktadır. *H.scoparia* ekstrelerinin intrinsik yolağı için önemli bu proteinler üzerinde etkilerine bakıldığında her üç ekstrenin Casp -9 ve APAF1 ekspresyonlarında artışlarına paralel olarak apoptozisi başlatmaktadır (Broker et al., 2005). Kaspaz aktivasyonu ile apoptozisin terminal safhasına geçişte köprü görevi gören apoptozis fragmentasyon faktörü (CAD (caspase-activated DNase) ve ICAD (inhibitor of CAD)) kaspaz-3'ün substratı olup ve apoptoz sırasında DNA fragmentasyonunu tetikler. DFFA/ICAD kaspaz-3 tarafından bölündüğünde DFF/CAD aktive olur (Yan et al., 2006). DFFA'nın kaspaz 3 ile yarılanmasından sonra, DFFA CAD'dan ayrılır ve HMGB1 CAD'e bağlanır. Bu aktif yapı apoptoz sırasında DNA'nın parçalanmasına ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olmaktadır. Alg ekstrelerinin etkilerine bakıldığında, *H.scoparia*'nın üç ekstreside proapoptotik CAD ve HMGB1 aracı proteinlerin ekspresyonunda kat artışlarına neden oldukları bununla birlikte antiapoptotik

ICAD üzerinde ise ekspresyonu azaltıcı etkilere neden oldukları bulunmuştur. Bununla birlikte apoptozisin aktivasyonunu gösteren yardımcı proteinlerinde ifadesi önem taşımaktadır. Mitokondriden salınan kaspaz bağımlı HtrA2/Omi protein, apoptoz inhibitör proteinlerinin (IAP'ler) (BIRC ailesi) etkisini negatif düzenlemektedir (Salvesen and Dixit, 1997). *H.scoparia*'nın her üç ekstreside HtrA2 üzerinde önemli kat artışlarına yol açarken, inhibitör etkisi gösterdikleri antiapoptotik BIRC ailesinde farklı ifadeler elde edilmiştir. Hs-Hex BIRC2 ve BIRC3, Hs-Chl ise BIRC2 üzerinde downregüle etki göstermişlerdir. Mitokondriden salınan kaspaz bağımsız endoG ise nukleusta TP53 geni ile translokasyon yapar ve apoptoz sırasında doğrudan kromatinleri parçalayıp DNA parçalanmasına neden olur (Li et al., 2001). Alg uygulamaları sonrası her iki proteinin ekspresyonları incelendiğinde, her üç ekstreninde genler üzerinde kat artışlarına yol açtıkları tespit edilmiştir. Kahverengi alg ekstralarının HeLa hücrelerinde etkilerine bakıldığında Hs-Hex ve Hs-Met ekstraları Hs-Chl ekstralarına göre daha fazla proapoptotik genlerin ekspresyonunda artışlara neden olduğu aynı zamanda apoptoz sürecine kaspaz bağımlı ekstrinsik ve intrinsik yollarının yanısıra p53 gibi direkt yollar aracılığıyla da apoptotik sürece katkıda buldukları tespit edilmiştir. Bu etkinliğin Hex ve Met ekstralarında ortaya konulan gallik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve kersetin içeriklerinden kaynaklanabileceği ortaya konulmuştur. Bu nedenle, bazı kanserlerin önlenmesinde gallik asit için olası bir rolü olduğunu öne süren çok sayıda hücre hattı çalışmasının yapılması bulgularımızı desteklemektedir. Bu çalışmalarda özellikle TNF- α yolak aracılığıyla NFkB gibi belirli nükleer transkripsiyon faktörlerinin inhibe edildiği bildirilmiştir (Choi et al., 2009). Ji et al., (2009) NCI-H460 hücrelerinde gallik asitin etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, kaspaz ailesi ve mitokondriyal yolak proteinlerinin aktivasyonu ile tümör hücrelerinin inhibisyona uğradığını bildirmişlerdir. A375.S2 insan melanoma hücre hatlarında yürütülen başka bir çalışmada ise, gallik asitin proapoptotik genlerin ekspresyonuna paralel antiapoptotiklerin inhibisyonuyla apoptozisin aktive olduğu rapor edilmiştir (Lo et al., 2010). Bununla birlikte, çalışmamızda ekstre uygulamaları sonrası HeLa hücrelerinde proapoptotik genlerin aktivasyonu ile indüklenen apoptozisin yanısıra antiapoptotik genlerin ekspresyonundaki artışlar da dikkat çekicidir.



Şekil 4.1 Alg ekstralarının farklı yollar üzerinden apoptotik etkileri

Özellikle hücre zar proteini NGFR ve adaptör proteini TRAF2 deki ekspresyon artışlarına paralel hücre proliferasyonu ve survival mekanizmasıyla ilişkili nuklusa transloke NFkB ailesinde görülen kat artışları kanser hücresinin apoptozise karşı hayatta kalma mücadelesiyle ilişkilendirilmiştir.

Yeşil alg *E.linza*'nın Chl ve Hex esktrelerinin HeLa hücre hatlarında gen ekspresyonları üzerine olan etkileri incelendiğinde apoptotik yolakta farklı etkiler görülmüştür. El-Hex örneği ekstrinsik yolakta, zar proteini TNFRSF-1A ve TNF ile adaptör protein CRADD'da ekspresyon artışlarına neden olmuştur. Literatür taramaları sonucunda Caspase-2 için bir adaptör proteini olarak CRADD'ı tercih etmesi, Casp -2'nin TNF- α ile tetiklenen apoptozda da rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Aynı zamanda bu yolağın devam etmesi için Casp -9'un uyarılması ve dolaylı olarak mitokondriden sitokrom c'nin salınıp Casp -3 ekspresyonunda artışların olmasına gerek duyulmaktadır (Paroni et al., 2001). Çalışma sonuçlarımıza göre, Casp -8 ve BID proteininde görülen azalışlar ile Casp -2, -9, APAF1 ve mitokondriyal BAX ve BAK1'deki kat artışlar bu durumu desteklemekte ayrıca ekstrinsik yolak proteinlerinin alg uygulamaları sonrası daha hassas olduğu ve hücrenin bu yolağı kullanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, endoG ve Tp53 proteinlerinde kat artışlarının olması kaspaz bağımsız yolak üzerinden de apoptozisin uyarılması gerçekleşebilmektedir. El-Chl'de ise TNFRSF11B ve CRADD'daki artışlara istinaden TRAIL yolağı üzerinden bir uyarılma zinciri söz konusudur. Casp -8 ve -10'a paralel Casp-3 ve -6 daki kat artışlarıda ekstrinsik yolağın oluştuğunu göstermektedir. Bununla birlikte, başta BID proteinin aktivasyonu ile birlikte proapoptotik mitokondriyal enzimlerde ekspresyon artışı ve sonrasında Casp -9'un aktivasyonu intrinsik yolağın aktivasyonunu güçlendirmektedir. Bunların dışında, proapoptotik endoG ve TP53 proteinlerdeki ekspresyon artışlarıda kaspaz bağımsız yolak üzerinden apoptozis indüklemesini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, yeşil alg Hs-Chl uygulamaları sonrası hücrelerin daha duyarlı hale geldiği ve daha geniş bir spektrumda apoptozisi indüklediği bu etkilerinde daha önce etkileri tanımlanmış kersetin içeriklerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Kersetin, potansiyel bir kemoterapötik ajan olarak, kanserin büyümesi, hayatta kalması ve gelişimi gibi çeşitli mekanizmaları hedef alan etkileri ile dikkat çekmektedir. Pek çok çalışmada, servikal, glioma, kolorektal ve lösemi kanseri gibi çeşitli kanser hücre

dizilerinde kersetin'in pro-apoptotik etkilerinin kanıtlanmıştır (Russo et al., 2012). Bu araştırmalardan, kersetin'in reseptörler ve çeşitli proteinler ile etkileşimler yoluyla apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yolları üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre dizilerini içeren çalışmalarda, kersetin'in 12.5-300 µM aralığında artan konsantrasyonlarda apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Chien et al., 2009; Duo et al., 2012). Jung et al., (2010) DU-145 hücreleri üzerinde kersetin etkilerini inceledikleri benzer çalışmada, kersetin uygulamaları ile poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), kaspaz-3 ve kaspaz-9 gibi proteinlerin ekspresyonu artışıyla TRAIL zar proteinlerinin daha hassas hale geldiğini ve apoptozisi indüklediğini ortaya koymuşlardır.

Kırmızı alg *G.gracilis*'in HeLa hücre hatlarında apoptotik etkileri incelendiğinde, Gg-Hex ve Gg-Met ekstrelerinin geniş bir spektrumda FAS, TRAIL ve TNFRSF-1A ailelerinin ekspresyon artışları üzerinden ekstrinsik yolağı başlattığı görülmektedir. Yolağın devamı olarak Casp -8 ve -3 ile birlikte CAD proteinindeki ekspresyon artışları Gg-Hex uygulamaları sonrası ekstrinsik yolağın duyarlı hale geldiğini göstermektedir. Benzer şekilde Casp -8 ve BID proteinlerindeki kat artışlarını takiben proapoptotik BCL2 ailesi ve APAF1 proteinlerdeki artışlar intrinsik yolakta üzerinden de apoptozisin uyarılmaya çalışıldığını, bununla birlikte Casp -2 ve CRADD proteinlerindeki artışların antiapoptotik NFkB ailesindeki ekspresyonlar üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini de ifade etmektedir. Gg-Met ekstreleri ise ligand ve FADD protenlerin artışının devamı olarak Casp -6, CAD ve HMGB1 genlerindeki kat artışları ekstrinsik yolağın aktivasyonuna işaret etmektedir. Bununla birlikte, Gg-Met'in intrinsik yolak üzerine etkileri üzerine farklı yorumlar getirilmiştir. Öncelikle, bazı proapoptotik BCL2 ve Casp -9'daki artışlar intrinsik yolağın varlığını göstersede, Casp -8 ve BID'daki azalışlar ile antiapoptotik BCL2 ve MCL1'deki kuvvetli ekspresyon artışları yolağın inhibisyonuna işaret etmektedir. Diğeri ise Casp -1'in BID'yi de parçalayabildiği ve aktive edebildiğini ve dolayısıyla apoptozun proapoptotik mitokondriyal proteinlerindeki artışla yolağı etkileyebileceği önerilmektedir (Guegan et al., 2002). Sonuç olarak etkisi kanıtlanmış α-tokoferol içeriklerine sahip Gg-Hex ekstresi uygulamaları sonrası daha duyarlı hale gelen ekstrinsik ve intrinsik yolaklarda daha net çıkarımlar elde edilmiştir.

İkinci kanser hücre hattımız CaCo-2'da kahverengi algin Hex ve Met ekstraları ile yeşil algin Hex ve Chl ekstralarının apoptotik potansiyelleri incelenmiştir. Hs-Hex ve Hs- Met örnekleri incelendiğinde, yolaklar üzerinde bazı genler dışında iki ekstrede de benzer aktiviteler gözlenmiştir. Hs-Met ve Hs-Hex ekstraları mitokondriyal yolaktaki proapoptotik genler üzerinde ekspresyon değişikliklerine yol açmadığı bununla birlikte birlikte, Hs-Met ekstralarının, FAS reseptörlerinin artışı ile antiapoptotik NFkB ailelerinin inhibisyonu üzerinden yolakta etkili olduğu düşünülmekte ve buna paralel olarak Casp -9 ve APAF1 genlerindeki kat artışları ise inhibe olan NFkB ailelerin AKT yolağı üzerinden aktive olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu bilgiler ışığında, CaCo-2 hücrelerinin HeLa hücrelerinden daha agresif bir yapıya sahip olmasından dolayı, Hs-Met ekstralarının azda olsa Hs-Hex'den daha etkili olduğu bununda total fenolik içeriklerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda fenolik içeriklerin, çoklu sinyal yollarıyla etkileşerek kanser hücre büyümesini inhibe edebileceğini göstermektedir. Ale et al., (2011) kahverengi alg *F. vesiculosus* fenolik bileşiklerinin *in vitro*'da apoptotik etkilerini inceledikleri çalışmada, insan lenfoma HS-Sultan ile HT-29 ve HCT116 insan kolon kanseri hücrelerinde Casp -3 aktivasyonu ile apoptozisi indükleyerek hücreleri inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Benzer yürütülen başka bir çalışmada, kahverengi alg *Sargassum muticum* metanol ekstralarının total fenolik içeriklerinin MCF-7 hücre hatlarında Casp -3, -8 ve -9 genlerinde kat artışlarına yol açarak apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir (Namvar vd, 2013). Tıbbi bitki *Polygonum minus*'un farklı fraksiyonlarının apoptotik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, en yüksek total fenolik içeriğe sahip F7 fraksiyonunun HepG2 kanser hücrelerinde proapoptotik genlerin (Bax, p53 ve kaspaz-3) yukarı regülasyonu ve antiapoptotik gen Bcl-2'nin downregülasyonu ile hücrelerin inhibe edildiği ortaya konulmuştur (Ghazali et al., 2014). Yeşil alg ekstralarının CaCo-2 hücrelerinde ekspresyon ifadelerine bakıldığında, El-Chl ekstralarının El-Hex'e benzer olarak FAS, TNFRSF-1A ailelerinde upregülasyonlarına neden olmasının yanısıra TRAIL ailelerinde de kat artışlarına yol açmıştır. Bu uyarılmayı takiben El-Chl örnekleri Casp -8, -3 ve CAD genlerinde de yukarı regülasyonlar göstererek geniş spektrumda ölüm yolağını indüklediği belirlenmiştir. İntrinsik yolak proteinlerinden BID, proapoptotik BCL2 ailesi ve Casp -9'daki artışlarda bu yolağın da uyarılmış olabileceğini göstermektedir. El-Hex uygulamaları ise ölüm reseptörlerindeki uyarılmaya

paralel Casp -8 ve CAD proteinindeki artışlar ile NFkB ve TRAF ailesindeki bazı üyelerin inhibisyonu üzerinden ekstrinsik yolağın indüklenmesini akla getirmektedir. İntrinsik yolakta antiapoptotik BCL2 üyelerinin yukarı yönlü regülasyonları ve BID proteinlerindeki azalışlar mitokondriyal yolağın kararlılığını koruduğunu göstermektedir. Cas 9'daki artışların ise Casp -2 ve Casp -7'deki kat artışlarına paralel ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu yolakların dışında endoG ve P53'deki kat artışların kaspaz bağımsız yolağı üzerinde apoptozisi indükleyebileceğini göstermektedir. Bu bilgilere dayanarak El-Chl ekstre uygulamaları sonucunda hücrelerin daha duyarlı hale geldiği bunun da yapısında tespit edilen kersetin içeriklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

MCF-7 kanser hücre hatlarında ise Hs-Chl, Hs-Met ve El-Chl ekstrelerinin etkileri incelenmiştir. Hs-Met'in ölüm yolağında FAS, TNFRSF-1A ve TRAIL ligand proteinlerinde artışlarına paralel Casp -8, -10 ve -6 ile CAD proteinlerindeki kat artışların ekstrinsik yolağın indüklendiğini göstermektedir. Bununla birlikte BID genlerindeki azalışlara paralel bazı antiapoptotiklerdeki artışlar ile proapoptotiklerde azalışlar mitokondriyal yolakta kararlı bir inhibisyonun olmadığını göstermektedir. Casp -2 deki artışlara paralel Casp -9'daki kat artışları Casp -7 ve CAD üzerinden apoptozisin indüklenmiş olabileceğini ortaya koymaktır. Bununla birlikte endoG ve TP53'deki artışların kaspaz bağımsız bir yolak üzerinden etkili olabileceğini de göstermektedir. Ayrıca Hs-Chl ekstreleri uygulama sonrası PTEN genlerinde gözlenen artışlar ile NFkB'de gözlenen downregülasyonlar PI3K/AKT aracılı kanser hücre proliferasyonunun inhibisyonunu gösterebilmektedir. Bu etkilerin ise Hs-Chl içerik analizinde tespit edilen kumarik asit bileşiklerin neden olabileceği ifade edilmiştir. Literatür taramalarımız sonucunda, kumarik asitin MCF-7 hücre hatlarında P53 ve PTEN gibi proapoptotik proteinlerde kat artışlarına yol açtığı ortaya konulması sonuçlarımızı desteklemektedir (Sen et al., 2013). Sonuç olarak Hs-Met'in daha geniş bir spektrumda etkili olması total fenolik içeriklerinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. El-Chl ekstreleri ise özellikle bazı TNFRSF-1A ailesi ligand proteinlerdeki kat artışlarına paralel Casp -2, -3 ve -7'deki artışlarla bu yolaktaki bir aktivasyona eğilim gösterirken, BID ve Casp -9'daki downregülasyonlar ile apoptozom kompleks inhibe edici BIRC ailesindeki

artışlar mitokondriyal yolakta sağlıklı bir uyarılmanın gerçekleşmediğini göstermektedir. Apoptotik değerlendirmeler sonucunda alg ekstrelerinin uygulama sonrasında kanser hücrelerini farklı yollar üzerinden apoptozise sürüklenmekte olduğunu, bu farklılıklarında alglerin sahip olduğu aktif bileşiklerin yanısıra apoptotik süreç sırasında posttranslasyonel mekanizmadaki değişimlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca antiapoptotik genlerdeki artışlar kanser hücrelerinin survival direnciyle ilişkilendirilmiştir.

Anjiyogenez, yara iyileşmesi, doku büyümesi ve rejenerasyon gibi normal fizyolojilerde kan damarlarının oluşumunun gerçekleştiği karışık süreçlerdir. Mevcut çalışmamızın anjiyogenez uygulamalarının ilk basamağında yara iyileşme modeli kullanılarak ekstrelerin proliferasyon etkinlikleri incelenmiştir. Yara iyileşmesi (wound healing), sağlıklı dokuların güçlenmesiyle yapısal ve işlevsel bütünlüğün restorasyonuna yol açan karmaşık biyokimyasal eylemler bütünüdür (Chung and Ferrara, 2011). Yara iyileşmesi genellikle üç seviyede desteğe ihtiyaç duyar. Birincisi, genel direncin geliştirilmesi ve gençleştirici, adaptojenik, palyatif, antioksidan, temizleyici, detoksifikasyon ve tamponlama faaliyetlerinden elde edilebilecek destek mekanizmaları; İkincisi hücre bağlarını, hücre göçünü ve hücre ömrünü uzatmak için onarım ve yenileme mekanizmalarını uyarmak, cilt lekelerini gidermek ve cildin gerilme mukavemetini veya elastikyetini arttırmak, cildin nem tutma kapasitesini arttırmak; Üçüncü olarak anti-inflamatuvar, antiseptik ve antimikrobiyal, protein ve kollajen sentezi ve biyomembranlardaki artmış kararlılık gibi terapötik ve beslenme faaliyetlerinden oluşmaktadır. (Datta et al., 2011; Kim and Byzova, 2014). Bu süreçlere müdahale etme yeteneğine sahip serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS), iyileşme sürecinin gecikmesinde önemli etken faktörler olarak düşünülmektedir. Bu nedenle dolayı, antioksidan etkili bileşiklere sahip bitkilerin etkili bir yara iyileştirici ajan olarak kullanılabileceği *in vivo* ve *in vitro* wound healing model çalışmalarla ortaya konulmuştur (Thakur et al., 2011; Hasan and Sorkhy, 2014). Mevcut çalışmamız antikanser ve antioksidan etkinliği kanıtlanmış alg türlerinin anjiyogenik etkinliklerini ve alg ekstrelerinin farklı etkinlikler gösterdiği ortaya koyan ilk rapordur. Wound healing, *in vitro*'da çizik denilen yapay bir boşluk oluşturularak hücre göçünü incelemek için yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Yeni oluşturulan boşluğun kenarındaki hücreler, hücre-hücre temasları yeniden sağlanıncaya kadar

boşluğu kapatmak için açıklığa doğru hareket ederler. Boşluğu kapatma olayı, farklı zaman noktalarında görüntüleme veya zamana bağlı mikroskopi ile manuel olarak izlenebilir. (Liang et al., 2007). *In vitro* koşullarda alg ekstralarının yara alanını kapatma potansiyeli Çizelge 3.25'te gösterildiği üzere, kahverengi alg ekstraları arasında en yüksek yara alanına göç eden hücrelere sahip örneğin Hs-Met (%76) olduğu ve bunun sırasıyla Hs-Chl (%24,6) ve Hs-Hex (%9) örneklerinin izlediği tespit edilmiştir. Literatür kapsamında, yara iyileştirme potansiyeline sahip bitkilerin aktivite tayini yapılırken çoğunlukla fenolik içerik ve antioksidan test yöntemleri paralel olarak kullanılmakta ve yüksek radikal etkinliğin ve içeriğin yara iyileştirmeyle bağlantılı olduğu savunulmaktadır. Marwah et al., (2007) 19 farklı bitki etanol ekstralarının antioksidan ve yara iyileştirme potansiyelini değerlendirdikleri çalışmalarında, en yüksek total fenolik içerik ve antioksidan aktiveye sahip *A. rubifolis*, *M. peregrina* ve *A. indica* örneklerinin en iyi iyileşme kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yaprakları geleneksel olarak yara iyileştirmelerinde kullanılan *Wedelia trilobata* bitkilerinin *in vitro* wound healing, antioksidan ve fenolik içeriklerinin değerlendirildiği çalışmada, kontrole göre daha aktif fenolik içeriklerin %70 oranında yara alanında proliferasyona yol açtığı rapor edilmiştir (Balekar et al., 2012). Deney sonucunda, *H.scoparia* ekstraları içerisinde en yüksek fenolik içerik ve ABTS⁺ aktivitesine sahip Hs-Met ekstresinin aynı zamanda en iyi proliferasyonu göstermesi literatürü destekler nitelikte olduğunu kanıtlamıştır. Bununla birlikte, alglerin yara iyileştirme modelleri üzerine sınırlı sayıda çalışmalar mevcut olsa da, elde edilen sonuçlar etkili ajanlar olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Baliano et al., (2016) kahverengi alg *Padina gymnospora*'nın *in vitro*'da normal fibroblast (L929) hücre hatlarında yara modeli oluşturarak etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, alg metanol ekstralarının 25.0 µg ml⁻¹ konsantrasyonlarında kontrole kıyasla daha yüksek proliferasyon gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. *In vitro* yara modelinin en önemli avantajlarından biri, hücrelerin *in vivo* migrasyonunu bir dereceye kadar taklit etmesidir. Kahverengi alg *Cystoseira trinodi*'nin 21 gün boyunca *in vivo* ekzisyon modeliyle ratlarda oluşturulan yara modeli üzerine etkilerine bakıldığında, ekstraların fibroblastın çoğalmasımı ve anjiyojenezi indükleyerek yara kapanma süresini azaltıp yara kontraksiyonunu arttırdığı ortaya konulmuştur (Madkour et al., 2013). Yeşil alg ekstralarının yara alanını kapatma yüzdeleri incelendiğinde,

Chl ekstrei %83 oranıyla sırasıyla Met %51 ve Hex %37 örneklerinden daha iyi bir proliferasyon sağladığı görülmüştür. Yara iyileştirme potansiyelleri üzerine ekstrelerin farklı etkinlik göstermesi, örneklerin sahip olduğu biyolojik metabolitlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. HPLC ile içerik tayini analizi sonuçlarına bakıldığında Chl ekstresinin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla yara iyileştirme etkinliği kanıtlanmış kersetin içeriklerine sahip olduğu görülmüştür. Ratlarda yara alanı oluşturularak yürütülen bir çalışmada, kersetinin VEGF and TGF- β 1'deki ekspresyon artışlarının yanısıra sitokin ve büyüme faktörlerinin etkinliğinde düzenleyerek yara alanını kapattığı bildirilmiştir (Gopalakrishnan et al., 2016). Rajamanickam et al., (2013) tarafından yürütülen benzer bir çalışmada ise, 16. günde kersetin uygulanan gruplarda kontrole kıyasla yara alanında %91.83'lük bir proliferasyon olduğu gözlenmiştir. Wound healing modelinde etkinliğini değerlendirdiğimiz diğer alg türü kırmızı alg ekstreleri incelendiğinde ise, özellikle Met (%85) olmak üzere Chl (%78) ekstreleri ile birlikte Hex (%11) grubuna kıyasla daha yüksek proliferasyonlar gözlenmiştir. Met ekstrelerindeki aktivite antioksidan aktivite ve total fenolik içeriklerden kaynaklı olduğu düşünülürken (Bkz. Çizelge 3.2 ve Şekil 3.6), Chl ekstrelerindeki yüksek proliferasyon değerleri içerik analiz sonuçlarında elde edilen α -tokoferol içeriklerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Bkz. Şekil 3.1).

α -tokoferol antioksidan, anti-enflamatuar ve anti-tümör aktiviteleri de dahil olmak üzere birçok yararlı özelliği kanıtlanmış olmakla birlikte, deri ve deri patolojisindeki rolü üzerine de etkili sonuçlara ulaşılmaktadır. Literatürde α -tokoferol'ün yara iyileştirme potansiyeli üzerine olan etkilere bakıldığında sonuçlarımızı kanıtlayıcı bilgilere ulaşılmaktadır. Dooley et al., (2010) yürüttükleri çalışmalarında, potansiyel bir antioksidan kaynağı olduğunu ayrıca α -tokoferol'ün hem normal hem de hipergludidik koşullarda fokal adezyon kinazları (FAK), c-Jun N-terminal kinazları (JNK) ve hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar (Erk) gibi yara iyileşmesinin özelliklerini belirleyen faktörleri etkileyerek keratinositlerin ve fibroblastların hücre göçünü hızlandırdığını ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde, *Blechnum orientale* yapraklarından izole edilen α -tokoferol'ün diğer izole edilen bileşikler gibi yara alanında proliferasyonu arttırdığı rapor edilmiştir (Lai et al., 2011). Çalışmalarımız sonucunda elde edilen ilginç bulgularda dikkat çekici

bulunmuştur. Birçok model sistem çalışmasında, apoptozisin doku rejenerasyonun arkasındaki itici güç olabileceği düşünülmektedir. Spesifik olarak, blastema oluşumu da dahil olmak üzere, yenilenmenin proliferatif özelliği apoptotik hücrelerden alınan sinyaller ile uyarılmaktadır (Gurtner et al., 2008). Bu fenomen "apoptosise bağlı telafi edici çoğalma" olarak adlandırılır ve kaspazların, stresli veya hasar görmüş hücrelerden mitojenlerin salınmasını etkilediğini ve dolayısıyla yenilenmeyi teşvik ettiğini göstermektedir (Bergmann and Steller, 2010; Fuchs and Steller, 2011). Özellikle Casp -14'ün, epitel hücresi ve keratinosit farklılaşmasında rol oynadığı ayrıca dehidrasyon ve UVB radyasyona karşı epidermal bir bariyer oluşturduğu bilinmektedir (Denecker et al., 2008). Bu bilgiler ışığında en yüksek yara iyileştirme potansiyeline sahip Gg-Met örneklerinin apoptozis sonuçlarına bakıldığında (Bkz. Çizelge 3.12) Casp -14 ekspresyonundaki artışların bu fenomeni destekleyebileceğini ortaya koymaktadır.

Anjiyogenez süreci yeni damar oluşumundan çok var olan damarlardan yan dal ve filiz oluşumlarıyla meydana gelen damarlanmalar olarak bilinmektedir. Anjiyogenezde normal fizyolojik koşullar altında, proanjiyojenik ve antianjiyojenik faktörler arasında bir denge vardır, ancak bu denge, fizyolojik süreçleri teşvik etmek için ya da patolojik bir durumun bir parçası olarak her iki tip arabulucuya doğru kayabilir (Al-Husein et al., 2012). Bu durumda anjiyogenez sağlıklı hücreler için vazgeçilmez bir kaynak olan damar oluşumunu ifade etse de, kanser gibi metabolizması hızlı ilerleyen durumlarda ise canlılık için hayati risk taşımaktadır. Anjiyogenez kanser hücrelerinin başta hipoksi olmak üzere belirli uyaranlara maruz bırakılmasıyla aktive edilir ve tümörün kalınlığı 2 mm'den fazla büyüdüğünde vasküler endotelial büyüme faktörlerini (VEGF) etkileyerek yeni kaynaklara ulaşım sağlar. Bu yeni kan damarlarının gelişimi sadece tümör dokusunun besin maddeleri ile beslenmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kanser hücrelerinin metastazı için bir araç olabilmektedir (Nishida et al., 2006). Son yıllarda, kanserin antianjiyogenez sürecine müdahale sürecinde direkt olarak tümöre hedef almaktan ziyade, beslenmesini sağlayan damarlanma mekanizmasını inhibe eden çalışmalar tasarlanmıştır. Bu süreçte, anjiyogenez sürecine müdahale sürecinde endotelial büyüme faktörleri inhibitörleri, endotel hücre sinyal transdüksiyon inhibitörleri, endotel hücre proliferasyonunun önleyicileri, matris metaloproteinaz inhibitörleri ve endotel kemik iliği öncü hücrelerinin inhibitörleri

gibi hedef anjiyogenez inhibitörlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir (Denekamp, 1993; Muslim et al., 2012). Yürütülen birçok çalışma da, doğal kaynaklı anti-anjiyojenik ilaçların, yan etkileri azaltmada geleneksel kanser tedavisine kıyasla iyileşme sağladığı, tümörü besleyen yeni kan damarlarının oluşumunu inhibe ettiği ve bu süreçte ilaç direnci olasılığının düşük olduğu bildirilmektedir (Ciardiello et al., 2000). Bu bilgileri destekleyici olarak, *in vivo* HET-CAM testi kullanarak alg ekstrelerinin antianjiyogenik etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmada, alg örneklerin farklı aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Kahverengi alg Met ve Chl ekstrelerinin 900 mg/kg orta düzeyde antianjiyogenik etki gösterdiği tespit edilirken, Hex örneklerinde etkiler gözlenmemiştir. Hs-Chl ve Hs-Met ekstrelerinin HeLa ve MCF-7 gibi kanser hücre hatlarında da etkili inhibisyon sağlaması antianjiyogenik ajanların sitotoksik potansiyellerine de dikkat çekmektedir. Namvar et al., (2013) benzer yürüttükleri çalışmalarında da, kahverengi alg *Sargassum muticum* metanol ekstrelerinin antianjiyogenik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, MCF-7 hücre hatlarında sitotoksik etki gösteren metanol ekstrelerinin HET-CAM'da antianjiyogenik etkili olduğunu bildirilmişlerdir. Çalışmamızdaki hem sitotoksik hemde antianjiyogenik etkili yeşil alg ekstrelerinde de benzer etkiler gözlenmiştir. El-Chl ve El-Met örnekleri güçlü antianjiyogenik etkiler gösterirken, El-Hex ekstrelerinde aktivite gözlenmemiştir. Bu farklılıkların alg içeriklerindeki farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle en etkili inhibisyonu sağlayan El-Chl'da tespit edilen kersetin içerikleri etkisi kanıtlanmış önemli bir antianjiyogenik ajandır. Pratheeshkumar et al., (2012) tarafında kersetinin *ex vivo*, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, pankreas kanser hücrelerinde VEGF-R2 ile düzenlenen AKT/mTOR/P70S6K sinyal yolağını hedefleyerek tümör büyümesini ve anjiyogenezini inhibe ettiğini ve kanser terapisi için potansiyel bir ilaç adayı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. başka bir çalışmada, kersetin'in VEGF transkripsiyonunu hipoksiye bağlı STAT3 aktivasyonunun bastırılmasıyla inhibe edebileceğini göstermiştir (Ansó et al., 2010). Aynı zamanda sitotoksik ve antiangiogenik etkili bu ekstrelerin endotel hücre büyüme faktörü yolları üzerine herhangi bir kanıtımız olmadığı için, mevcut etkilerinin endotel hücrelerin proliferasyonu üzerinden olabileceği düşünülmektedir. Zira, solid tümör yatağındaki endotel hücreleri, yüksek proliferasyon hızlarından ötürü sitotoksik ajanlara daha duyarlı olma

eğilimindedir. Buna ek olarak, kanserli hücelere zıt olarak, endotel hücreleri genetik olarak kararlıdır çünkü mutasyona uğramazlar ve bu nedenle sitotoksik ajanların apoptotik etkilerine daha duyarlıdırlar (Folkman, 2003; Muslim et al., 2012). Dolayısıyla, endotel hücrelerinin bu özellikleri onları antiangiogenez tedavisi için çekici bir hedef yapmaktadır. A549, BEL-7402, MKN-45 gibi tümör endotel hücrelerinin çoğalması üzerine kersetin'in etkinliğinin incelendiği çalışmada, kersetinin *in vivo* HET-CAM denemelerinde anti-anjiyojenik etkinlik göstermesi bu durumu destekler niteliktedir (Tan et al., 2003). Antianjiyojenik etkili diğer bir grubumuz kırmızı alg örnekleri incelendiğinde, Gg-Met ekstrelerinde güçlü bir etki gözlenirken, Gg-Chl'da orta düzeyde etkinlik not edilmiştir. Gg-Hex örneklerinde ise herhangi bir etkinlik gözlenmemiştir. Gg-Met'in sitotoksik etkinlikle ilişkilendirmesi yapıldığında sadece daha az agresif HeLa hücrelerinde etkinlik göstermesi belirli yolaklar üzerinden (JAK/STAT PI3K/AKT) büyüme hücre reseptörlerinin inhibisyonuna neden olabileceğini göstermektedir. Bu hücre hatlarında özellikle proliferasyondan sorumlu STAT3 ve NFkB genlerindeki inhibisyonlara paralel PTEN ekspresyonlarındaki artışlar bu durumu açıklamaya yardımcı olabilecek bulgulardır.

Mutajen kavramı, bir organizmanın genetik materyalini (genellikle DNA) değiştiren ve normal seviyesinin üstünde mutasyon sıklığına yol açan fiziksel veya kimyasal ajanlardır. Aynı zamanda mutasyonların çoğu kansere neden oldukları için mutajenler kanserojen maddeler olarak da adlandırılmıştır. Mutajenler genetik materyali direkt yada farklı kimyasalların sentezinin indüksiyonu yoluyla indirekt bir şekilde (promutajenin mutajene dönüşümü) DNA'yı etkileyebilmektedirler (Bhattacharya, 2011; Słoczyńska et al., 2014). Antimutajen olarak bilinen doğal ve sentetik bileşiklerin potansiyel olarak zararlı kimyasalların mutajenik etkilerini azaltabildiği veya kaldırabildiği bilinmektedir (Ferguson, 1994). Mevcut çalışmamızın bu basamağında, antioksidan ve antikanser etkinlikleri ortaya konulan *H.scoparia*, *E.linza* ve *G.gracilis* alg örneklerinin -S9'suz ve +S9'lu ortamda TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları kullanılarak tespit antimutajenik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Antimutajenler etki mekanizmalarına dayanarak antioksidan aktiviteye sahip bileşikler, mutajenlerin aktivasyonunu inhibe eden bileşikler, bloke edici maddeler ve çeşitli etki şekilleri ile karakterize edilen bileşikler şeklinde

gruplandırılmaktadır. Yürütülen pek çok çalışmada, polifenoller, vitaminler, klorofiller, karotenoidler ve askorbik asit gibi fitokimyasalları içeren tıbbi bitkiler ve yosunların antioksidan özelliklerinden dolayı antimutajenler ve antikarsinojenler olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Cornish and Garbary, 2010). Kahverengi alg ekstrelerinin antimutajenik etkinlikleri incelendiğinde, Hs-Met örneği 2000 ve 5000 µg/mL konsantrasyonlarda TA 98, TA 100 ve TA 1537 üzerinde +S9'lu ve -S9'suz ortamda istatistiksel olarak zayıf bir antimutajenik aktivite sergilemiştir. Bununla birlikte, apolar Hs-Chl ve Hs-Hex örneklerinde ise herhangi bir aktivite kaydedilmemiştir. Bu sonuçlar ışığında, kanser hücre hatlarında etkinlik gösteren polar Hs-Met ekstrelerinin sahip olduğu antioksidan kapasite (Bkz Çizelge 3.6) ve fenolik içerikleriyle (Bkz Çizelge 3.2) literatürü destekleyici şekilde antimutajenik sonuçlar elde edilmiştir. Bhagavathy et al., (2011) antioksidan aktiviteye sahip alg metanol ekstrelerinin *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA 102 suşlarında yüksek antimutajenik etkinlik göstermesi sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Yeşil alg örneklerinin antimutajenik etkinlikleri incelendiğinde, Hex ekstresinin hiçbir suşda etkinlik göstermemesine rağmen Met ve Chl örnekleri baz çifti değişikliğine neden olan TA 100 ve TA 1537 suşlarında zayıf olarak antimutajenik bir etki göstermiştir. Bu durum Met ve Chl bu etkinliği antioksidan aktivite ve kersetin gibi bileşiklerin varlığıyla ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda bu ekstrelerin çerçeve kayması TA 98 ve TA 1535 suşlarında etkinlik göstermemesi baz çifti değişikliği mutajenlerine göre daha kararlı bir yapıda olduklarını göstermektedir. Yeşil alglerin antimutajenik etkilerinin değerlendirildiği benzer bir çalışmada, antioksidan etkili *Spirogyra neglect* sulu ekstrelerinin TA 98 ve TA 100 suşlarında muhtemel mutajen metabolizmasındaki bazı enzimlerin inhibisyonu üzerinden indirekt bir antimutajenik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Thumvijit et al., 2013). Yeşil alg *Chlorococcum humicola*'nın *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 mutajenik aktivitelerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, yüksek karotenoid içeriklerine sahip bu alg türünün metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda histidin geri dönüşümü sayısını etkili bir şekilde azalttığı ortaya konulmuştur (Bhagavathy et al., 2011). Mevcut literatürdeki pek çok çalışmada kırmızı alglerin bakteri suşları üzerine herhangi etkinliği olmadığı gözlenmiştir (Syad and Kasi, 2014). Fakat çalışmamızdaki kırmızı alg türlerinin antimutajenik etkileri incelendiğinde ise diğer alg türlerine kıyasla zayıf fakat daha geniş bir spektrumda

aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle α -tokoferol içeriğine sahip (Bkz. Şekil 3.1) Chl ekstraları TA 98 suşlarında -S9'suz, TA 1535 ve TA 1537 suşlarında ise hem -S9 hemde +S9'lu ortamda zayıf antimutajenik etkiler gösterdiği görülmüştür. α -tokoferol mevcut etkileri pek çok bakteri suşunda çalışılmış ve antimutajenik etkileri ortaya konulmuştur. Bununla birlikte bu mutajenik aktivitenin +S9 metabolik aktivasyon sistemi ile daha da arttığı tespit edilmiştir (Sun et al., 2002). Ayrıca Chl ekstralarının bu aktivitesi kanser hücrelerinde gösterdiği sitotoksik etkilerle paralellik göstermektedir (Bkz. Çizelge 3.10). Ayrıca Met ekstraları TA 1535 ile TA 1537 ve Hex ekstraları TA 98 ile TA 100 suşlarında metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda hem çerçeve kayması hemde baz çifti değişimlerinde zayıf etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Kada et al., (1982) tarafından mutajenler, desmutajenler; ekstraselüler olarak mutajenik ajanları DNA'ya ulaşmadan önce etkisiz hale getirebilen ve biyoantimutajenler; DNA hasarından sonra mutasyon baskılamasına katılanlar (gen tamiri ve replikasyonu) şeklinde ayırt edilmiştir. Bununla birlikte, besin kaynaklı antimutajenlerin, mutajenleri bağlama veya adsorpsiyon yoluyla temizleyebildiği ve bu işlem sırasında DNA ile reaksiyona girmeden ve bozulmadan kalarak desmutajenik özellik gösterdikleri ortaya konulmuştur (Jain et al., 1987). Bu tanımlardan yola çıkarak alg ekstralarının zayıf da olsa göstermiş oldukları antimutajenik etkiler daha çok desmutajenik olarak mutajenleri enzimatik veya kimyasal etkileşim yoluyla kısmen veya tamamen etkisiz hale getirme şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir.

In vitro çalışmalar, bir veya birden fazla ajanın tek seferde farklı test yöntemleriyle inceleme şansı tanıdığı için yeni tedavilerin daha hızlı gelişimine yol açarlar. Ayrıca deneme sonunda yalnızca etkili olduğu anlaşılan maddelerin *in vivo* çalışmalarına devam edildiği için insan veya hayvanlarda yeni bir ilacın olası yan etkilerine maruz kalmak şansında elemine olabilmektedir. Çalışmamızın bu basamağında, farklı *in vitro* test yöntemleriyle etkinlikleri ortaya konulmaya çalışılan kahverengi, yeşil ve kırmızı alg türleri arasından özellikle antioksidan aktivite bakımından diğer alg gruplarından daha etkili olduğunu düşündüğümüz *H.scoparia*'nın *in vivo* fare kemik iliğinde kadmiyumun hasarlarına karşı protektif etkilerinin incelemesi yapılmıştır. Protektif etkiler farklı ajanlar tarafından farklı sistemler üzerinde yol açtığı hasara karşı koruyucu bir etki sağlaması amacıyla

günümüze kadar yoğun olarak çalışılmıştır. Kadmiyum toksik etkileri bilinen ve pek çok organ üzerinde hasarlara neden olabilen önemli bir karsinojeniktir. Bu hasar mekanizmasının genellikle hücrede oluşturduğu oksidatif stres ve bunun sonucu olarak genetik materyalde meydana getirdiği değişimlerdir. Kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki zararlı etkilerinin incelenmesi için çeşitli testlerden yararlanılmaktadır. Kromozom aberrasyonları (KA) ve mikronukleus (MN) oluşumu gibi sitogenetik testler genotoksik hasarın incelenmesinde kullanılan önemli testlerdendir (Sato and Tomita, 2001).

İn vivo çalışmamızda genotoksik etkilerin karşılaştırılması yapılmadan önce hayvanların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve alg 900 mg/kg gruplarında deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar görülmüştür. Kadmiyum grubunda deney öncesi ve deney sonrası farelerin vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında farelerin vücut ağırlıklarında düşüşler görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Kadmiyum grupları incelendiğinde ise farelerin vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı düşüşler görülmüştür. Kronik kadmiyum uygulamasıyla vücut ağırlığındaki muhtemel azalmaların sebebi, oral yolla alınan kadmiyumun bağırsak epitellerinde oluşturacağı hasar dolayısıyla amino asit ve kalsiyum gibi vücut gelişimi için gerekli maddelerin yeterince absorbe edilememesinden kaynaklanacağı belirtilmektedir (Kara, 1998). Protektif etkilerin değerlendirildiği gruplarda ise Alg+Cd uygulamalarının Cd gruplarına göre vücut ağırlıklarını koruduğu özellikle de en yüksek 900 mg/kg'da vücut ağırlıklarında deney öncesine göre azalışlar olmasına rağmen tek başına Cd uygulamalarına göre ağırlıklık azalışlarını baskıladığı görülmektedir.

MN yöntemi, kimyasal bileşiklerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan hassas kısa süreli bir yöntemdir. Mevcut çalışmamızda, kadmiyum uygulamaları sonucunda farelerde MN frekansında kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Benzer şekilde sadece alg grubunun tek başına uygulandığı farelerde kontrole yakın önemli olmayan MN frekansı tespit edilmiştir. Buna paralel olarak kadmiyum ve algin birlikte uygulandığı gruplarda artan alg konsantrasyonlarına paralel olarak kadmiyum uygulanan gruba göre MN frekansında önemli azalmalar ortaya konulmuştur. Benzer sonuçlar KA test yöntemlerinde de tespit edilmiştir. 400 metafaz plağı incelemeleri sonucunda

kontrol ve alg gruplarında önemli etkiler gözlenmezken tek başına Cd uygulamalarında önemli artışlar not edilmiştir. Cd+Alg grupları incelendiğinde ise doz artışlarına bağlı olarak kromozom abberasyonlarında önemli azalışlar kaydedilmiştir. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar içeriğine ve uygulama yöntemine göre zincir kırıcı veya süpürücü olarak etkinlik gösterebilmektedir (Nimse and Pa, 2015). Algler ise hem süpürücü etkinlikteki karotenoidlere hemde zincir kırıcı vitamin içeriklerine sahip olduğundan, göstermiş oldukları antigenotoksik etkiler sürece herhangi bir aşamada müdahale etme yeteneğinde olduğunu gösterebilmektedir. Benzer sonuçlar literatür çalışmalarıyla desteklenmektedir. Cleide et al., (2007) doksorubisin ile uyarılan DNA zararlarına karşılık kahverengi alg *Fucus vesiculosus* sulu ekstrelerinin *in vitro* protektif etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, alg ekstrelerinin genotoksik etki oluşturmamasının yanısıra oluşan DNA hasarlarına karşılık antigenotoksik etkiler göstermeleriyle yalnızca oksidasyon önleyici olarak görev yaptıklarını bildirmişlerdir. *Ascophyllum nodosum* ve *Sargassum micracanthum* gibi diğer kahverengi alg ekstreleri *in vitro*'da, *Undaria pinnatifida* ise *in vivo*'da oksidatif strese karşı antioksidan etkiler gösterdikleri bildirilmiştir. (Ohigashi et al., 1992; Le Tutour et al., 1998; Mori et al., 2003).

5. SONUÇ

Mevcut çalışmamız İzmir Körfez'inden toplanan kahverengi *H.scoparia*, kırmızı *G.gracilis* ve yeşil *E.linza* alg Hex, Chl ve Met ekstralarının *in vitro*'da antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik /apoptotik aktivite, anti anjiyogenik ve antimitojenik aktivite ile *in vivo*'da protektif etkilerini geniş bir spektrumda değerlendiren ilk çalışmadır. Değerlendirmeler sonucunda öncelikle alglerin antioksidan, antimikrobiyal, antianjiyogenik ve antimitojenik aktivitelerinde ortaya çıkan farklılıkların alg ekstralarının sahip oldukları farklı yapıdaki sekonder metabolitlerden kaynaklandığı, kanser hücre hatlarındaki sitotoksik ve apoptotik denemelerde ise bu farklı sekonder yapılara ek olarak kanser hücrelerinin göstermiş olduğu direnç ve posttranslasyonel mekanizmadaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Genel olarak alg örnekleri incelendiğinde özellikle kahverengi alg *H.scoparia*'nın antioksidan, sitotoksik/apoptotik ve *in vivo* protektif etkilerinin diğer alg gruplarına kıyasla daha geniş bir spektrumda etkili olmasından dolayı önemli bir antikanser ajanı olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği ortaya konulmuştur. Yeşil alg *E.linza*'nın daha agresif kanser hücre hatlarındaki ve antianjiyogenikteki etkinlikleri ile kırmızı alg *G.gracilis* ekstralarının antimitojenik ve wound healing denemelerindeki etkinlikleri, yürütülecek ileri *in vivo* analizler ile desteklenerek doğal etkili ilaç adayı olma potansiyeli taşıdığını ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aaron, C.S., Sorg, R. and Zimmer, D.,** 1989, The Mouse bone marrow micronucleus test. Evaluation of 21 drug candidates, *Mutation Research*, 223:129-140 pp.
- Abirami, R.G. and Kowsalya, A.S.,** 2012, Anticancer activity of methanolic and aqueous extract of *Ulva fasciata* in Albino mice, *Int J Pharma Pharmaceut Sci*, 4:681-84 pp.
- Abu-Ghannam, N. and Rajauria, G.,** 2013, Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*; Domínguez, H., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 287–306 p.
- Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J.D. and Meyer, A.S.,** 2011, Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro, *Marine Drugs*, 9(12): 2605–2621 pp.
- Al Hazzani, A.A., Shehata, A.I., Moubayed, N.M.S. and Al Hourri, H.J.,** 2014, Antimicrobial and biochemical properties of selected edible brown and red marine macroalgae, *J. Pure Appl. Microbiol*, 8:1275–1282 pp.
- Al-Husein, B., Abdalla, M., Trepte, M., Deremer, D.L. and Somanath, P.R.,** 2012, Antiangiogenic therapy for cancer: an update, *Pharmacotherapy*, 32:1095–111 pp.
- Alghazeer, R., Whida, F., Al-Najjar, A., Majdoob, H. and Al Mazoghi, E.,** 2008, Assessment of antioxidant activity and phenolic content of some marine algae from the Libyan Coast, *A in Shams Science Bulletin*, 46:67-78 pp.
- Alves, A., Sousa, R.A., and Reis, R.L.,** 2013, A practical perspective on ulvan extracted from green algae, *J. Appl. Phycol.*, 25:407–424 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Amsler, C.D. and Fairhead, V.A.**, 2006, Defensive and sensory chemical ecology of brown algae, *Adv Bot Res*, 43:1–91 pp.
- Anbuchezhian, R., Karuppiyah, V. and Li, Z.**, 2015, Prospect of Marine Algae for Production of Industrially Important Chemicals. In: Debabrata Das (ed.). *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, Springer Press., 195-217 p.
- Anggadiredjal, J., Andyani, R. and Hayati, M.**, 1997, Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* Phaeophyta and *Laurencia obtuse* Rhodophyta from Seribu Islands, *J Appl Phycol.*, 9:477–479 pp.
- Ansó, E., Zuazo, A., Irigoyen, M., Urdaci, M.C., Rouzaut, A. and Martínez-Irujo, J.J.**, 2010, Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism, *Biochem. Pharmacol.*, 79:1600–1609 pp.
- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., and Domínguez, H.**, 2013, In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from Brown algae, *Food Chem.*, 138:1764–1785.
- Balekar, N., Katkam, N. G., Nakpheng, T., Jehtae, K. and Srichana, T.**, 2012, Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves, *J. Ethnopharmacol*, 141:817–824.
- Baliano, A.P., Pimentel, E.F., Buzin, A.R., Vieira, T.Z., Romão, W., Tose, L.V., Lenza, D., de Andrade, T.U., Fronza, M. and Kondratyuk, T.P.**, 2016, Brown seaweed *Padina gymnospora* is a prominent natural wound-care product, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(6):714–719 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barbot, Y.N., Al-Ghaili, H. and Benz, R.,** 2016. A review on the valorization of macroalgal wastes for biomethane production, *Mar. Drugs*, 14 p.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P.,** 2006. *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, CRC Press Taylor & Francis Group. 320pg, USA.
- Bergmann, A. and Steller, H.,** 2010, Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration, *Sci Signal.*, 3, 8 p.
- Berteau, O. and Mulloy, B.,** 2003, Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide, *Glycobiology*, 13:29–40 pp.
- Bhadury, P. and Wright, P.C.,** 2004, Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications, *Planta*, 219:561–578 pp.
- Bhagavathy, S., Sumathi, P. and Madhushree, M.,** 2011, Antimutagenic assay of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* using *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA102, *Asian Pac J Trop Dis.*, 1:308–316 pp.
- Bhagavathy, S. and Sumathi, P.,** 2012. Evaluation of antigenotoxic effects of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* using human lymphocytes, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2):109-117 pp.
- Bhattacharya, S.,** 2011, Natural Antimutagens: A Review, *Research Journal of Medicinal Plants*, 5:116-126 pp.
- Bhuvanewari, S., Murugesan, S., Subha, T.S., Dhamotharan, R. and Shettu, N.,** 2013, In vitro antioxidant activity of marine red algae *Chondrococcus hornemanni* and *Spyridia fusiformis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(3):82-85 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blunt, J.W., Copp, B.R. and Hu, W.P., Munro, M.H.G, Northcote, P.T. and Prinsep, M.R.,** 2007, Marine natural products, *Nat Prod Rep.*, 24:31–86 pp.
- Broker, L.E.; Kruyt, F.A. and Giaccone, G.,** 2005, Cell death independent of caspases: a review. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11:3155-62 pp.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S.,** 2003, Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, 15:725-731 pp.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J.,** 1985, Introduction to the algae. Structure and Reproduction. 2nd edn. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, 720 p.
- Boopathy, N.S. and Kathiresan, K.,** 2010. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview, *Journal of Oncology*, Article ID 214186, 18 p.
- Borowitzka, M.A.,** 2013, High-value products from microalgae—their development and commercialization, *J. Appl. Phycol.*, 25:743–756 pp.
- Bouarab, K., Adas, F., Gaquerel, E., Kloareg, B., Salaun, J.P. and Potin, P.,** 2004, The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways., *Plant Physiol.*, 135:1838-1848 pp.
- Budd, G.C. and Pizzola, P.,** 2002, *Enteromorpha intestinalis*. Gut weed. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line], Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom.
- Buhaescu, I. and Izzedine, H.,** 2007, Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications, *Clin Biochem.*, 40(9–10):575–84.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G. and Wright, P.C.,** 2001, Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products, *Tetrahedron*, 57:9347–9377 pp.
- Burtin, P.,** 2003, Nutritional value of seaweeds, *Electron J Environ Agric Food Chem*, 2:498–503 pp.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M, and Chern, J.C.,** 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 10: 178-182 pp.
- Chien, S.Y., Wu, Y.C., Chung, J.G., Yang, S.Y., Lu, H.F., Tsou, M.F., Wood, W.G., Kuo, S.J. and Chen, D.R.,** 2009, Kersetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells, *Human and Experimental Toxicology*, 28(8):493-503 pp.
- Campos, A., Souza, C.B., Lhullier, C., Falkenberg, M., Schenkel, E.P., Ribeiro-do-Valle, R.M. and Siqueira, J.M.,** 2012, Anti-tumor effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 64:1146–1154 pp.
- Capelo, J.L. and Mota, A.M.,** 2005, Ultrasonication for analytical chemistry, *Current Analytical Chemistry*, 1(2):193.
- Chapman, V.J.,** 1970, *Seaweeds and their uses*, 2nd edn. Methuen, London, 304p.
- Cho, M., Kang, I. J., Won, M. H., Lee, H. S. and You, S.,** 2010, The Antioxidant Properties of Ethanol Extracts and Their Solvan-Partitioned Fractions from Various Green Seaweeds: *Journal of Medicinal Food*, 13:1232-1239 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Choi, K.C., Lee, Y.H., Jung, M.G., Kwon, S.H., Kim, M.J., Jun, W.J., Lee, J., Lee, J.M. and Yoon, H.G.,** 2009, Gallik asid suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB signaling by preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells, *Mol. Cancer Res.*, 7:2011–2021 pp.
- Chung, A.S. and Ferrara, N.,** 2011, Developmental and pathological angiogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 27:563–584 pp.
- Ciardiello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Pomatico, G., De Placido, S., Bianco, A.R. and Tortora, G.,** 2000, Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor, *Clin Cancer Res.*, 6:2053-63 pp.
- Clardy, J. and Walsh, C.,** 2004, Lessons from natural molecules, *Nature*, 432:829–837 pp.
- Cleide, L.S., Gusmão, C.L.S. and Takahashi, C.S.,** 2007, Genotoxic and antigenotoxic effects of *Fucus vesiculosus* extract on cultured human lymphocytes using the chromosome aberration and Comet assays, *Genet Mol Biol.*, 30(1):105–111 pp.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J.,** 2003, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.*, 17:1195–1214 pp.
- Cornish, M.L. and Garbary, D.J.,** 2010, Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition, *Algae*, 25:155–171 pp.
- Cowan, M.M.,** 1999, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, 564–582.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cox, S., Abu-Ghannam, N. and Gupta, S.,** 2010, An Assessment of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Six Species of Edible Irish Seaweeds, *International Food Research Journal*, 17:205-220 pp.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G.,** 2000, Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24:1250-1319 pp.
- Cynthia, A. and Reinhart-K.,** 2008, Chapter 3:Endothelial Cell Adhesion and Migration. *Methods in Enzymology*, Volume 443.
- Çelikler, S., Yıldız, G., Vatan, O. and Bılaloglu, R.,** 2009, Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, 47(4):796–801.
- Datta, A., Bryant, D.M. and Mostov, K.E.,** 2011, Molecular regulation of lumen morphogenesis, *Curr. Biol.*, 21:126-136 pp.
- Dawes, C.J.,** 1998, *Marine Botany*. 2nd edition. J. Wiley & Sons, New York, 480.
- De Flora, S.,** 1998, Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutat Res.*, 402:151–158 pp.
- De Kok, T.M., Van Breda, S.G. and Manson, M.M.,** 2008, Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review, *Eur J Nutr*, 47(2):51- 59 pp.
- Demain, A.L.,** 1999, Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52:455-463 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Devi, G.K., Manivannan, K., Thirumaran, G., Rajathi, F.A.A. and Anantharaman, P.,** 2011, In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from southeast coast of India, *Asian Pac J Trop Med.*, 4(3):205-211 pp.
- Dias, P.F., Siqueira Jr, J.M., Maraschin, M., Ferreira, A.G., Gagliardi, A.R. and Ribeiro-do-Valle, R.M.,** 2005, Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 56(4):436–446.
- Dittmann, E. and Wiegand, C.,** 2006, Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs, *Molecular and Nutrient Food Research*, 50:7–11 pp.
- Divya, C.V., Devika, V., Asha, K.R.T. and Bharat, G.,** 2011, Antimicrobial Screening of the Brown Algae *Sargassum cinereuma*, *Journal of Pharmacy Research*, 4(2):420-421 pp.
- Dixon-Peter, S.,** 1977, *Biology of the Rhodophyta* (Reprint. ed.). Koenigstein: Koeltz.
- Dooley, A., Shi-Wen, X., Aden, N., Tranah, T., Desai, N., Denton, C.P. and Bruckdorfer, R.,** 2010, Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate, *Rheumatology*, 49(11):2024-2036 pp.
- Dorta, E., Cueto, M., Brito, I. and Darias, J.,** 2002, New terpenoids from the brown alga *Stypopodium zonale*, *J Nat. Prod.*, 65:1727-30 pp.
- Dr. Rachel Einav,** “Seaweeds of Eastern Mediterranean coast”, <http://www.blueecosystems.com/Stypocaulon-scoparium.html> (Erişim tarihi:03 Kasım 016).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F.F., Karabay-Yavasoglu, U.N., Ozdemir, G. and Sukatar, A.,** 2009, Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74 (6):619–628 pp.
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P. and Declercq, W.,** 2008, Caspase-14 reveals its secrets, *The Journal of Cell Biology*, 180(3):451–458 pp.
- Denekamp, J.,** 1993, Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy, *British Journal of Radiology*, 66:181-96.
- Dröge, W.,** 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, 82(1):47–95 pp.
- Duo, J., Ying, G.G., Wang, G.W. and Zhang, L.,** 2012, Kersetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation, *Molecular Medicine Reports*, 5(6): 1453-6 pp.
- Eastmond, D.A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W.A., Cimino, M.C., Dobrev, I., Douglas, G.R., Nohmi, T., Phillips, D.H. and Vickers, C.,** 2009, Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme, *Mutagenesis*, 24:341–349 pp.
- Ekwall, B.,** 1980, Screening of toxic compounds in tissue culture, *Toxicol.*, 17:127-42 pp.
- El Gamal, A.A.,** 2012, Biological importance of marine algae. In: Se-Kwon Kim (Ed.), *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology*, John Wiley & Sons, 567 p.
- Enoki, T., Sagawa, H., Tominaga, T., Nishiyama, E., Komyama, N., Sakai, T., Yu, F.G., Ikai, K. and Kato, I.,** 2003, Drugs, foods or drinks with the use of algae-derived physiologically active substances, US Patent, 0,105,029.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ercan, F.**, 1995, İzmir Körfezinde Kırmızı Makro Alglerin (Rhodophyta) Kültürü, yüksek lisans tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Anabilim Dalı Canlı Deniz Kaynakları Programı, İzmir.
- Erfani, N., Nazemosadat, Z. and Moein M.**, 2015, Cytotoxic activity of ten algae from the Persian Gulf and Oman Sea on human breast cancer cell lines; MDA-MB-231, MCF-7, and T-47D, *Pharmacognosy Res.*, 7(2):133–137 pp.
- Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu, G.**, 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition *Nutrition*, 18:872–879 pp.
- FAO**, 2014, The State of World Fisheries and Aquaculture, Available online: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>
- Farvin, K.H.S. and Jacobsen, C.**, 2015, Antioxidant Activity of Seaweed Extracts: In Vitro Assays, Evaluation in 5 % Fish Oil-in-Water Emulsions and Characterization, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(4):571–587.
- Ferguson, L.R.**, 1994, Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet, *Mutat. Res.*, 307:395-410 pp.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T. and Falkowski, P.**, 1998, Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components, *Science*, 281:237–240 pp.
- Fisch, K.M., Böhm, V., Wright, A.D. and König, G.M.**, 2003, Antioxidant meroterpenoids from the Brown alga *Cystoseira crinita*, *J Nat Prod.*, 66:968–975 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fischel, J.L., Lemee, R., Formento, P., Caldani, C., Moll, J.L., Pesando, D., Meinesz, A., Grelier, P., Pietra, P. and Guerriero, A.,** 1995, Cell growth inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine algae *Caulerpa Taxifolia*, *Anticancer Research*, 15(5):2155–2160 pp.
- Fish, J.D. and Fish, S.,** 1989, A student's guide to the seashore. Unwin Hyman Ltd, London.
- Fitton, JH.,** 2006. Antiviral properties of marine algae. In: Critchley AT, Ohno M, Largo DB (eds.) *World seaweed resources*. Windows & Macintosh. ETI Information Services, Workingham, U.K., p7.
- Folkman J.,** 1995, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nature Med*, 1:27-31.
- Folkman, J.,** 2003, Angiogenesis and apoptosis, *Semin Cancer Biol.*, 13(2):159-167 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations,** "Seaweeds Used As Human Food", <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e0b.htm#bm11> (Erişim tarihi:15 Aralık 2016).
- Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M. and Caroppo, C.,** 2013, The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source, *Mar Drugs*, 11:3754–3776 pp.
- Fritsch, F.E.,** 1945, The structure and reproduction of the algae, Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Fuchs, Y., Steller, H.,** 2011, Programmed cell death in animal development and disease, *Cell*, 147:742–758 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fujihara, M, Iizima, N., Yamamoto, I. and Nagumo, T.,** 1984, Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*, *Carbohydr Res*, 125:97–106 pp.
- Fuller, R.W., Cardellina, J.H., Kato, Y., Brinen, L.S., Clardy, J., Snader K.M. and Boyd, M.R.,** 1992, A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii*: produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor-cell lines: *Journal of Medicinal Chemistry*, 35:3007-3011 pp.
- Galland-Irmouli, A.V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J. P., Villaume, C. and Guéant, J.L.,** 1999, Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse), *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 353-359 pp.
- Gamal-Eldeen, A.M, Mona, A.M. Abo-Zeid and Ahmed E.F.,** 2013, Antigenotoxic effect of the *Sargassum dentifolium* extracts: Prevention of chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA fragmentation, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(1–2):27–34 pp.
- Ganesan, P., Matsubara, K., Ohkubo, T., Tanakac, Y., Nodaa, K. and Sugawaraa, T.,** 2010, Anti-angiogenic effect of siphonaxanthin from green alga, *Codium fragile*, *Phytomedicine*, 17(14):1140–1144.
- Garson, J.,** 1989, Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.*, 6:143–170.
- Gawron, A. and Kruk, I.,** 1992, Cytotoxic effect of xanthotoxol (8-hydroxypsoralen) on TCTC cells in vitro, *Pol J Pharmacol Pharm.*, 44:51–57.
- Geetha, T., Malhotra, V., Chopra, K. and Kaur, I.P.,** 2005, Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of kersetin, *Indian J. Exp. Biol.*, 43:61–67 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gershenson, J. and Croteau, R.,** 1991, Terpenoids. In Herbivores their interaction with secondary plant metabolites, Vol I: The chemical participants, 2nd ed., G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds, Academic press, San Diego, 165-219 p.
- Gerwick, W.H.,** 1981, The natural products chemistry of the Dictyotaceae. Dissertation. University of California, San Diego, California, USA.
- Ghazali, M.A., Al-Naqeb, G., Selvarajan, K.K., Hasan, M.H. and Adam, A.,** 2014, Apoptosis induction by Polygonum minus is related to antioxidant capacity, alterations in expression of apoptotic-related genes, and S-Phase cell cycle arrest in HepG2 cell line, Biomed Res Int., Article ID 539607, 13 pages.
- Gilbert, D.L. and Colton, C.A.,** 2002. Reactive oxygen species in biological systems: An inter disciplinary approach, Kluwer Academic Publishers.
- Godarda, M., Décordéa, K., Venturaa, E., Soterab, G., Baccouc, J.C., Cristola, J.P. and Rouanet, J.M.,** 2009, Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally-induced atherosclerosis, Food Chemistry, 115(1):176–180 pp.
- Gopalakrishnan, A., Ram, M., Kumawat, S., Tandan, S. and Kumar, D.,** 2016, Kersetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF- β 1, Indian J Exp Biol., 54(3):187-95 pp.
- Gökpınar, Ş., Işık, O., Göksan, T., Durmaz, Y., Uslu, L., Ak, B., Önalın, K.S. ve Akdoğan, P.,** 2013, Algal biyoteknoloji çalışmaları, Yunus Araştırma Bülteni, 4:21-26.
- Green, D.R. and Reed, J.C.,** 1998, Mitochondria and apoptosis, Science, 281:1309–1312 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F. and Andrade, P.B.,** 2015, Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds, *Mar. Drugs*, 13:3182–3230 pp.
- Guegan, C., Vila, M., Teismann, P., Chen, C., Onteniente, B., Li, M., Friedlander, R.M. and Przedborski, S.,** 2002, Instrumental activation of bid by caspase-1 in a transgenic mouse model of ALS, *Mol Cell Neurosci*, 20:553–562 pp.
- Guiry, M.D. and Nic Dhonncha, E.,** 2001, Algae Base. Onl ine document at: www.algaebase.org.
- Guiry, M.D.,** 2012, How many species of algae are there?, *Journal of Phycology*, 48: 1057–1063 pp.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. and Longaker, M.T.,** 2008, Wound repair and regeneration, *Nature*, 453:314–321 pp.
- Guyton, K.Z. and Kensler, T.W.,** 1993, Oxidative mechanisms in carcinogenesis, *Br. Med. Bull.*, 49:523–544 pp.
- Güner, H.,** 1991, Tohumuz Bitkiler Sistematiği, I. Cilt, Ege Üniversitesi Fen Fak. Kitaplar Serisi No:108-251 s., İzmir.
- Güner, H. and Aysel, V.,** 2009, Tohumuz Bitkiler Sistematiği, I. Cilt, Ege Üniversitesi Fen Fak. Kitaplar Serisi No:108, 245 s., İzmir.
- Güner, A., Köksal, Ç., Erel, Ş.B., Kayalar, H., Nalbantsoy, A., Sukatar, A. and Karabay Yavaşoğlu, N.Ü.,** 2015, Antimicrobial and antioxidant activities with acute toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff & Nizamuddin from the coast of Urla (Izmir, Turkey), *Cytotechnology*, 67:135–143 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gupta, S. and Abu-Ghannam, N.,** 2011, Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 12:600–609.
- Haliki, A., Denizci, A.A. and Cetingül, V.,** 2005, An investigation on antifungal activities of some marine algae (Phaeophyta, Rhodophyta), *EU J. Fish. Aquat. Sci.*, 22:13-15 pp.
- Halliwell, B.,** 1994, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?, *Lancet*, 344:721-724 pp.
- Hamza, A.H., Al-Bishri, W., Omar, H.H. and Danial, N.E.,** 2014, Potential Antimicrobial, Antioxidant and Anityrosenase Activities achieved by Selected Species of Marine Macroalgae, *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, 8:257-265 pp.
- Harada, H. and Kamei, Y.,** 1997, Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines, *Cytotechnology* 25(1-3): 213–219 pp.
- Harada, H., Noro, T. and Kamei, Y.,** 1997, Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts, *Biol. Pharm. Bull.*, 20:541- 546 pp.
- Haroun-Bouhedja, F., Lindenmeyer, F., Lu, H. Soria, C., Jozefonvicz, J. and Boisson-Vidal, C.,** 2002, In vitro Effects of Fucans on MDA-MB231 Tumor Cell Adhesion and Invasion, *Anticancer Res.*, 22:2285–2292 pp.
- Harper, M.K., Bugni, T.S., Copp, B.R., James, R.D., Lindsay, B.S., Richardson, A.D., Schnabel, P.C., Tasdemir, D., VanWagoner, R.M., Verbitzki, S.M. and Ireland, C.M.,** 2001, Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: McClintock JB, Baker BJ (eds) *Marine chemical ecology*. CRC, Boca Raton, FL.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hasan, N.M. and Sorkhy, M.K.**, 2014, Herbs that promote cell proliferation, *J Herb Med.* 1:18–21 pp.
- Hayashi, L., Yokoya, N.S., Ostini, S., Pereira, R.T.L., Braga, E.S. and Oliveira, E.C.**, 2008, Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in recirculating water, *Aquaculture*, 277:185–191 pp.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. and Bechthold, A.** 2007, Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork, *Nat Prod Rep.*, 24(1):162–190 pp.
- Holdt, S.L. and Kraan, S.**, 2011, Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation, *Journal of Applied Phycology*, 23:543–597 pp.
- Holstein, S.A. and Hohl, R.J.**, 2004, Isoprenoids: Remarkable Diversity of Form and Function, *Lipids*, 39:293–309 pp.
- Hornsey, I.S. and Hide, D.**, 1974, The production of antimicrobial compounds by British marine algae. I. Antibiotic-producing marine algae, *Br. phycol. J.*, 9:353-361 pp.
- Hyun, J.K., S.Y. Bae, K.H. Kim, C.H. Han, S.H. Cho, S.W. Nam, Y.H. Choi and B.W. Kim**, 2007. Induction of apoptosis in HeLa cells by ethanolic extract of *Corallina pilulifera*. *Food Chemistry*, 104(1): 196-201 pp.
- Jaganathan, S.K., Supriyanto, E. and Mandal, M.**, 2013, Events associated with apoptotic effect of p-kumarikasid in HCT-15 colon cancer cells, *World J Gastroenterol*, 19 (43):7726-7734 pp.
- Jain, A.K., K. Shimoi, Y. Nakamura and I. Tomita**, 1987, Preliminary study on the desmutagenic and antimutagenic effect of some natural products, *Curr. Sci.*, 56:1266-1269 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ji, B.C., Hsu, W.H., Yang, J.S., Hsia, T.C., Lu, C.C., Chiang, J.H., Yang, J.L., Lin, C.H., Lin, J.J., Suen, L.J., Gibson Wood, W. and Chung, J.G.,** 2009, Gallik asid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo, *J Agric Food Chem.*,57(16):7596-604 pp.
- Jiang, R.W., Hay, M.E. Fairchild, C.R., Prudhomme, J., Roch, K.L., Aalbersberg, W. and Kubanek, J.,** 2008, Antineoplastic unsaturated fatty acids from Fijian macroalgae, *Phytochemistry*, 69:2495–2500 pp.
- Jung, Y.H., Heo, J., Lee, Y.J., Kwon, T.K. and Kim, Y.H.,** 2010, Kersetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5, *Life Sci.*, 86(9-10):351-7 pp.
- Kada, T. and Shimoi, K.,** 1987, Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action, *Bioessays*, 7:113–116 pp.
- Kadan, G.,** 1994, Kırmızı Deniz Yosunlarından (RHODOPHYCEA) Agar-Agar Eldesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. İzmir.
- Kang, K., Park, Y., Hwang, H.J., Kim, S.H., Lee, J.G. and Shin, H.C.,** 2003, Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors, *Arch. Pharm.*, 26: 286-293 pp.
- Karthikeyan, K., Shweta, K., Jayanthi, G., Prabhu, K. and Thirumaran, G.,** 2015. Antimicrobial and antioxidant potential of selected seaweeds from Kodinar, Southern Coast of Saurashtra, Gujarat, India, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 5:35–40 pp.
- Kaufmann, S.H. and Hengartner, M.O.,** 2001, Programmed cell death: Alive and well in the new millennium, *Trends Cell Biol.*, 11:526–534 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khanavi, M., Nabavi, M., Sadati, N., Shams Ardekani M., Sohrabipour, J., Nabavi, S.M., Ghaeli, P. and Ostad, S.N.,** 2010, Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines, *Biol Res.*, 43:31-7 pp.
- Kim, Y.W. and Byzova, T.V.,** 2014, Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease, *Blood*, 123:625–631 pp.
- Klaunig, J.E., Xu, Y., Isenberg, J.S., Bachowski, S., Kolaja, K.L., Jiang, J., Stevenson, D.E. and Walborg Jr. E.F.,** 1998, The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, 106 (1):289–295 pp.
- Knaggs, A.R.,** 2003, The biosynthesis of shikimate metabolites, *Nat Prod Rep.*, 20:119–136 pp.
- Kong, C.S., Kim, J.A. Yoon, N.Y. and Kim, S.K.,** 2009, Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Ecklonia cava* in MCF-7 human breast cancer cells, *Food Chem Toxicol.*, 47:1653–1658 pp.
- Kontiza, I., Abatis, D., Malakate, K., Vagias, C., Roussis, V.,** 2006, 3-Keto steroids from the marine organisms *Dendrophyllia cornigera* and *Cymodocea nodosa*, *Steroids*, 71(2):177-81 pp.
- Kordjazi, M., Shabbanpour, B., Zabihi, E., Ali, M., Feizi, F., Ahmadi, H., Amin, M. and Abbas, S.,** 2013, Sulfated polysaccharides purified from two species of *Padina* improve collagen and epidermis formation in the rat, *Int J Mol Cell Med.*, 2:156–163 pp.
- König, G. M., Wright, A. D. and Franzblau, S. G.,** 2000, *Planta Med.*, 66:337 pp.
- Kumar, K.S., Ganesan, K. and Subba Rao, P.V.,** 2008, Antioxidant potential of solvan extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty: an edible seaweed, *Food Chem.*, 107:289- 295 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuwana, T., Newmeyer, D.D.**, 2003, Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis, *Curr Opin Cell Biol.*, 15:691–699 pp.
- Kwon, M.J. and Nam, T.J.**, 2007, A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3 K/Akt pathway, *Cell Biol Int.*, 31:768–775 pp.
- Lai, H.Y., Lim, Y.Y. and Kim, K.H.**, 2011, Potential dermal wound healing agent in *Blechnum orientale* Linn, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 62 p.
- Lake, A.C., Vassy, R., Di Benedetto, M., Lavigne, D., Le Visage, C., Perret, G.Y. and Letourneur, D.**, 2006, Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1, *J Biol Chem.*, 281(49):37844-52 pp.
- Lee, R. E.**, 2008, *Phycology*. Cambridge University Press.
- Lee, N.Y., Ermakova, S.P., Zvyagintseva, T.N., Kang, K.W., Dong, Z. and Choi, H.S.**, 2008 Inhibitory effects of fucoidan on activation of epidermal growth factor receptor and cell transformation in JB6 Cl41 cells, *Food Chem. Toxicol.*, 46:1793–1800 pp.
- Lee, W.R., Park, J.H., Kim, K.H., Kim, S.J., Park, D.H., Chae, M.H., Suh, S.H., Jeong, S.W. and Park, K.K.**, 2009, The biological effects of topical alginat treatment in an animal model of skin wound healing, *Wound Repair Regen.*, 17:505–510 pp.
- Leite-Silva, C., Gusmão, C.L.S. and Takahashi, C.S.**, 2007, Genotoxic and antigenotoxic effects of *Fucus vesiculosus* extract on cultured human lymphocytes using the chromosome aberration and Comet assays, *Genet. Mol. Biol.*, 30:1.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lekameera, R., Vijayabaskar, P. and Somasundaram, S.T.**, 2008, Evaluating antioxidant property of brown alga *Colpomenia sinuosa* (DERB. ET SOL), *African J Food Sci.*, 2: 126-130 pp.
- Le Tutour, B., Benslimane, F., Gouleau, M.P., Gouygou, J.P., Saadan, B. and Quemeneur, F.**, 1998, Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*, *J Appl Phycol.*, 10:121-129 pp.
- Lewis, L.A., McCourt, R.M.**, 2004, Green algae and the origin of land plants, *Am. J. Bot.*, 91: 1535-1556 pp.
- Li, B., Lu, F., Wei, X. and Zhao, R.**, 2008, Fucoidan: Structure and bioactivity, *Molecules*, 13:1671–1695 pp.
- Li, Y., Qian, Z.J., Ryu, B.M., Lee, S.H., Kim, M.M. and Kim, S.K.**, 2009, Chemical components and its antioxidant properties in vitro: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:1963–1973 pp.
- Li, L.Y., Luo, X. and Wang, X.**, 2001, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature*, 412:95-9 pp.
- Liang, C.C., Park, A.Y. and Guan, J.L.**, 2007, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nature Protocols*, 2:329–333.
- Liao, W.R., Lin, J.Y., Shieh, W.Y., Jeng, W.L. and Huang, R.**, 2003, Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30:433-439 pp.
- Linjawi, S.A.**, 2011, Protective Effect of *Spirulina* Against Mitomycin C-Induced Genotoxic Damage in male Rats, *Journal of American Science*, 7(1).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, F., Wang, J., Chang, A.K., Liu, B., Yang, L., Li, Q., Wang, P. and Zou, X.,** 2012, Fucoidan extract derived from *Undaria pinnatifida* inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells, *Phytomedicine*, 19(8-9):797–803 pp.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.,** 2001, Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C(T)$ Method, *Methods*, 25(4):402–408 pp.
- Lo, C., Lai, T.Y., Yang, J.H., Yang, J.S., Ma, Y.S., Weng, S.W., Chen, Y.Y., Lin, J.G. and Chung, J.G.,** 2010, Gallik asid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways, *Int J Oncol.*, 37(2):377-85 pp.
- Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J.,** 2001, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology, *Cell*, 104:487-501.
- Lu, K., Bhat, M. and Basu, S.,** 2016, Plants and their active compounds: natural molecules to target angiogenesis, *Angiogenesis*, 19(3):287-95 pp.
- Luo, H.Y., Wang, B., Yu, C.G., Qu, Y.L. and Su, C.L.,** 2010, Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China, *J Med Plant Res.*, 4:2557–65 pp.
- Madkour, F.F., Hassan, M.M., Khalil, W.F. and Kotb, W.A.,** 2013, Wound healing activity of brown algae plus polyherbal extract in normal and alloxan-induced diabetic rats, *Journal of Advanced Veterinary Research*, 3:102-108 pp.
- Manikandan, S., Ganesapandian, S., Singh, M. and Kumaraguru, A.K.,** 2011, Emerging of multiple drug resistance human pathogens from urinary tract infections, *Curr. Res. Bacteriol.*, 4:9–15 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Manivannan, K., Karthikai Devi, G., Anantharaman, P. and Balasubramanian, T.**, 2011, Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar, Asian Pac J Trop Biomed., 1(2):114-20 pp.
- Mario, A., Raquel, M., Sonia, R., Elena, L., Laura, B. and Luis, G.**, 2006, Influence of kersetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2), Eur J Nutr., 45:19–28 pp.
- Martin, G.J.**, 1995,. Ethnobotany: A Methods Manual, Champan and Hall, London.
- Martin-Algarra, S., Espinosa, E., Rubio, J., Lopez Lopez, J.J., Manzano, J.L., Carrion, L.A., Plazaola, A., Tanovic, A. and Paz-Ares, L.**, 2009, Phase II study of weekly Kahalalide F in patients with advanced malignant melanoma, Eur. J. Cancer, 45:732–735.
- Marwah, R.G., Fatope, M.O., Mahrooqi, R.A., Varma, G.B., Abai, H.A. and AlBurtamani, S.A.S.**, 2007, Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman, Food Chem., 101:465-470 pp.
- Maschek, J.A. and Baker, B.J.**, 2008, The chemistry of algal secondary metabolites C.D. Amsler (Ed.), Algal chemical ecology, Springer, Berlin Heidelberg, 1–24 p.
- Matsubara, K., Mori, M., Matsumoto, H., Hori, K. and Miyazawa, K.**, 2003, Antiangiogenic properties of a sulfated galactan isolated from a marine alga, *Codium cylindricum*, J. Appl. Phycol., 15:87–90 pp.
- Matsukawa, R., Dubinsky, E., Kishimoto, E., Masaki, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I.**, 1997, A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds, J Appl. Phycol., 9, 29-35 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Matou, S., Helley, D., Chabut, D., Bros, A. and Fischer, A.M.,** 2002, Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro, *Thromb Res.*, 15(4-5):213-21 pp.
- Mazid, M., Khan, T. A. and Mohammad, F.,** 2011, Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, *Biology and Medicine*, 3:232-249 pp.
- McBride, T.J., Preston, B.D. and Loeb, L.A.,** 1991, Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals, *Biochemistry*, 30:207–213 pp.
- Mchug, J.D.,** 2003, A Guide to the Seaweed Industry, *FAO Fisheries Technical Papers Rome-Italy*, 9-25104-958-0(441), 105 p.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G.,** 2005, Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chem.*, 91:571-577 pp.
- Mehta, S.K. and Gowder, S.J.T.,** 2015, Members of antioxidant machinery and their functions S.J.T. Gowder (Ed.), *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, InTech, Rijeka, Croatia, 59–85 p.
- Michalak, I. and Chojnacka, K.,** 2015, Algae as production systems of bioactive compounds, *Eng. Life Sci.*, 15:160–176 pp.
- Migliore, L. and Coppedè, F.,** 2002, Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases, *Mutat Res.*, 512:135–153 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K. Gollery, M., Shulachev, V. and Van Breusegem, F.,** 2011, ROS signaling: the new wave?, *Trends Plant Sci.*, 16:300-309 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mohamed, S., Hashim, S.N. and Rahman, H.A.**, 2012, Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy, Trends in Food Science & Technology, 23(2):83–96 pp.
- Mori, J., Matsunaga, T., Takahashi, S., Hasegawa, C. and Saito, H.**, 2003, Inhibitory activity on lipid peroxidation of extracts from marine brown alga, Phytotherapy Res., 17:549-551 pp.
- Morrissey, J., Kraan, S. and Guiry, M.D.**, 2001, A guide to commercially important seaweeds on the Irish coast. Bord Iascaigh Mhara, Dublin, 66 pp.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods, 65:55–63 pp.
- Muhammed, A.R. and Shameel, M.**, 2004, Studies on the bioactivity and elementology of marine algae from the coast of Karachi, Pakistan, Phytother Res., 18(11):865-72 pp.
- Munro, M.H.G. and Blunt, J.W.**, 2005, MarinLit- a marine chemical literature database, version 12.5. Marine Chemistry Group, University of Canterbury, Christchurch, NZ.
- Murata, M. and Nakazoe, J.**, 2001, Production and use of marine algae in Japan. Jpn Agr Res., 35:281–290 pp.
- Murray Patrick, R.**, 2005, Manual of Clinical Microbiology. 6th edition. Washington, DC. ASM Press. 1482 p.
- Murugan, K. and Iyer, V.V.**, 2012, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Marine Algae, Gracilaria edulis and Enteromorpha lingulata, from Chennai Coast, International Journal of Cancer Research, 8(1):15-26 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muslim, N., Nassar, Z., Aisha, A., Shafaei, A., Idris, N., Majid, A., and Ismail, Z.,** 2012, Antiangiogenesis and antioxidant activity of ethanol extracts of *Pithecellobium jiringa*, *BMC Complement. Altern. Med.*, 12:210 p.
- Nabors, L.O.B.,** 2004, Alternative sweeteners, *Agro Food Industry HiTech.*, 15:39–41 pp.
- Nagai, T. and Yukimoto, T.,** 2003, Preparation and functional properties of beverages made from sea algae, *Food Chemistry*, 81:327-332 pp.
- Nagarani, N., JanakiDevi, V., YokeshBabu, M. and Kumaraguru, A.K.,** 2012, Protective effect of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) extract against DNA damage induced by mercury chloride in marine fish, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(7), 1401–1410 pp.
- Nagayama Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I. and Nakamura, T.,** 2002, Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*, *J Antimicrob Chemother.*, 50(6):889-93 pp.
- Nahas, R., Abatis, D., Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Vagias, C. and Roussis, V.,** 2007, Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae, *Food Chem.*, 102:577-581 pp.
- Namvar, F., Mohamad, R., Baharara, J., Zafar-Balanejad, S., Fargahi, F. and Rahman, H.S.,** 2013, Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*), *Biomed Res Int.*, 1:9 pp.
- Niki, E.,** 2014, Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence, *Free Radic. Biol. Med.*, 66:3-12 pp.
- Nimse, S.B., Pal, D.,** 2015, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Advances*, 5(35):27986–28006 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. and Kojiro, M., 2006,** Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.*, 2:213–219 pp.
- North Sea Alien Species (NORSAS),** “*Gracilaria gracilis*”, <http://www.norsas.eu/species/gracilaria-gracilis> (Erişim tarihi:03 Kasım 2016).
- Ohigashi, H., Sakai, Y., Yamaguchi, K., Umezaki, I. and Koshimizu, K., 1992,** Possible anti-tumor promoting properties of marine algae and in vivo activity of wakame seaweed extract, *Biosci Biotech Biochem.*, 56:994-995 pp.
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., Yano, Y. and Otani, S., 1996,** Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (Asadusa-nori), *Cancer Lett.*, 100:235–240 pp.
- Okai, Y. and Higashi-Okai, K., 1997,** Potent anti-inflammatory activity of pheophytin-a derived from edible green algae *Enteromorpha prolifera* (sujiao-nori), *Int.J. Immunopharmacol.*, 19:355–358 pp.
- O'Sullivan, A.M., O'Callaghan, Y.C., O'Grady, M.N., Hayes M., Kerry, J. P., and O'Brien, N.M., 2013,** The effect of solvents on the antioxidant activity in Caco-2 cells of Irish brown seaweed extracts prepared using accelerated solvent extraction (ASE (R)), *Journal of Functional Foods*, 5, 940-948 pp.
- Osuna-Ruiza, I., Lopez-Saizb, C.M., Burgos-Hernandez, A., Velazquez, C., Nieves-Soto, M. and Hurtado-Oliva, M.A., 2016,** Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 54(10): 2196–2210 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Onbas, R., Kazan, A., Nalbantsoy, A. and Yesil-Celiktas, O.,** 2016, Cytotoxic and Nitric Oxide Inhibition Activities of Propolis Extract along with Microencapsulation by Complex Coacervation, *Plant Foods Hum Nutr.*, 71(3):286-93 pp.
- Ovenden, S.P., Nielson, J.L., Liptrot, C.H., Willis, R.H., Tapiolas, D.M., Wright, A.D. and Motti, C.A.,** 2012, Update of Spectroscopic Data for 4-Hydroxydictyolactone and Dictyol E Isolated from a *Halimeda stuposa* Dictyota sp. Assemblage, *Molecules*, 17:2929-2938 pp.
- Pangestuti, R. and Kim, S.K.,** 2011, Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae, *J Funct Foods*, 3:255–266 pp.
- Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., and Brancolini, C.,** 2001, Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3, *J. Biol. Chem.*, 276:21907-21915 pp.
- Pawlik, J.R.,** 1993, Marine invertebrate chemical defenses, *Chem. Rev.*, 93:1911–1922 pp.
- Paz, E.A., Lacy, R.N. and Bakhtian, M.,** 1995, The B-Lactum antibiotics penicillin and cephalosporin in perspective. Hodder strong, London, 324 p.
- Pérez, M.J., Falqué, E. and Domínguez, H.,** 2016, Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed, *Mar Drugs.*, 14(3):52 pp.
- Pickett-Heaps, J.,** 1975, Green Algae. Structure, Reproduction and Evolution in Selected Genera, 606:44 p.
- Plaza, M., Cifuentes, A., and Ibanez, E.,** 2008, In the search of new functional food ingredients from algae, *Trends Food Sci. Technol.*, 19:31–39 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Premkumar, K., Abrahamb, S.K., Santhiya, S.T. and Ramesha., A.,** 2004, Protective effect of *Spirulina fusiformis* on chemical-induced genotoxicity in mice, *Fitoterapia*, 75(1):24–31 pp.
- Pacheco-ruiz, I., Zertuche-González, J.A., Arroyo-Ortega, E. and Valenzuela-Espinoza, E.** 2004, Agricultural fertilizers as alternative culture media for biomass production of *Chondracanthus squarulosus* (Rhodophyta, Gigartinales) under semi-controlled conditions, *Aquaculture*, 240:201-209 pp.
- Pohnert, G. and Boland, W.,** 2002, The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms, *Natural Product Reports*, 19(1):108-122 pp.
- Potin, P., Bouarab, K., Salaun, J.P., Pohnert, G. and Kloareg, B.,** 2002, Biotic interactions of marine algae, *Curr Opin Plant Biol.*, 5:308–317 pp.
- Pratheeshkumar, P., Budhraj, A., Son, Y.O., Wang, X., Zhang, Z., Ding, S., Wang, L., Hitron, A., Lee, J.C., Xu, M., Chen, G., Luo, J. and Shi, X.,** 2012, Kersetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways, *PLoS ONE*, 7:10 p.
- Qi, H.M., Zhang, Q.B., Zhao, T.T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X.Z. and Li, Z.,** 2005, Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa*(Chlorophyta) in vitro, *Int J Biol Macromol.*, 37:195–199.
- Rafiquzzaman, S., MoinUddin, A., Jong Min, L., Eun-Young, K., Young-Ok, K., Dong-Gyun, K. And In-Soo K.,** 2015, Phytochemical Composition And Antioxidant Activity Of Edible Red Alga *Hypnea Musciformis* From Bangladesh, *Journal Of Food Processing And Preservation*, doi:10.1111/jfpp.12688

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rajamanickam, M., Kalaivanan, P. and Sivagnanam, I.,** 2013, Antibacterial and wound healing activities of kersetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside isolated from *Salvia leucantha*, *Int J Pharm Sci Rev Res.*, 22:264-8 pp.
- Ramos, S.,** 2008, Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways, *Molecular Nutrition and Food Research*, 52:507-526 pp.
- Ramos, A.A., Lima, C.F. and Pereira-Wilson, C.,** 2011, DNA Damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention: What do we know? In: Chen C (Ed.). *Selected Topics in DNA Repair*, InTech, 237-270 p.
- Ranelletti, F.O., Maggiano, N., Serra, F.G., Ricci, R., Larocca, L.M., Lanza, P., Scambia, G., Fattorossi, A., Capelli, A. and Piantelli, M.,** 2008, Kersetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors, *Int J Cancer*, 85:438–45 pp.
- Ranganathan, S., Halagowder, D. and Sivasithambaram, N.D.,** 2015, Kersetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells, *PLoS One*, 10:(10), doi: 10.1371/journal.pone.0141370.
- Rasmussen, R.S. and Morrissey, M.T.,** 2007, Marine biotechnology for production of food ingredients. In: Taylor SL (ed) *Advances in food and nutrition research*, 52:237–292 pp.
- Raven, J.A., Ball, L.A., Beardall, J., Giordano, M. and Maberly, S.C.,** 2005, Algae lacking carbon-concentrating mechanisms, *Can J Bot*, 83:879–890 pp.
- Ray, B.,** 2004, In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*, *Phytochemistry*, 65, 3151-3157 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rhimou, B., Hassane, R., Jose, M. and Nathalie, B.,** 2010, The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean coast of Morocco. *Afr. J. Biotechnol.*, 9:6365-6372 pp.
- Richards, T.A., Dacks, J.B., Jenkinson, J.M., Thornton, C.R. and Talbot, N.J.,** 2006, Evolution of filamentous plant pathogens: gene exchange across eukaryotic kingdoms. *Curr. Biol.*, 16, 1857-64 pp.
- Round, F.E.,** 1973, *The Biology of Algae*, 2 nd. Ed., Edward Arnold, London.
- Russo, M., Nigro, P., Rosiello, R., D'Arienzo, R. and Russo, G.L.,** 2007, Kersetin enhances CD95-and TRAIL-induced apoptosis in leukemia cell lines, *Leukemia*, 21(5):1130-3 pp.
- Eming, S.A., Brachvogel, B., Odoriso, T. and Koch, M.,** 2007, Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 42(3):115–170 pp.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M.,** 1997, Caspase activation: The induced-proximity model. *Cell*, 91:443–446 pp.
- Sanchez-Machado, D.I., Lopez-Cervantes, J., Lopez-Hernandez, J. and PaseiroLosada, P.,** 2004, Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds, *Food Chem.*, 85:439–444 pp.
- Sánchez-Moyano, J.E., Estacio, F.J., García-Adiego, E.M. and GarcíaGómez, J.C.,** 2000, The molluscan epifauna of the alga *Halopteris scoparia* in Southern Spain as a bioindicator of coastal environmental conditions, *J Mollus Stud.*, 66:431–448 pp.
- Sato, S. and Tomita, I.,** 2001, Short-Term Screening Method for the Prediction of Carcinogenicity of Chemical Substances: Current Status and Problems of an in vivo Rodent Micronucleus Assay, *Journal of Health Science*, 47(1):1–8 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L.,** 2005, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306 pp.
- Schmid, T.E., Xu, W. and Adler, I.D.,** 1999, Detection of aneuploidy by multicolor FISH in mouse sperm after in vivo treatment with acrylamide, diazepam or thiabendazole, *Mutagenesis*, 14(2):173-179 pp.
- Schwender, J., Zeidler, J., Groner, R., Muller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F.W. and Lichtenthaler, H.K.,** 1997, Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae, *FEBS Letter*, 414:129–134 pp.
- Segawa, M. and Shirahama, H.,** 1987, New plastoquinones from the brown alga *Sargassum sagamianum* var. *yezoense*, *Chem Lett.*, 7:1365–1366 pp.
- Selvin, J. and Lipton, A.P.,** 2004, Biopotentials of Secondary Metabolites Isolated from Marine Sponges, *Hydrobiologia*, 513:231-238.
- Sen, A., Atmaca, P., Terzioglu, G. and Arslan, S.,** 2013, Anticarcinogenic effect and carcinogenic potential of the dietary phenolic acid: o-kumarikacid, *Nat Prod Commun*, 8(9):1269-74 pp.
- Shahidi, F.,** 2009, Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods, *Trends in Food Science and Technology*, 20(9):376-387 pp.
- Shalaby, E.A. and Shanab, S.M.M.,** 2013, Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*, *Indian Journal of Geo-marine Sciences*, 42(5):556–564 pp.
- Sharma, O.P.,** 1986, *Textbook of Algae*, Tata McGraw-Hill, 298 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sheu, J. H., Wang, G. H., Sung, P. J., and Duh, C. Y.,** 1999, New cytotoxic oxygenated fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*, *Journal of Natural Products*, 62, 224-227 pp.
- Sims, J.J., Lin, G.H.Y. and Wing, R.M.,** 1974, Marine natural products. X. Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*, *Tetrahedron Lett.*, 39:3487–3490 pp.
- SivaKumar, K. and Rajagopal, S.V.,** 2011, Radical scavenging activity of green algal species, *Journal of Pharmacy Research*, 4(3),723–725 pp.
- Slee, A.E., Adrain, C. and Martin, S.J.,** 2001, Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 276:7320-7326.
- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E. and Waszkielewicz. A.M.,** 2014, Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action, *J. Appl. Genet.*, 55(2):273–285 pp.
- Smit, A.J.,** 2004, Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review, *J Appl Phycol.*, 16:245–262 pp.
- Soo-Jin, H., Sun-Heui, C., Ki-Wan, L., Somi K.C., You-Jin, J.,** 2005, Antioxidant Activities of Chlorophyta and Phaeophyta from Jeju Island, *Algae*, 20(3):251-260 pp.
- Staton, C.A., Reed, M.W. and Brown, N.J.A,** 2009, Critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays, *Int. J. Exp. Pathol.*, 90:195–221 pp.
- Stratmann, K., Boland, W. and Muller, D.G.,** 1992, Pheromones of marine brown algae: a new branch of eicosanoid metabolism, *Angew Chem Int Ed.*, 3:1246–1248 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sugawara, T., Matsubara, K., Akagi, R., Mori, M. and Hirata, T.,** 2006, Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26):9805–9810 pp.
- Sukatar, A.,** 2002, *Alg Kültür Yöntemleri*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Sultana, B., Anwar, F. and Ashraf, M.,** 2009, Effect of extraction solvan/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts, *Molecules*, 14:2167-80 pp.
- Sun, J., Shi, D.Y., Li, S., Wang, S.J., Han, L.J., Fan, X., Yang, Y.C. and Shi, J.G.,** 2007, Chemical constituents of the red alga *Laurencia tristicha*, *J Asian Nat Prod Res.*, 9:725–734 pp.
- Sun, M., Yamauchi, R., Ashida, H. and Kanazawa, K.,** 2002, Subsequent products after antioxidant actions of beta-carotene and alpha-tokoferol have no *Salmonella* mutagenicity, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 66(2):363-72.
- Syad, A.N. and Kasi, P.D.,** 2014, Assessment of Mutagenic Effect of *G. acerosa* and *S. wightii* in *S. typhimurium* (TA 98, TA 100, and TA 1538 suşs) and Evaluation of Their Cytotoxic and Genotoxic Effect in Human Mononuclear Cells: A Non-Clinical Study, 313942 p.
- Tan, W.F., Lin, L.P., Li, M.H., Zhang, Y.X., Tong, Y.G., Xiao, D. and Ding, J.,** 2003, Kersetin, a Dietary Derived Flavonoit, Possesses Antiangiogenic Potential. *European Journal of Pharmacology*, 459:255-262 pp.
- Tannock, I.F. and Hayashi, S.,** 1972, The proliferation of capillary endothelial cells, *Cancer Res.*, 32:77–82 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Targett, N.M. and Arnold, T.M.**, 1998, Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans, *J Phycol.*, 34:195–205 pp.
- Taskin, E., Ozturk, M. and Kurt, O.**, 2001. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey), *Afr. J. Biotechnol.*, 6:2746-2751 pp.
- Teruya, T., Konishi, T., Uechi, S., Tamaki, H. and Tako, M.**, 2007, Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells, *Int J Biol Macromol.*, 1;41(3):221-6 pp.
- Thakur, R., Jain, N., Pathak, R. and Sandhu, S.S.**, 2011, Practices in wound healing studies of plants, *Evid Based Complement Alternat Med.*, doi:10.1155/2011/438056.
- Thamilarashi, A.N., Mangalagowri, A. and Winkins, S.**, 2014, Anti-Angiogenic Activity Of Natural Flavonoid Myricetin On Chick Chorioallantoic Membrane (Cam) In-Vivo, *Int J Pharm.*, 4(3):160-165 pp.
- Tingxin, W., Shuzheng, Q., Wen, Z., Dongsheng, J., Xiaotong M. and Qiangrong, B.**, 2009, Inhibitory effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on micronucleus rate induced by cyclophosphamide in mice, *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 11(2):106-107 pp.
- Thomas, D.N.**, 2002, *Seaweeds*, London: Natural History Museum, London.
- Thumvijit, T., Inboot, W., Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D. and Wongpoomchai R.**, 2013, The antimutagenic and antioxidant properties of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing, *J. Med. Plants Res.*, 7(34):2494–2500 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L.,** 2001, Microbiology: An Introduction. Benjamin Cummings. San Francisco, 88 p.
- Tseng, C.K. and Chang, C.F.,** 1984, Chinese seaweeds in herbal medicine, *Hydrobiologia* 116–117:152–154.
- Turkoğlu, A., Kivrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K. and Turkoğlu, H.,** 2006, Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers., *Afr J Biotechnol*, 5:1146–1150 pp.
- Tuney, I., Hilal Cadirci, B., Unal, D. and Sukatar, A.,** 2006, Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey), *Turk. J. Biol.*, 30:171–175 pp.
- Turhan, K., Ozturkcan, S.A., Turgut, Z., Karadayi, M. and Gulluce ,M.,** 2012, Protective properties of five newly synthesized cyclic compounds against sodium azide and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine genotoxicity, *Toxicol Ind Health*, 28:605–613 pp.
- Uma, R., Sivasubramanian, V. and Niranjali Devaraj, S.,** 2011, Preliminary phytochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus Olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*, *J. Algal Biomass Utiln.*, 2(3):82– 93 pp.
- Unnikrishnan, P.S., Suthindhiran, K. and Jayasri M.A.,** 2015, Alpha-amylase inhibition and antioxidant activity of marine green algae and its possible role in diabetes management, *Pharmacognosy Magazine*, 11(44):511-15 pp.
- Usov, A.I.,** 2013, Chemical structures of algal polysaccharides. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*; Domínguez, H., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 23–86 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vadlapudi, V.**, 2012, Antioxidant activities of marine algae: A review, in: Capasso, A. (Ed.), *Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy*, Research Signpost, Kerala, India, 189–203 pp.
- Vairappan, C.S.**, 2003, Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales), *Biomol Eng.*, 20(4-6):255-9 pp.
- Van Den Hoek, C., Mann, D.G. and Jahns H.M.**, 1995, *Algae: An Intraduction to Phycology*.
- Vassilev, S.V., Baxter, D., Andersen, L.K. and Vassileva, C.G.**, 2010, An Overview of the Chemical Composition of Biomass, *Fuel*, 89:913–933.
- Viola, R., Nyvall, P. and Pedersén, M.**, 2001, The unique features of starch metabolism in red algae, *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 268:1417-1422 pp.
- Vinayak, R., Puttananjaiah, S., Chatterji, A. and Salimath, B.**, 2014, Anti-proliferative and angio-suppressive effect of *Stoechospermum marginatum* (C. Agardh) Kutzing extract using various experimental models, *Nutrition Research and Practice*, 8(4):377-385 pp.
- Vining, L.C. and Taber, W.A.**, 1979, Ergot alkaloids. In: Rose AH (ed) *Economic microbiology*, vol 3. Secondary products of metabolism. Academic, London, 389–420 p.
- Vishchuk, O.S., Tarbeeva, D.V., Ermakova, S.P. and Zvyagintseva, T.N.**, 2011, Structural Characteristics and Biological Activity of Fucoidans from the Brown Algae *Alaria* sp. and *Saccharina japonica* of Different Reproductive Status, **Article** in *Chemistry & Biodiversity*, 9(4):817-28 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Viswanathan, S., Ebciba C., Santhiya, R. and Nallamuthu, T.,** 2014, Phytochemical Screening and In Vitro Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Activity of *Amphiroa fragilissima* (Linneaus) J V Lamoroux, International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 3(5):12933-47 pp.
- Vlieghe, P., Clerc, T., Pannecouque, C., Witvrouw, M., De Clercq, E., Salles, J.P. and Kraus, J.L.,** 2002, Synthesis of new covalently bound kappacarrageenan-AZT conjugates with improved anti-HIV activities, J Med Chem., 45:1275–1283 pp.
- Vowden, P., Vowden, K. and Carville, K.,** 2011, Antimicrobial dressings, Wounds international, 2:1.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Manikumar, G., Taylor, H., Hughes, T.J., Gaetano, K., Gerwick, H.W., McPhail, A.T. and McPhail, D.R.,** 1989, Plant antimutagenic agents, 7. Structure and antimutagenic properties of cymobarbatol and 4-isocymobarbatol, new cymopols from green alga (*Cymopolia barbata*), J. Nat. Prod., 52: 1092-1099 pp.
- Wang, X.,** 2001, The expanding role of mitochondria in apoptosis, Genes Dev., 15, 2922–2933 pp.
- Watson, S.B. and Cruz-Rivera, E.,** 2003, Algal chemical ecology: an introduction to the special issue, Phycologia, 42, 319-323.
- Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R. and Rahman, S.K.,** 1989, Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? J Nat Prod 52:1189–1208.
- Williams, D.E., Sturgeon, C.M., Roberge, M. and Andersen, R.J.,** 2007, Nigricanosides A and B, antimutagenic glycolipids isolated from the green alga *Avrainvillea nigricans* collected in Dominica. J Am Chem Soc., 129:5822–5823 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Woelkerling, W.J.**, 1990, An introduction. Pages 1-6 in *Biology of the red algae* (K.M. Cole and R.G. Sheath, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Wright, J.T., de Nys, R., Poore, A.G.B. and Steinberg, P.D.**, 2004 Chemical defence in a marine alga: heritability and the potential for selection by herbivores, *Ecology*, 85:2946–2959 pp.
- Yan, X., Nagata, T., and Fan, X.**, 1998, Antioxidative activities in some common seaweeds, *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 253–262 pp.
- Yan, X.J., Zheng, L., Chen, H.M., Lin, W. and Zhang, W.W.**, 2004, Enriched accumulation and biotransformation of selenium in the edible seaweed *Laminaria japonica*, *J Agric Food Chem*, 52:6460–6464 pp.
- Yang, H., Zeng, M., Dong, S., Liu, S. and Li, R.**, 2010, Anti-proliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica*, *Aresch. China J. Ocean. Limnol.*, 28:122 pp.
- Yang, J.I., Yeh, C.C., Lee, J.C., Yi, S.C., Huang, H.W., Tseng, C.N. and Chang, H.W.**, 2012, Aqueous Extracts of the Edible *Gracilaria tenuistipitata* are Protective Against H₂O₂-Induced DNA Damage, Growth Inhibition, and Cell Cycle Arrest, *Molecules*, 17:7241-7254 pp.
- Yu, Q., Yan, J., Wang, S., Ji, L., Ding, K., Vella, C., Wang, Z. and Hu, Z.**, 2012, Antiangiogenic effects of GFP08, an agaran-type polysaccharide isolated from *Grateloupia filicina*, *Glycobiology*, 22(10):1343–1352 pp.
- Yuan, Y.V. and Walsh, N.**, 2006, Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds, *Food Chem Toxicol.*, 44:1144-1150 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yubin, J., and Guangmei, Z.,** 1998, Pharmacological action and application of available antitumor composition of traditional Chinese medicine, China: Heilongjiang.
- Yusnawan, E.,** 2013, The Effectiveness Of Polar And Non Polar Fractions Of *Ageratum Conyzoides* L. To Control Peanut Rust Disease And Phytochemical Screenings Of Secondary Metabolites, *J. Hpt Tropika*, 13(2):159–166 pp.
- Zhao, M. Yang, B. Wang, J. Liu, Y. Yu, L. and Jiang, Y.,** 2007, Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp, *Int. Immunopharmacol*, 7:162– 166 pp.
- Zinedine, A., Elakhdari, S., Faid M. and Benlemlih, M.,** 2004, Antifungal and antiaflatoxinogenic activity of the Brown algae *Cystoseira tamariscifolia*, *J.Mycol. Med.*, 14:201–205 pp.
- Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Lann, K.L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M. and Deslandes, E.,** 2009, Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts, *Food Chem.*, 116:693–701 pp.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ağrı'nın Doğubayazıt ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Doğubayazıt'ta tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans öğrenimini ve 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisansını başarıyla tamamlamıştır. 2010 yılında Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atanmış ve 2011 yılında 35. madde kapsamında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde doktora başlamıştır. Aynı zamanda, alanında gerçekleştirmiş olduğu proje ve uluslararası yayınlara sahiptir.

