

Özel Ortamlardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının
Antioksidan ve Antikanser Aktivitesi

Bahar Gülce Korkmaz Kahveci

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2021

Antioxidant and Anticancer Activity of Actinomycete Isolates
Obtained from Special Area

Bahar Gülce Korkmaz Kahveci

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2021

Özel Ortamlardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının
Antioksidan ve Antikanser Aktivitesi

Bahar Gülce Korkmaz Kahveci

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Ocak 2021

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa Yamaç ve Doç. Dr. Zerrin Cantürk danışmanlığında hazırlamış olduğum “Özel Ortamlardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının Antioksidan ve Antikanser Aktivitesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 15/01/2021

Bahar Gülce Korkmaz Kahveci

İmza

ÖZET

Bu çalışmada öncelikle özel ortamlardan izole edilen toplam 319 adet aktinomiset izolatının antimikrobiyal, DPPH radikal süpürücü ve MTS yöntemiyle sitotoksik aktivitelerine dayalı olarak bir tarama çalışması gerçekleştirilmiştir. Seçilen 404i ve C3-3 izolatlarına ait metabolitlerin antioksidan, UV koruyucu ve sitotoksik ve apoptotik etkileri kapsamlı olarak araştırılmıştır.

404i ve C3-3 izolatlarının liyofilize kültür sıvıları ile 0.018 ve 0,019 mg/ml gallik asit eşdeğeri total fenolik madde miktarı ve 16,59 ve 13,20 mg/ml DPPH radikal süpürücü aktivite EC50 değerleri belirlenmiştir. 404i ve C3-3 izolatlarının 120. dakikanın sonunda betakaroteni %59 ve %68 oranında koruduğu bulunmuştur. İzolatların ABTS radikal katyon renk giderim aktivitesi 0,3 mg/ml'de %100 ve metal şelatlayıcı aktivitesi sırasıyla 0,302 ve 0,291 mg/ml EDTA eşdeğeri olarak, saptanmıştır. Ayrıca, lipit peroksidasyonunun inhibisyonu çalışmalarında ferrik tiyosiyanat yöntemi ile %53,35 ve %55,88 inhibisyon ve tiyobarbiturik asit yöntemi ile %76,91 ve %78,9 inhibisyon oranlarına ulaşılmıştır.

404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitleri, *Saccharomyces cerevisiae* modelinde UV koruyucu özellik göstermemiştir.

404i ve C3-3 izolatlarının liyofilize kültür sıvılarının MTS yöntemi ile belirlenen IC50 değerleri, sırasıyla K562 hücre hattı için 312,57 ve 266,66 µg/ml, HL-60 hücre hattı için 141,80 ve 75,85 µg/ml ve THP-1 hücre hattı için 112,95 ve 90,42 µg/ml olarak bulunmuştur. İzolatlara ait metabolitlerin HL-60 ve THP-1 hücre hatlarında Real Time PZR yöntemiyle apoptotik aktivite açısından Apaf-1, ASK-1, TNF- α , NF-KB ve NF-KB1 genlerinin mRNA ifadeleri üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Özellikle THP-1 hücre hattında NF-KB1 geninde, mRNA ifade düzeyinde 404i ve bortezomibin kontrole göre kıyasla 2,5 ve 9 kat azaldığı, Apaf-1 ve ASK-1 genlerinde ise 1,1-2 kat arasında bir azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Aktinomisetler, antioksidan aktivite, sitotoksik aktivite, apoptotik etki, UV koruyucu aktivite, gen ifadesi

SUMMARY

In this study, firstly, a screening study was performed for totally 319 actinomycetes isolates obtained from special areas based on their antimicrobial, DPPH radical scavenging and cytotoxic activities. The metabolites of selected isolates, 404i and C3-3, were investigated for their antioxidant, UV protective, cytotoxic and apoptotic effects in detail.

Total amount of phenolic content of lyophilized culture fluid of 404i and C3-3 isolates were determined as 0.018 and 0.019 mg/ml of gallic acid equivalent, and the EC50 values of DPPH radical scavenging activity of the isolates were 16.59 and 13.20 mg/ml. It was found that the 404i and C3-3 isolates protected beta carotene 59% and 68% at the end of the 120th minutes. ABTS radical cation decolorization activity of the isolates was 100% at 0.3 mg/ml and metal chelating activity was determined as 0.302 and 0.291 mg/ml EDTA equivalent, respectively. In addition, in the inhibition of lipid peroxidation studies, 53.35% and 55.88% inhibition rates were achieved with the ferric thiocyanate method and 76.91% and 78.9% inhibition rates with the thiobarbituric acid method.

Active metabolites of the 404i and C3-3 isolates have not presented UV protective properties in the *Saccharomyces cerevisiae* model.

The IC50 values of lyophilized culture fluid of 404i and C3-3 isolates were determined as 312.57 and 266.66 µg/ml for the K562 cell line, 141.80 and 75.85 µg/ml for the HL-60 cell line and 112.95 and 90.42 µg/ml for the THP-1 cell line, respectively. It was observed that the metabolites of the isolates have effective on the mRNA expressions of Apaf-1, ASK-1, TNF- α , NF-KB and NF-KB1 genes in terms of apoptotic activity by Real Time PCR method in HL-60 and THP-1 cell lines. Especially in the NF-KB1 gene of THP-1 cell line, the mRNA expression level of 404i and bortezomib have decreased 2.5 and 9 times compared to the control and it caused a 1.1-2 times decrease in the Apaf-1 and ASK-1 genes.

Keywords: Actinomycetes, antioxidant activity, cytotoxic activity, apoptotic effect, UV protective activity, gene expression

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Antioksidan Aktivite	3
2.1.1. Oksidanlar ve serbest radikaller	3
2.1.2. Antioksidan bileşikler ve sınıflandırılması	4
2.1.2.1. <u>Doğal antioksidanlar</u>	6
2.1.2.2. <u>Sentetik antioksidanlar</u>	11
2.1.3. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri	12
2.1.3.1. <u>Hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler</u>	13
2.1.3.2. <u>Elektron transfer (ET) yöntemleri</u>	15
2.2. Ultraviyole Koruyucu Aktivite	19
2.3. Sitotoksik Aktivite	20
2.3.1. Hücre ölümü	20
2.3.1.1. <u>Apoptoz (Tip I hücre ölümü)</u>	20
2.3.1.2. <u>Otofaji (Tip II hücre ölümü)</u>	22
2.3.1.3. <u>Nekroz (Tip III hücre ölümü)</u>	23
2.3.2. Hücre ölümü ile ilgili gen bölgeleri	25
2.3.2.1. <u>Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1)</u>	25
2.3.2.2. <u>Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK-1)</u>	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.2.3. <u>Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α)</u>	28
2.3.2.4. <u>Nükleer faktör kappa B (NF-KB) ve Nükleer faktör kappa B1 (NF-KB1)</u>	29
2.3.2.5. <u>Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) (Referans gen)</u>	31
2.3.3. Lösemi.....	31
2.4. Biyoaktif Metabolit Kaynağı Olarak Aktinomisetler	33
2.4.1. Aktinomisetlerin antioksidan özellikleri	35
2.4.2. Aktinomisetlerin UV koruyucu özellikleri	36
2.4.3. Aktinomisetlerin sitotoksik özellikleri.....	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Mikroorganizmalar ve hücre hatları.....	39
3.1.1.1. <u>Aktinomiset izolatları</u>	39
3.1.1.2. <u>Test mikroorganizmaları</u>	48
3.1.2. Hücre hatları.....	48
3.1.3. Besiyerleri	49
3.1.4. Çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler.....	56
3.2. Yöntem	61
3.2.1. Aktinomisetlerin izolasyonu, saklanması, aktiflenmesi ve inokülant hazırlanması	61
3.2.1.1. <u>Aktinomisetlerin izolasyonu ve saklanması</u>	61
3.2.1.2. <u>Aktinomiset izolatlarının aktiflenmesi ve inokülant hazırlanması</u>	63
3.2.2. Fermentasyon besiyeri seçimi.....	64
3.2.2.1. <u>Toplam fenolik madde tayini</u>	66
3.2.2.2. <u>DPPH radikal giderici aktivite</u>	67
3.2.3. Yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatların seçimi.....	67
3.2.3.1. <u>Antioksidan aktivite</u>	67

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.3.2. <u>Antimikrobiyal aktivite</u>	68
3.2.3.3. <u>Sitotoksik aktivite</u>	72
3.2.4. Biyoaktif metabolit eldesi	73
3.2.4.1. <u>Sıvı – sıvı ekstraksiyonu</u>	73
3.2.4.2. <u>Liyofilizasyon</u>	74
3.2.5. Antioksidan aktivite çalışmaları.....	74
3.2.5.1. <u>Toplam fenolik madde tayini</u>	74
3.2.5.2. <u>DPPH radikal giderici aktivite</u>	75
3.2.5.3. <u>Redükleyici güç tayini</u>	76
3.2.5.4. <u>Beta karoten – linoleik asit antioksidan aktivite tayini</u>	77
3.2.5.5. <u>Metal şelatlayıcı aktivite tayini</u>	78
3.2.5.6. <u>ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi</u>	79
3.2.5.7. <u>Lipit peroksidasyonu</u>	80
3.2.6. UV koruyucu aktivite çalışması.....	822
3.2.7. Antikanser aktivite çalışmaları.....	83
3.2.7.1. <u>Hücre hatlarının aktiflenmesi ve sayılması</u>	83
3.2.7.2. <u>MTS yöntemi ile sitotoksik aktivitenin belirlenmesi</u>	84
3.2.7.3. <u>404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitlerinin Apaf-1, Ask-1, TNF-α, NF-KB ve NF-KB1 genlerinin Real Time PZR ile etkisinin belirlenmesi</u>	85
3.2.8. İstatistiksel analizler.....	87
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	88
4.1. Aktinomisetlerin İzolasyonu.....	88
4.2. Fermantasyon Besiyeri Seçimi	91
4.2.1. Toplam fenolik madde tayini	91
4.2.2. DPPH radikal giderici aktivite	94
4.3. Yüksek Antioksidan Aktivite Gösteren İzolatların Seçimi.....	99
4.3.1. Antioksidan aktivite	99

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3.2. Antimikrobiyal aktivite	119
4.3.3. Sitotoksik aktivite	124
4.4. Biyoaktif Metabolit Eldesi	128
4.4.1. Sıvı – sıvı ekstraksiyonu	128
4.4.2. Liyofilizasyon	130
4.5. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	132
4.5.1. Toplam fenolik madde tayini	132
4.5.2. DPPH radikal giderici aktivite	134
4.5.3. Redükleyici güç tayini	139
4.5.4. Beta karoten – linoleik asit antioksidan aktivite tayini	143
4.5.5. Metal şelatlayıcı aktivite tayini	147
4.5.6. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi	150
4.5.7. Lipit peroksidasyonu	155
4.6. UV Koruyu Aktivite Çalışması.....	165
4.7. Antikanser Aktivite Çalışmaları	167
4.7.1. Hücre hatlarının aktiflenmesi ve sayılması	167
4.7.2. MTS yöntemi ile sitotoksik aktivitenin belirlenmesi	167
4.7.3. 404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitlerinin Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF- KB ve NF-KB1 genlerinin Real Time PZR ile etkisinin belirlenmesi	178
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	184
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	187

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Askorbik asitin ROS detoksifikasyonu içindeki rolü. (Mavi noktalı çizgiler enzimatik olmayan reaksiyonları göstermektedir.) (Arrigoni ve De Tullio, 2002)	8
2.2 Alfa-tokoferolün kimyasal yapısı (Kontogiorgis vd., 2005)	9
2.3 Beta-karotenin kimyasal yapısı (Gökbulut ve Şarer 2008)	10
2.4 Temel flavonoid yapısı (Piette, 2000)	10
2.5 Flovonoid maddelerin sınıflandırılması (Piette, 2000)	11
2.6 Sentetik antioksidanlar (Shahidi ve Zhong, 2010)	12
2.7 DPPH radikali ve serbest formu (Anonim, 2020)	16
2.8 Ferrik demirin ferro demire indirgenmesi (Proestos ve Komaitis, 2009)	17
2.9 Metal şelatlayıcı aktivite yönteminde reaksiyon mekanizması (Bibi Sadeer vd., 2020)	18
2.10 ABTS reaksiyon mekanizması (Bibi Sadeer vd., 2020)	19
2.11 Otofaji aşamaları (Karadağ, 2016)	23
2.12 APAF-1 yolağı (Shakeri vd., 2017)	26
2.13 ROS kaynaklı ASK1 aktivasyon mekanizmaları (Soga vd., 2012)	27
2.14 TNFRI sinyal yolu (Ion vd., 2016)	28
2.15 Reaktif oksijen türleri aracılı NF-KB'nin aktivasyonuna ait sinyalleşme mekanizması (Minatel vd., 2016)	30
2.16 NF-KB1 sinyalleşme mekanizması (Brücher vd., 2019)	30
2.17 Sağlıklı kan hücreleri ile lösemi hücrelerinin karşılaştırması (Ali ve Sultana, 2012)	33
3.1 Morca mağarasına ait sediment ve %1'lik CaCO ₃ karışımı. a. -550. Metre, b. -170. Metre, c. - 100. Metre	62
3.2 Morca Mağarasına ait sedimentlerin stok ve 10-1'e ait dilüsyonları. a. -550. metre, b. - 170. metre, c. - 100. Metre	62
3.3 Aktinomiset izolasyon yönteminin uygulandığı petri kapları	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4 Örnek olarak seçilen iki izolatın aktifleme ortamındaki makromorfolojileri a. 3107 kodlu izolat - YEME besiyeri, b. 1117 kodlu izolat - NKM besiyeri	63
3.5 İnokülant olarak kullanılan aktinomiset spor süspansiyonları	64
3.6 Aktiflenmiş aktinomiset izolatları (a) Fermentasyon besiyerleri. (b) Soldan sağa; SMM, YEME, TYB, NKM	65
3.7 313 izolatının Whatman No 1 filtre kağıdından süzülmesi	66
3.8 Fermentasyon besiyeri seçiminde farklı konsantrasyonlarda kullanılan gallik asitin renk değişimi	66
3.9 Fermentasyon besiyeri seçiminde kullanılan gallik asit standart eğri grafiği	67
3.10 Antimikrobiyal aktivite özellikleri belirlenecek aktinomiset izolatlarının üreme özellikleri	70
3.11 Üremiş bir aktinomiset izolatına ait 6 mm çapında agar diskleri	71
3.12 Deney tasarımı (A: Aktinomiset izolatlarına ait agar diskleri, T: Pozitif kontrol olarak kullanılan tip türler, P: pozitif kontrol olarak kullanılan Standart antibiyotik diskleri, N: negatif kontrol olarak kullanılan besiyeri agar diski	71
3.13 Gallik asite ait standart eğri grafiği	75
3.14 EDTA'nın standart eğri grafiği	79
4.1 Farklı izolatların SMM besiyerindeki gelişimi (Soldan sağa, inoküle edilmemiş SMM, 313, 602, 819, 1210 ve 1812 kodlu izolat kültürleri)	91
4.2 Temsilci izolatların farklı fermentasyon besiyerlerinde total fenolik madde içeriği sonuçları	92
4.3 Fermentasyon besiyeri seçimi aşamasında izolatların farklı besiyerleri için renk değişimi (1: Kör, 2: SMM, 3: YEME, 4: TYB, 5: NKM)	93
4.4 Fermentasyon besiyeri seçiminde kullanılan temsilci izolatların farklı besiyerlerindeki % inhibisyon değerleri	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 Fermentasyon besiyeri seçiminde kullanılan izolatların DPPH radikal süpürücü aktivitelerine ilişkin renk değişimleri (1: DPPH, 2: Kör, 3: SMM, 4: YEME, 5: TYB, 6: NKM)	95
4.6 Pozitif ve negatif kontrol gruplarının <i>S. marcescens</i> (a) ve <i>M. luteus</i> (b) test mikroorganizmalarına karşı inhibisyonları	121
4.7 İzolatların <i>B. subtilis</i> (a) ve <i>M. luteus</i> (b) test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite zonları	122
4.8 İzolatların ve negatif kontrolün toplam fenolik madde değerleri	132
4.9 404i, C3-3 ve YEME besiyerine ait renk değişimi (1: Kör, 2,3,4: örneğe ait paralel çalışmalar)	133
4.10 Farklı konsantrasyonlardaki 404i, C3-3 izolatına ve YEME besiyerinin DPPH radikal süpürücü aktivitesine ilişkin renk değişimi (a: DPPHKör, b: DPPH, c: Deneyin körü)	135
4.11 Askorbik asit ve BHT'nin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesine ilişkin renk değişimi (a: Kör, b: DPPH)	135
4.12 Pozitif kontrollerin ve izolatların DPPH radikal süpürücü aktiviteleri	137
4.13 Farklı konsantrasyonlarda izolat ekstaktların ve kontrollerin redükleyici güç aktivitesine ilişkin renk değişimi (a, b: deney gruplarına ait kör)	141
4.14 Zamana bağlı izolatların (404i, C3-3), YEME besiyerinin ve pozitif kontrollerin beta karotene ilişkin renk değişimi (%)	144
4.15 Metal şelatlama aktivitesinde izolatlara ve kontrol gruplarına ait renk değişimi	147
4.16 İzolatların ve YEME besiyerinin EDTA eşdeğeri sonuçları (mg/g)	148
4.17 ABTS radikal katyon renksizleştirme yönteminde renk değişimi (a: Kör, b: ABTS)	152
4.18 ABTS radikal katyon renksizleştirme yönteminde % radikal inhibisyon (A.A.: Askorbik asit)	153
4.19 Farklı <i>Streptomyces</i> sp. suşlarına ait % ABTS radikali (Kekuda vd., 2015)	154

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.20 Ferrik Tiyosiyanat yönteminde örneklerin zamana bağlı absorbandsı	156
4.21 Ferrik Tiyosiyanat yönteminde zamana bağlı renk değişimi (a: Kör-Kontrol, b: Kör-404i, c: Kör-C3-3, d: Kör-YEME, e: Kör-Askorbik asit)	158
4.22 FTC yönteminde elde edilen absorbands sonuçları (Negatif kontrol: □, Saflaştırılmış pigment: ◆, α-tokoferol: ▲) (Stankovic vd., 2012)	159
4.23 Tiyobarbiturik Asit yönteminde örneklerin zamana bağlı absorbandsları	161
4.24 Tiyobarbiturik Asit yönteminde zamana bağlı renk değişimi (a: Kör-Kontrol, b: Kör-404i, c: Kör-C3-3, d: Kör-YEME, e: Kör-Askorbik asit)	163
4.25 Negatif kontrole ait koloni görüntüleri (a: UV'ye maruz bırakılmış, b: UV'ye maruz bırakılmamış)	166
4.26 IC50 değerindeki 404i ve C3-3 izolatların ekstraktlarının K562 hücre hattına karşı etkisi (a:404i, b: C3-3, c: Bortezomib, d: Kontrol)	169
4.27 IC50 değerindeki 404i ve C3-3 izolat ekstraktlarının HL-60 hücre hattına karşı etkisi (a:404i, b: C3-3, c: Bortezomib, d: Kontrol)	171
4.28 IC50 değerindeki 404i ve C3-3 izolat ekstraktlarının THP-1 hücre hattına karşı etkisi (a:404i, b: C3-3, c: Bortezomib, d: Kontrol)	173
4.29 404i ve C3-3 izolatlarının ve bortezomibin K562 hücre hattı için % canlılık grafiği	174
4.30 404i ve C3-3 izolatlarına ait ekstraktların ve bortezomibin HL-60 hücre hattı için % canlılık grafiği	175
4.31 THP-1 hücre hattında 404i, C3-3 izolatlarının ve bortezomibin % canlılık grafiği 404i ve C3-3 izolatlarına ait ekstraktların ve bortezomibin THP-1 hücre hattı için % canlılık grafiği	175
4.32 HL-60 hücre hattında mRNA ifade düzeyindeki farklılıklar	180
4.33 THP-1 hücre hattında mRNA ifade düzeyindeki farklılıklar	181

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Reaktif oksijen ve nitrojen türleri	3
2.2 Antioksidanların sınıflandırılması (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015)	5
2.3 Farklı organizmalar tarafından üretilen doğal antioksidan maddeler	5
2.4 Apoptozun morfolojik, biyokimyasal ve diğer özellikleri	21
2.5 Nekrozun morfolojik, biyokimyasal ve diğer özellikleri	24
3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları	40
3.2 Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları ve tip türler	48
3.3 Çalışmada kullanılan cihazlar	58
3.4 Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ve çözeltiler	59
3.5 Antimikrobiyal aktivite tarama çalışmasında kullanılan aktinomiset izolatları	69
3.6 Sitotoksik aktivitesi taranan izolatlar	72
3.7. Çalışmada kullanılan primer dizileri	86
4.1. Tek Yönlü Anova testi sonuçları (*: $p < 0.05$)	97
4.2. Tukey HSD testlerinin sonuçları	98
4.3. İstatistiksel analizler sonucunda besiyerlerinin birbirine benzerlik durumları	98
4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi (%)	100
4.5 Pozitif kontrollerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri (%)	117
4.6 Kontrol ve deney grubunun antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm)	119
4.7 Test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonları (mm) (Şen vd., 2011)	124
4.8 K562 hücre hattında izolatlara ait canlılık (%)	125
4.9 HL-60 hücre hattında izolatlara ait canlılık (%)	126
4.10 THP-1 hücre hattında izolatlara ait canlılık (%)	126
4.11 Sıvı – sıvı ekstraksiyon yönteminde DPPH radikal süpürücü aktivite değerleri (%) ..	129
4.12 Liyofilize kültür sıvılarının ve etil asetat ekstraksiyonu sonucunda elde edilen DPPH radikal süpürücü aktivite (%) aktiviteleri	131
4.13 Zamana bağlı izolatların (404i, C3-3), YEME besiyerinin ve pozitif kontrollerin beta karotene ilişkin renk değişimi (%)	145

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.14 İzolatların ve YEME besiyerinin şelatlayıcı aktivite sonuçları	148
4.15 ABTS radikal katyon renksizleştirme yönteminde farklı <i>Streptomyces</i> sp. suşuna ait IC50 değerleri (Kekuda vd., 2015)	154
4.16 Ferrik Tiyosiyanat yönteminde örneklerin zamana bağlı inhibisyonları (%)	157
4.17 Tiyobarbiturik Asit yönteminde örneklerin zamana bağlı inhibisyonları (%)	160
4.18 THP-1 hücre hattındaki Real Time-PZR mRNA ekspresyon sonuçları	179
4.19 HL-60 hücre hattındaki Real Time-PZR mRNA ekspresyon sonuçları	179

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Atm	Atmosfer basıncı birimi
FBS	Fetal bovine serum
Pbs	Fosfat salin tamponu
TCA	Trikloroasetik asit
TBA	Tiyobarbitürik asit
mM	Mili molar
μ M	Mikro molar
mg	Mili gram
μ g	Mikro gram
ng	Nano gram
ml	Mili litre
μ l	Mikro litre
rpm	Dönme hızı birimi
DMSO	Dimetil sülfoksit
EC ₅₀	%50 etkin konsantrasyon
IC ₅₀	%50 inhibisyon konsantrasyonu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aktinomiset grubu bakterilerin fermantasyon ürünlerinden olan antibiyotikler ve diğer endüstriyel bileşikler mikrobiyal ürünler arasında en zengin kaynak olarak gösterilmektedir. Son yıllarda serbest radikallerin çeşitli hastalıklardaki önemli rolü göz önünde bulundurulduğu zaman mikrobiyal kökenli ürünlere olan ilgi artmıştır. (Ruiz vd., 2010). Bu nedenle mikroorganizmalardan yeni ve güçlü antioksidan bileşikleri hedefleyen araştırmalara yoğunluk verilmesi önem arz etmektedir. Ökaryotik hücrelerin genomları, dışarıdan veya reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarlar nedeniyle tehdit altındadır. Aynı zamanda bu etkenler kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı için ultraviyole radyasyonun oluşturabileceği hasarların minimize edilmesi gerekmektedir (Houtgraaf vd., 2006). Kanser günümüzün en büyük sağlık sorunlarından biri olduğu için doğal bileşenlerden elde edilen sitotoksik maddelere olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır.

Çalışmamızda sekonder metabolit üretimince zengin olan aktinomisetlere ait biyoaktif bileşenlerin antioksidan, UV koruyucu ve sitotoksik aktivitelerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ekstrem koşullardan izole edilen mikroorganizmaların, biyoaktif bileşiklerce zengin ve zor şartları (maden yatakları, tuz oranları, oksijen seviyesi, basınç ve sıcaklık gibi) tolere edebilmesi nedeniyle çalışmada ekstrem koşullardan izole edilen aktinomiset izolatlarının kullanımı tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatlarına ait aktif metabolitlerin kullanımı iki hipoteze dayanmaktadır;

1. Antimikrobiyal aktivite göstermeyen izolatlar içinden tarama çalışmasıyla yüksek antioksidan ve sitotoksik aktivite gösteren izolatların çalışılması,
2. Antimikrobiyal aktivite göstermeyen izolatlar içinden tarama çalışmasıyla düşük antioksidan ve yüksek sitotoksik aktivite gösteren izolatların çalışılması.

Tarama çalışmasını standart bir ortamda gerçekleştirmek amacıyla uygun fermantasyon besiyeri seçimi için bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla total fenolik madde tayini ve DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemlerinden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri ile yapılmıştır. Uygun fermantasyon besiyerinin belirlenmesinden

sonra bir tarama çalışması gerçekleştirilmiş ve antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmalarında kullanılacak izolatlar belirlenmiştir. Olabildiğince fazla sayıda aktinomiset izolatını çalışmaya dahil etmek amacıyla, farklı kurumlarda görev yapan araştırmacılardan temin edilen toprak/sediment örnekleri ile izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tarama çalışması ile antimikrobiyal aktivitesi olmayan 404i (en yüksek antioksidan aktivite) ve C3-3 (en düşük antioksidan aktivite) izolatları çalışmanın bir sonraki aşamalarında kullanılmak üzere belirlenmiştir. Antioksidan aktivite çalışmaları kapsamında;

1. Total fenolik madde tayini,
2. DPPH radikal süpürücü aktivite,
3. Redükleyici güç,
4. Beta karoten- linoleik asit antioksidan aktivite,
5. Metal şelatlayıcı aktivite,
6. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi,
7. Lipit peroksidasyonu (ferrik tiyosiyanat ve tiyobarbiturik asit yöntemi) tayin yöntemleri çalışılmıştır.

Antioksidan aktiviteleri araştırılan izolatların UV koruyucu aktivitelerinin olup olmadığı *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde araştırılmıştır.

Farklı yöntemlerle antioksidan aktiviteleri belirlenen izolatlara ait aktif metabolitlerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla MTS yöntemi kullanılarak % canlılık hesaplanmıştır. Apoptotik etkinin belirlenmesi amacıyla aktif metabolitlerin Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB ve NF-KB1 genlerinin ifadesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Antioksidan Aktivite

2.1.1. Oksidanlar ve serbest radikaller

Oksidatif stres ile ilişkili olan serbest radikaller, birçok hastalığın sebebidir. Oksidatif stres, sağlıklı insan hücrelerinde biyolojik makro moleküllerle elektron eşleştirerek kararlı hale geçmeye çalışan ve lipid peroksidasyonu ile protein ve DNA hasarına neden olan serbest radikallerle başlatılır (Hazra vd., 2008). Serbest radikaller, “dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunduran molekül veya atom” olarak tanımlanmaktadır (Ekici ve Sağdıç, 2008). Serbest radikaller, Çizelge 2.1’de sunulduğu üzere oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir.

Çizelge 2.1 Reaktif oksijen ve nitrojen türleri

	Radikaller	Radikal Olmayanlar
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Süperoksit (O_2^-) Hidroksil (OH) Peroksil (ROO) Alkoksil (RO) Hidroperoksil (HO_2) Lipidperoksil (LOO)	Hidrojen peroksit (H_2O_2) Hipokloröz asit (HOCl) Hipobromöz asit (HOBr) Singlet oksijen (1O_2) Triplet oksijen (O_3)
Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	Nitrik oksit (NO) Nitrojen dioksit (NO_2)	Nitrik asit (HNO_2) Nitrosil katyonu (NO^+) Nitroksil anyonu (NO^-) Dinitrojentetroksid (N_2O_4) Dinitrojentrioksit (N_2O_3) Peroksinitrit ($ONOO^-$) Peroksinitrik asit ($ONOOH$) Nitronyum katyonu (NO_2^+) Nitriklorid (NO_2Cl) Alkil peroksinitrit ($ROONO$)

Başlıca serbest radikaller perhidroksil, süperoksit, hidrojen peroksit ve oksijen radikalleridir. Perhidroksil radikali, bir protonun bir oksijen atomuna bağlanması ile oluşmaktadır. Bu radikal lipid peroksidasyonun başlatıcısı olabileceği gibi önemli bir dizi reaksiyonun oksitleyicisi olarak işlev görebilir (Kumar, 2011). Süperoksit radikali, askorbik asit, sülfür ve NADPH gibi molekülleri oksitleyici veya sitokrom C ve metal iyonlarını indirgeyici olarak işlev görebilir. Düşük pH seviyelerinde daha reaktif olan bu radikal, dismutasyon reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksitin oluşması ile karakterizedir (Granger vd., 1981). Hidrojen peroksit radikali, elektron eşleme ihtiyacına sahip olmadığı için serbest radikal olarak görülmesi de hücre membranından kolay geçebildiği için DNA'nın parçalanmasına sebep olmaktadır. Organik moleküllerin sentezinde bu radikal birçok sayıda enzimin substratı olarak kullanılır ve reaktif geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali kaynağıdır. Oksijen radikalleri, singlet ve triplet (ozon) oksijen radikallerinden oluşmaktadır. Bu oksijen radikalleri serbest radikal olmamakla birlikte; bazı radikal reaksiyonlarında oluşabilir veya bu reaksiyonların oluşumunu tetikleyebilir (Kumar, 2011).

Son elli yıl boyunca, antioksidanların ateroskleroz, diyabet, inme, enflamatuar hastalıklar, kanser ve nörolojik hastalıklar gibi birçok insan hastalığını ortadan kaldırmadaki rolü oldukça ilgi çekmiştir (Fang vd., 2002). Serbest radikallerin sebep olabileceği bu hastalıklar; metabolik yollar ve solunum sistemi yoluyla olabileceği gibi, tütün ürünleri, kimyasallar ve radyasyon gibi çevresel kaynaklı veya stres, mental hastalıklar gibi psikolojik kaynaklı nedenlerden köken alabilir (Kumar, 2011).

2.1.2. Antioksidan bileşikler ve sınıflandırılması

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin üretimi ile doku yaralanmasına yol açabilecek antioksidan savunmalar arasındaki dengede bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (Betteridge, 2000). Oksidatif strese karşı antioksidan savunma mekanizması, her organizmada farklı evrimleşmiş olup direk olarak oksidanları yok etmeyi hedeflemektedir (Kohen ve Nyska, 2002). Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere antioksidanlar denilmektedir.

Antioksidanlar, oksitlenebilir substratlara kıyasla nispeten düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyon sürecini önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden maddelerdir (Kumar, 2011). Antioksidanlar endojenik veya ekzojenik kanaklı maddeler olabileceği gibi yapı taşlarına göre doğal ve yapay antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Antioksidanların sınıflandırılması (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015)

Doğal Antioksidanlar		
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Endojen	Eksojen
Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon redüktaz Glutasyon-S-transferaz	Glutasyon Serüloplazmin Bilirubin Albumin Ferritin Transferrin Laktoferrin Ürik asit Haptoglobinler	α -Tokoferol (Vitamin E) β -Karoten (Vitamin A) Askorbik Asit (Vitamin C) Folik Asit (Vitamin B9) Flavonoidler
Yapay Antioksidanlar		
Bütünlenmiş hidroksi tolüen (BHT) Bütünlenmiş hidroksianisol (BHA) Troloks Şelatlayıcılar		

Antioksidan bileşikler, farklı organizma grupları tarafından üretilmektedir. Çizelge 2.3’ de bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kaynaklı antioksidanlar sunulmuştur.

Çizelge 2.3 Farklı organizmalar tarafından üretilen doğal antioksidan maddeler

Bitkisel Kaynaklı	Hayvansal Kaynaklı	Mikroorganizma Kaynaklı
C vitamini E vitamini A vitamini Fenolik bileşikler	Peptitler Amino asitler Karotenoidler Enzimler	C vitamini E vitamini Fenolik bileşikler Karotenoidler

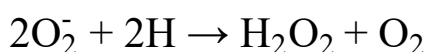
2.1.2.1. Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar, canlı vücudundaki oksitatif stresle başa çıkmak amacıyla organizma tarafından üretilen enzimler ve organizma tarafından üretilmediği için dışarıdan alınan bileşiklerdir (Çizelge 2.2).

Enzimatik antioksidanlar

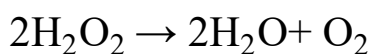
Hücre içinde çeşitli nedenlerle oluşan veya dışarıdan alınan serbest radikallerin neden olabileceği zararlı etkileri ortadan kaldırmak amacıyla hücreler enzimatik mekanizmalarla donatılmışlardır (Sinha ve Saxena, 2006). Bu enzimatik antioksidanlardan en çok bilenenler ise süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleridir.

Reaktif oksijen türlerine karşı birinci basamak savunma sisteminin bir bileşeni olarak hareket eden en önemli endojen enzim süperoksit dismutaz (SOD) enzimidir. Bu enzim, ilk detoksifikasyon enzimi ve hücredeki en güçlü antioksidan olarak bilinmektedir (Ighodaro ve Akinloye, 2018). İki süperoksit anyon molekülünün, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene olan dismutasyonunu katalize eder ve sonuç olarak potansiyel olarak zararlı süperoksit anyonunu daha az tehlikeli hale getirir (Denklem 2.1).



(2.1)

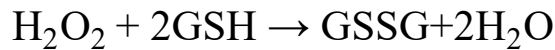
Katalaz, oksijen kullanan neredeyse tüm canlı dokularda bulunan yaygın bir antioksidan enzimdir. Katalaz enzimi, süperoksitdismutaz tarafından üretilen hidrojen peroksidin, su ve moleküler oksijene indirgenmesini katalize ederek SOD tarafından gerçekleştirilen detoksifikasyon işlemini tamamlar (Denklem 2.2).



(2.2)

Katalaz enzimi, milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü bir saniyede parçalayabilir. Bu enzim özellikle peroksizomlarda bulunur. Ancak memeli hücrelerinin mitokondrilerinde (tek istisna olarak sıçan kalbinde bulunan mitokondriler dışında) bulunmamaktadır (Radi vd., 1991). Bu nedenle memeli hücre mitokondrisinde, hidrojen peroksitin suya ve oksijene parçalanmasını glutatyon peroksidaz olarak bilinen başka bir enzim gerçekleştirir.

Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksiti suya parçalayan önemli bir diğer hücre içi enzim olarak bilinir. Aynı zamanda bu enzim, lipid peroksitleri mitokondrilerde ve bazen de sitoplazmada karşılık gelen alkollerine dönüştürür. Glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesi, yapısında bulunan selenyum olarak bilinen bir kofaktöre bağlıdır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Hidrojen peroksit, glutatyon (GSH) ile parçalandığında su ve oksitlenmiş glutatyon meydana gelir (Denklem 2.3)



(2.3)

Glutatyon redüktaz elektron transferinde rol oynamaktadır. Hidrojen peroksidazın parçalanmasında glutatyonun tekrar kullanılması amacıyla, glutatyon disülfidin (GSSG) NADPH'a bağlanarak azalmasını katalize eden bir flavoproteindir (Denklem 2.4). Reaksiyonun gerçekleşmesi, glutatyon seviyelerinin korunması için gereklidir (Chaudière ve Ferrari-Iliou, 1999).



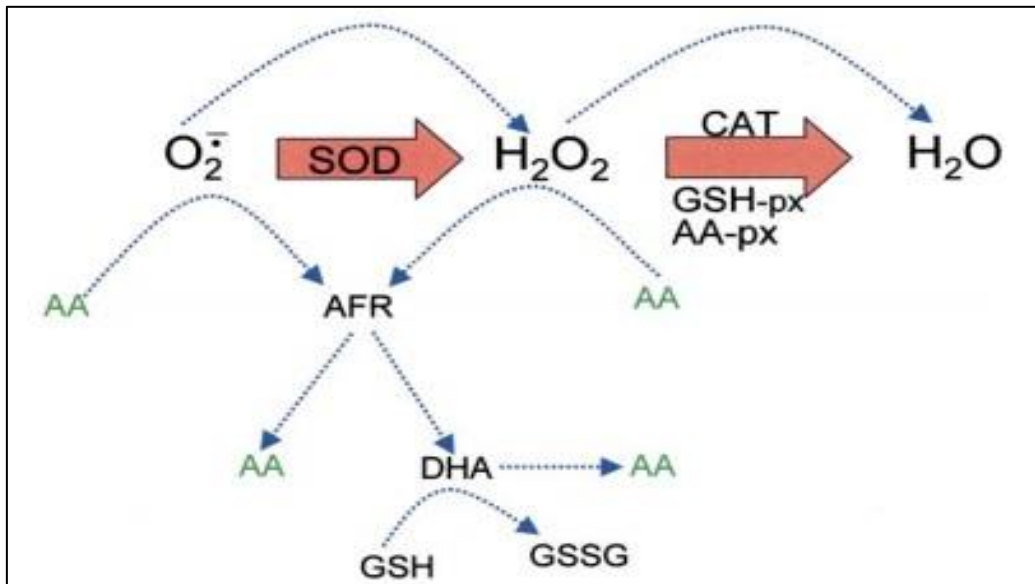
(2.4)

Glutatyon S-transferaz enzim grubu, toksinlerin, ksenobiyotiklerin ve kanserojenlerin detoksifikasyonunda rol oynadığı gibi aynı zamanda hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı özellikleri olduğu bilinmektedir (Türkan ve Atalar, 2018).

Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzim yapısında olmayan doğal antioksidanlar enzimatik olmayan antioksidanlar veya nonenzimatik antioksidanlar olarak adlandırılmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar endojen ve ekzojen olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu antioksidanlardan başlıcaları askorbik asit, α -tokoferol, β -karoten ve çeşitli fenolik bileşiklerdir.

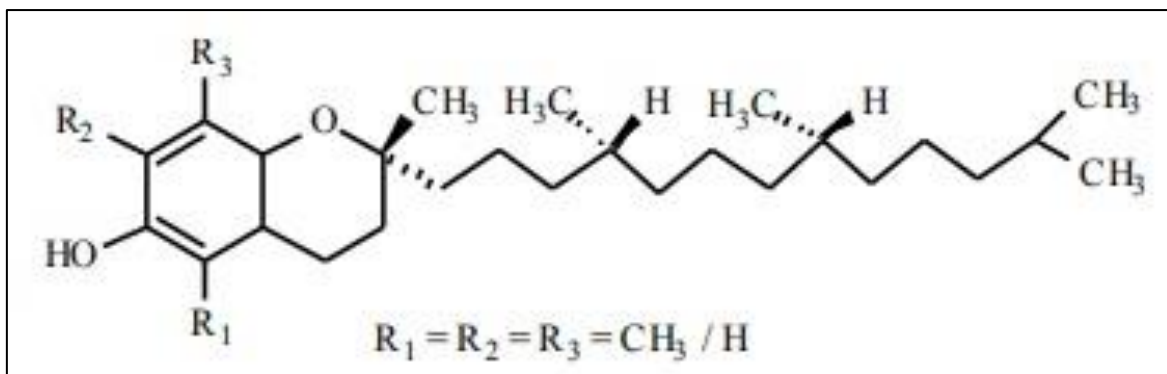
1920'leri sonunda keşfedilen, suda çözülebilen askorbik asit (C Vitamini), hücre metabolizmasında oluşan toksik serbest radikalleri ve diğer reaktif oksijen türlerini etkin şekilde temizleyen bir antioksidan maddedir (Arrigoni ve De Tullio, 2002). Reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması için genel olarak kabul edilen modele göre (Şekil 2.1); SOD, süperoksit anyonunun H_2O_2 ve oksijene göre orantısızlığını katalize eder; H_2O_2 ise CAT tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülür (Fridovich, 1999). CAT devir sayısı yüksek te olsa H_2O_2 için nispeten düşüktür. Bu nedenle hücrede belirli miktarda H_2O_2 kalmaktadır. Fakat GSH-px ve AA-px, H_2O_2 için yüksek bütünlüklerinden dolayı düşük miktarlarda H_2O_2 'yi çıkarabilir. Bunun sonucunda da SOD, CAT ve peroksidazların işbirliği ile hidroksil radikal oluşumu sınırlanır (Arrigoni ve De Tullio, 2002).



Şekil 2.1 Askorbik asitin ROS detoksifikasyonu içindeki rolü. (Mavi noktalı çizgiler enzimatik olmayan reaksiyonları göstermektedir.) (Arrigoni ve De Tullio, 2002)

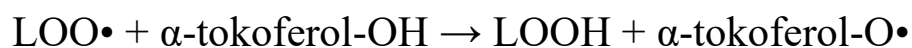
Askorbik asitin reaktif oksijen türlerinin oluşumunun engellenmesindeki rolü göz önünde bulundurulduğunda, insanlar ve primatlar için dışarıdan diyet yolu ile bu maddeler alınmadığı zaman, klinik bulgular neticesinde ölüm ile sonuçlanabilir.

Vitamin E olarak bilinen α - tokoferol (Şekil 2.2), bir diğer önemli enzimatik olmayan ve sentetik olarak elde edilebilen bir antioksidan maddedir. Lipitte çözünen α - tokoferol, membranlarda ve plazmada en önemli radikal temizleyici antioksidan olduğu öne sürülmüştür (Burton vd., 1983). Alfa-tokoferol, reaktif oksijen türlerini nötralize edebilir, oksidatif DNA hasarını ve genetik mutasyonları azaltabilir (Seddon vd., 1994).



Şekil 2.2 Alfa-tokoferolün kimyasal yapısı (Kontogiorgis vd., 2005)

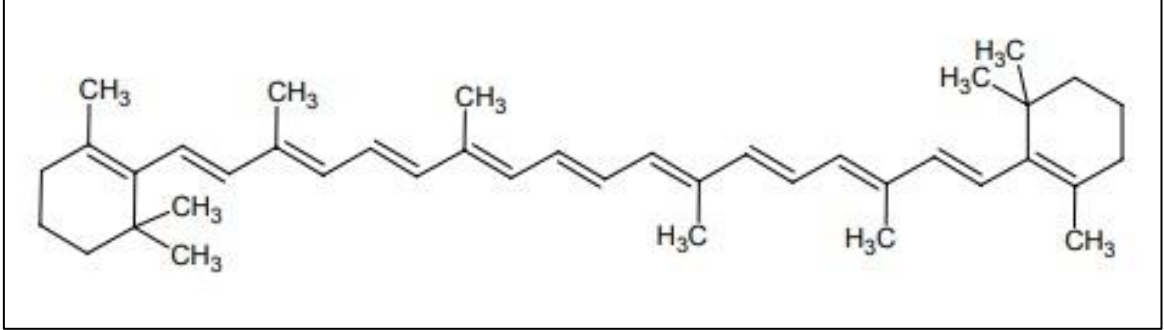
Alfa-tokoferol, hücre membranında ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) dahil olmak üzere çeşitli lipit partiküllerinde zincir kırıcı, lipit peroksidasyon zinciri reaksiyonlarını sonlandırma ve lipidperoksil radikallerini (LOO^\bullet) durdurma işlevi görür (Nimse ve Pal, 2015). Denklem 2.5'te, alfa-tokoferolün lipit peroksidasyonundaki zincir kırma ve sonlandırma reaksiyonu verilmiştir.



(2.5)

β -karotenler, 600 farklı karotenoid bileşik içinde, lipitte çözülen ve en yaygın olarak bilinen, antioksidan bileşiklerden biri olarak öne çıkmaktadır. β -karotenler, kimyasal yapısı ve biyolojik membranlarla etkileşimi nedeniyle potansiyel antioksidan özellik gösterir

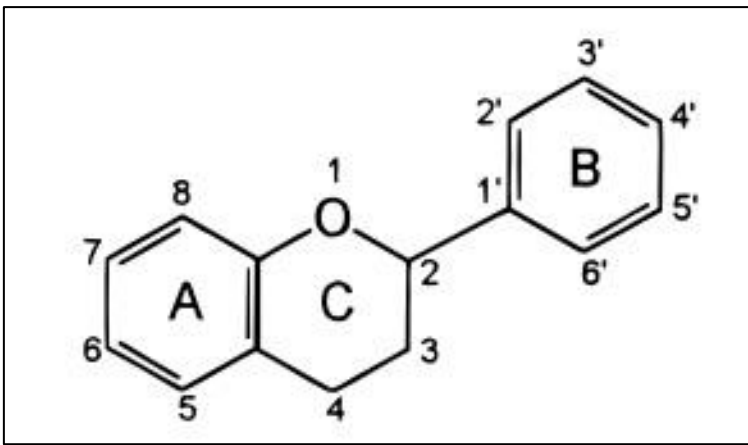
(Riccioni, 2009). B-karoten, singlet oksijeni alfa-tokoferole göre daha yüksek verimle bağlar (Di Mascio vd., 1989). Şekil 2.3'te β -karotenin kimyasal yapısı sunulmuştur.



Şekil 2.3 Beta-karotenin kimyasal yapısı (Gökbulut ve Şarer, 2008)

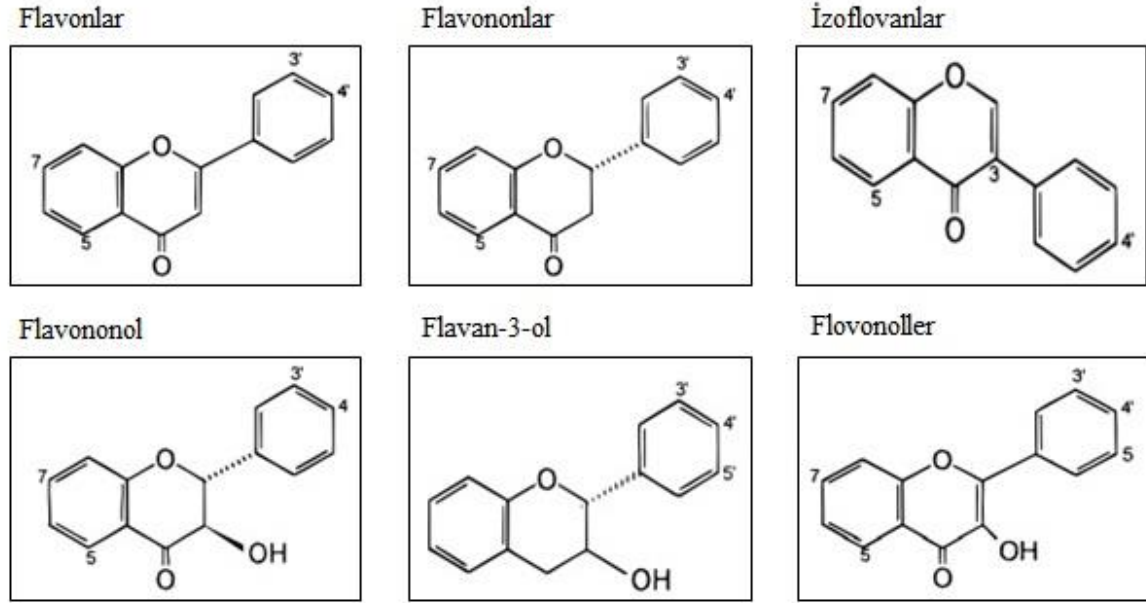
Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla OH grubu buluduran bileşiklerdir (Uyar vd., 2013). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi temel olarak serbest radikallerin adsorpsiyonunda ve nötralize edilmesinde, singlet ve triplet oksijenin bağlanması veya peroksitlerin ayrıştırılmasında önemli bir rol oynayabilen redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Velioğlu vd., 1998).

Sekonder bir metabolit olan flavonoidler, fenolik bileşiklerin bilinen bir grubudur. Temel flavonoid yapısı (Şekil 2.4) A, B ve C olarak etiketlenmiş üç halkada (C₆-C₃-C₆) düzenlenmiş 15 karbon atomundan oluşan flavan çekirdeğidir (Piette, 2000).



Şekil 2.4 Temel flavonoid yapısı (Piette, 2000)

Çeşitli flavonoid sınıfları, C halkasının oksidasyon ve yer değiştirme modelinde farklılık gösterirken, bir sınıf içindeki ayrı ayrı bileşikler, A ve B halkalarının yer değiştirme modelinde farklılık gösterir (Piette, 2000). Flavonoidlerin birçok sınıfı arasında, özellikle ilgi çekenler flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanonoller, flavan-3-ols ve antosiyanidir (Şekil 2.5) (Narayana vd., 2001).



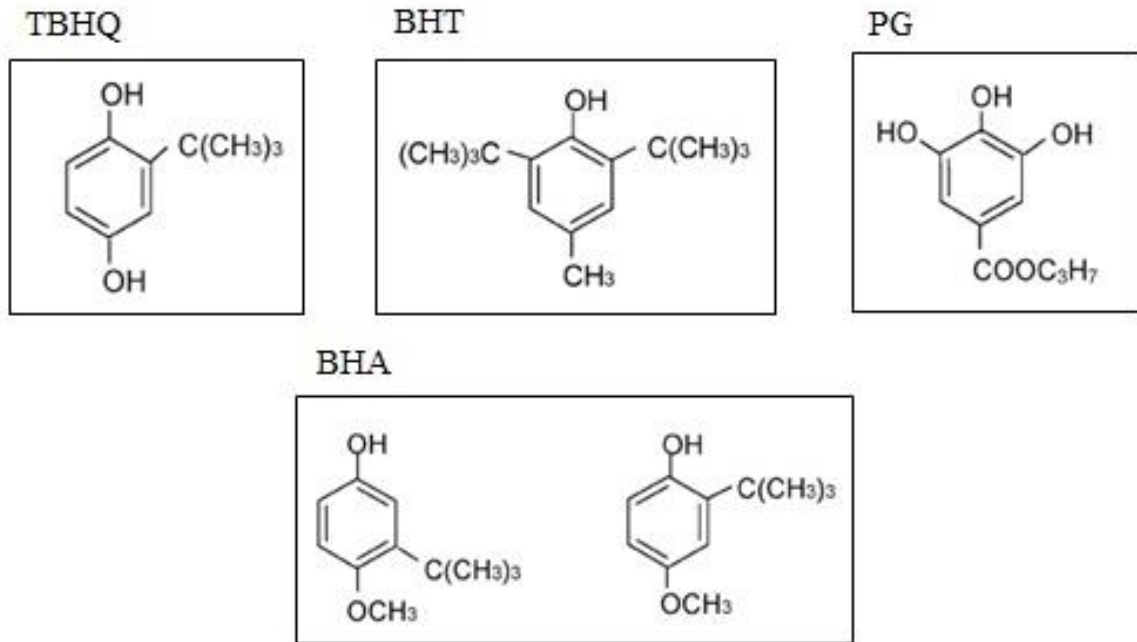
Şekil 2.5 Flavonoid maddelerin sınıflandırılması (Piette, 2000)

Flavonoidlerin antioksidan olarak hareket etme kapasiteleri sadece FI-O• / FI-OH çiftinin redoks potansiyeline bağlı değil, aynı zamanda aroksil radikalinin olası yan reaksiyonlarına da bağlıdır (Piette, 2000). Flavonoid maddeler, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarındaki agresif hidroksil radikalinin potansiyel bir öncüsü olduğu gibi oksidatif süreçlerde yer alan serbest radikalleri onlarla kompleks oluşturarak stabilize edebilir (Cao vd., 1997).

2.1.2.2. Sentetik antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar, herhangi bir canlı organizmada bulunmayan, endüstriyel prosesler ile uzmanlar tarafından petrol bazlı ürünlerin sentezlenmesi veya biyosentezi sonucunda elde edilen maddelerdir (Pokorný, 2007).

Sentetik antioksidanlar, 1940'larda BHA'nın oksidasyonu geciktirdiği verisi ve gallik asidin birkaç alkil esterinin antioksidan etkinliği ortaya çıktığında gıda endüstrisine giriş yapmıştır (Shahidi ve Zhong, 2010). Şu an gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan antioksidanlar Şekil 2.6'de verilen TBHQ (Tersiyer-bütillhidrokinon), BHT, PG (Propilgallat) ve BHA gibi sentetik antioksidanlarıdır. Fakat yapılan çalışmalar neticesinde sentetik antioksidanların kullanımı, potansiyel kanserojen etkileri konusunda artan endişe nedeniyle artık sınırlıdır (Shahidi, 2000). Bu etkinin sonucu olarak doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır.



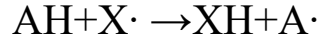
Şekil 2.6 Sentetik antioksidanlar (Shahidi ve Zhong, 2010)

2.1.3. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Antioksidan aktivite tayin yöntemleri, reaksiyon mekanizmalarına göre başlıca iki grupta ele alınmaktadır. Bunlar hidrojen transferine (HAT) ve tek elektron transferine (ET) dayanan reaksiyonlar olarak adlandırılmaktadır (Huang vd., 2005).

2.1.3.1. Hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler

HAT tabanlı yöntemler, antioksidan moleküllerinin hidrojen bağı (AH) ile serbest radikallerin (H donörü) kararlı hale geçmesine dayanmaktadır (Prior vd., 2005). Bu reaksiyonda gerçekleşen tepkime Denklem 2.5' de sunulmuştur.

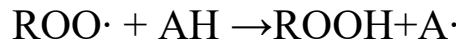
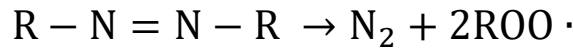


(2.5)

HAT temelli yöntemler oksijen radikal absorban kapasitesi tayini (ORAC), total radikal yakalayıcı aktivite tayini (TRAP) ve karotenoid (Krosin) ağartma yöntemlerini içermektedir.

Oksijen radikal absorban kapasitesi tayini (ORAC)

ORAC yöntemi Cao vd. (1993) tarafından geliştirilmiş olup, bir peroksil radikal kaynağının (ROO·) neden olduğu oksidatif hasarın sonucunda bir proteinin floresansındaki azalmanın ölçümüne dayanmaktadır. Kısaca antioksidanların, proteini oksidatif hasardan koruma becerisini ölçmektedir. Floresans özellik gösteren bir molekülle (Prob) reaksiyona giren peroksil radikali, floresans olmayan bir ürün oluşturur (Denklem 2.6). Bu reaksiyonun sonucunda floresans bozunma eğrisi ile antioksidan koruyucu etki belirlenmiş olmaktadır (Büyüktünel, 2013).



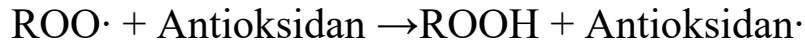
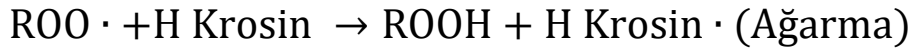
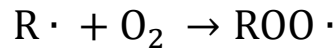
(2.6)

Total radikal yakalayıcı aktivite tayini (TRAP)

Yöntem ilk defa Wayner vd. tarafından, genellikle plazmanın antioksidan kapasitesinin tayini amacı ile kullanılmıştır (Büyüktuncel, 2013). Lipid peroksidasyonu boyunca bir azo-bileşiğin sıcaklık ile bozulması sonucunda oluşan oksijen tüketiminin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. TRAP yönteminde, AAPH'ın termal ayrışması sonucunda, peroksil radikallerinin üretimi R-PE floresan emisyonunda bir azalmaya neden olur. Reaksiyon karışımına eklenen plazma ile R-PE için tam bir koruma süresi gözlemlenir. Plazma tarafından üretilen gecikme fazındaki uzunluk ölçülerek, Troloks tarafından üretilen gecikme fazının uzunluğu ile mukayese edilir (Wayner vd., 1985).

Karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi

Isı ve ışık yoluyla veya peroksil radikalleri ile gerçekleşen oksidasyon sonucunda karotenoidlerin renklerinde açılma gözlemlenir. Bu renk açılması spesifik absorbans düşüklüğüne neden olur ve bu düşüş reaksiyon hızının ölçülmesine olanak sağlar (Tubaro vd., 1996). Krosin ağartma yönteminde gerçekleşen reaksiyon basamakları Denklem 2.7' de sunulmuştur. Yöntemde karotenoid olarak β -karoten veya krosin tercih edilmektedir. Fakat oksidasyon sonucunda meydana gelen renk ağarması farklı girişimlerle meydana gelebildiği için sonuçların yorumlanması ve ifadesinde zorluk oluşturmaktadır (Büyüktuncel, 2013).



(2.7)

2.1.3.2. Elektron transfer (ET) yöntemleri

Spektrofotometrik ölçümlere dayanan elektron transferi yöntemleri, reaksiyon karışımında bulunan oksidanın, antioksidan moleküllerinden bir elektron almasının sonucunda oksidanda meydana gelen renk değişiminin ölçülmesine dayanmaktadır (Huang vd., 2005). Renkte meydana gelen değişimin derecesi ile antioksidan derişimi orantılıdır. ET yönteminde gerçekleşen reaksiyon Denklem 2.8’de verilmektedir. Elektron transferine dayanan yöntemler; ABTS radikal giderici (TEAC), Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) süpürücü ve Ferrik redükleyici (FRAP) antioksidan aktivite tayinleri, Cu(II) kullanılan toplam antioksidan (CURPAC), redükleyici güç, metal şelatlayıcı aktivite olarak sıralanabilir. Elektron transfer yöntemleri başlığı altında, yalnızca çalışmada kullanılan elektron transferine dayalı yöntemlere değinilmiştir.

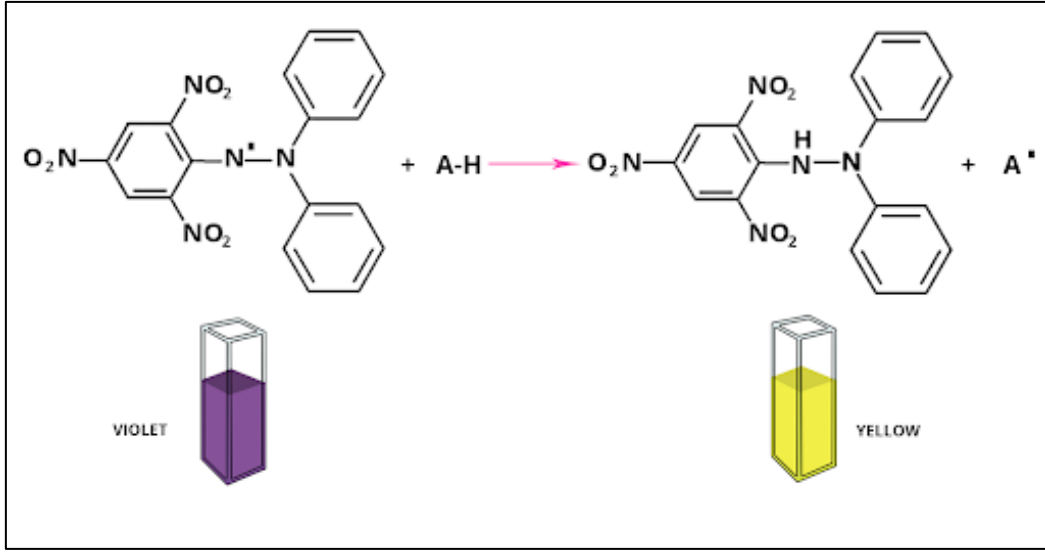
Oksidan + e⁻

→ İndirgenmiş Oksidan + Yükseltgenmiş Antioksidan

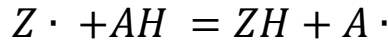
(2.8)

Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) süpürücü aktivite tayini

DPPH yöntemi diphenyl-1-picrylhydrazyl (C₁₈H₁₂N₅O₆,) kullanılarak antioksidan aktiviteyi belirleme amacıyla Blois (1958) tarafından geliştirilmiştir (Kadera vd., 2011). Yöntem antioksidanların redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürme kapasitesinin ölçümüne dayanmaktadır. Üzerindeki yedek elektronun yer değiştirmesi ile kararlı organik azot radikallerinden biri olan DPPH koyu menekşe rengindedir (Şekil 2.7) ve diğer serbest radikallerin çoğunluğundaki gibi dimerize olmaz. DPPH’deki azot atomunun elektronu (Z), antioksidanlardan (AH) karşılık gelen hidrazine bir hidrojen atomu olarak indirgenir (Contreras-Guzmán ve Srong, 1982). DPPH çözeltisinin bir hidrojen atomu bağışlayabilen bir madde ile karıştırılması durumunda, koyu mor renk açılır. DPPH radikali ile antioksidan maddeler arasında gerçekleşen tepkimeye ait eşitlik, Denklem 2.9’ da verilmiştir.



Şekil 2.7 DPPH radikali ve serbest formu (Anonim, 2020)



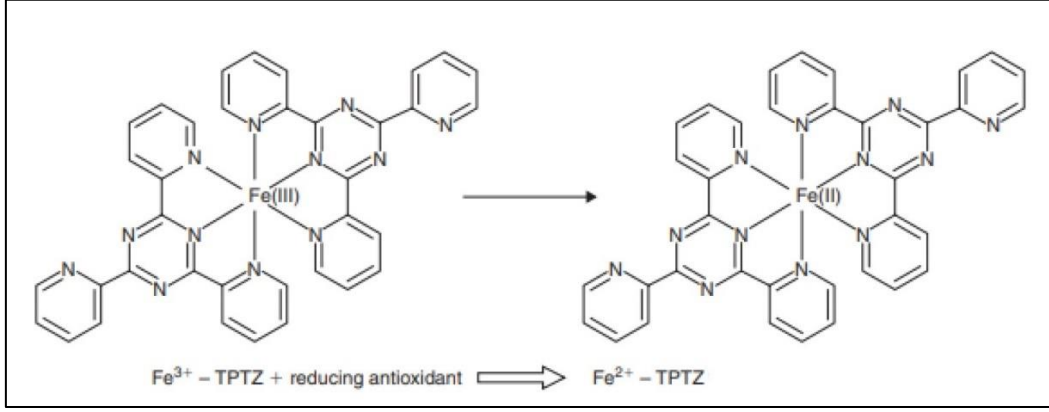
(2.9)

DPPH süpürücü aktivite tayininin son yıllarda literatürde çok fazla yer almasının sebebi deneyin basit, hızlı ve duyarlı olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat, DPPH'nin sulu ortamda çözülmemesi sonucunda hidrofilik antioksidanların etkisinin veya rolünün yorumlanmasındaki zorluklar bu yöntemin en büyük dezavantajı olarak görülmektedir (Büyüktuncel, 2013). Bir diğer dezavantajı ise; DPPH molekülünün zamanla ve ışık etkisiyle absorbandsında meydana gelen azalmalar gösterilebilir. Örneğin 120 dakikalık süre sonunda DPPH'nin 517 nm dalga boyundaki absorbandsında yaklaşık %20-35 azalma görülmektedir (Özçelik vd., 2003).

Redükleyici güç

Yöntem antioksidanların varlığında, ferrik demirin (Fe^{3+}) ferro demire (Fe^{2+}) indirgenmesine dayanmaktadır (Şekil 2.8) (Ferreira vd., 2007). Bir bileşiğin indirgenme kapasitesi potansiyel antioksidan aktivitenin göstergesidir (Meir vd., 1995). Ancak, redükleyici güç yönteminde indirgeyici maddelerin varlığı (antioksidanlar) moleküllerdeki

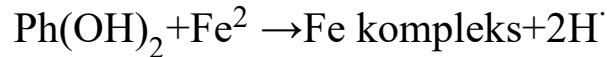
zincirleme reaksiyonların başlaması, metal iyon katalizörlerinin bağlanması, peroksidazların ayrışması, sürekli hidrojen alma reaksiyonlarının önlenmesi gibi birçok etki mekanizmasına sahiptir (Diplock, 1997; Yıldırım vd., 2000; Oktay vd., 2003).



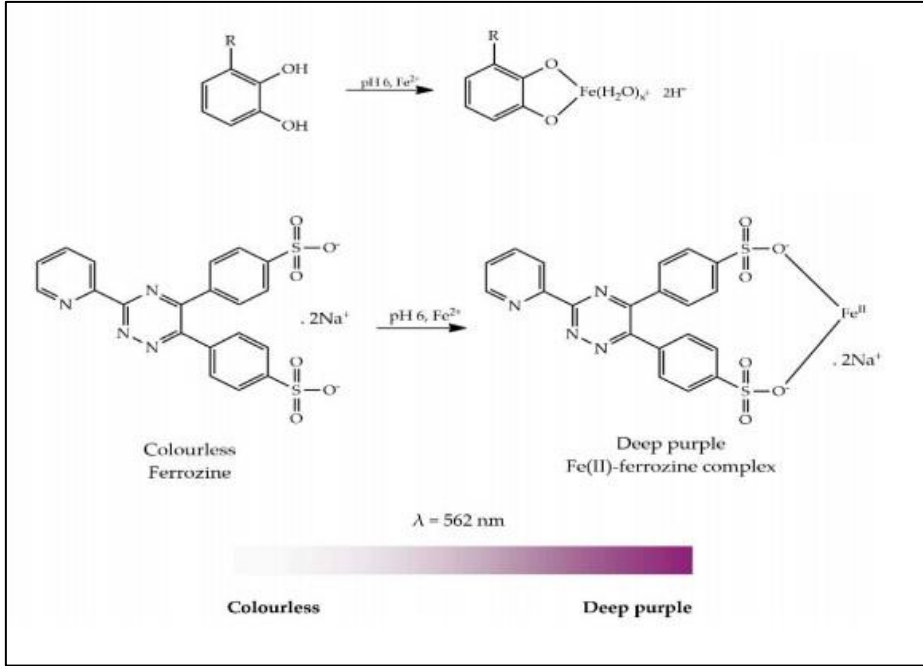
Şekil 2.8 Ferrik demirin ferro demire indirgenmesi (Proestos ve Komaitis, 2009)

Metal şelatlayıcı aktivite

Metal iyonlarının şelasyonu antioksidan etkiye sahiptir. Çünkü geçiş metalleri olan demir ve bakır, hidroksil radikali (OH) ve süperoksit radikali (O_2) dahil reaktif oksijen türlerinin üretimini katalize eder, doymamış lipidlerin oksidasyonuna yol açar ve farklı seviyelerde oksitatif hasarı artırır (Saiga vd., 2003). Bu nedenle demir iyonlarının bağlanma kapasitesi arttıkça oksitatif hasar azalacaktır. Antioksidan maddelerin varlığında ferrozun ve Fe^{2+} iyonlarının kompleks bir yapı oluşturması inhibe olarak kırmızı rengin açıldığı görülür (Sarıkürkçü vd., 2015). Metal şelatlayıcı aktivite yönteminde gerçekleşen kimyasal reaksiyon Denklem 2.10'da gerçekleşen reaksiyon mekanizması ise Şekil 2.9'de sunulmuştur.



(2.10)



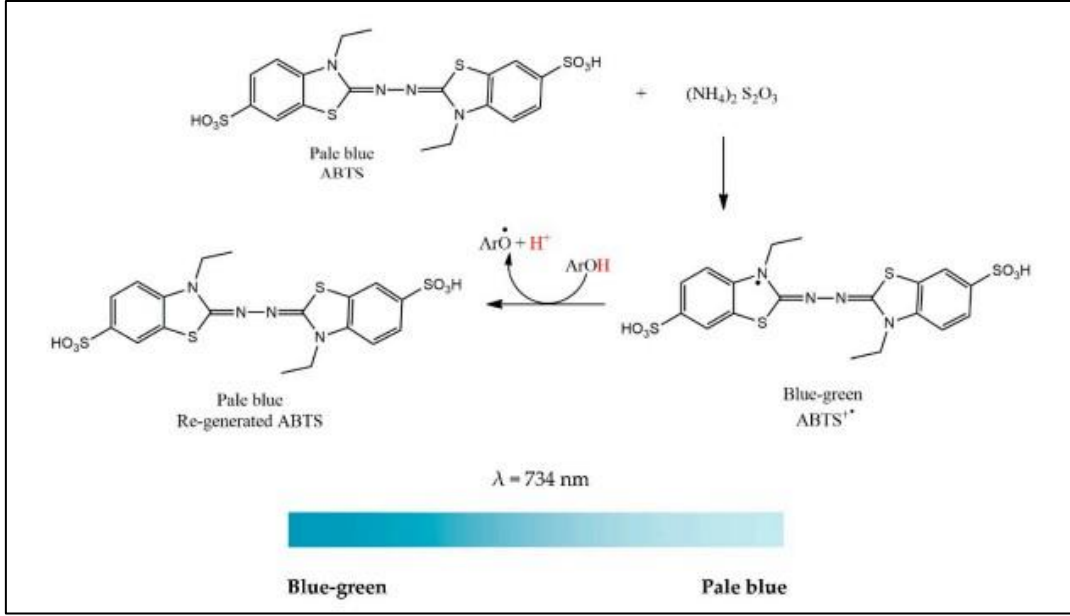
Şekil 2.9 Metal şelatlayıcı aktivite yönteminde reaksiyon mekanizması (Bibi Sadeer vd., 2020)

ABTS radikal giderici aktivite tayini (TEAC)

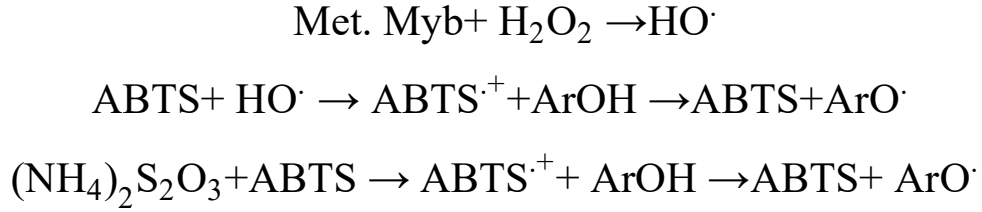
Antioksidan aktivitenin taranmasına yönelik diğer bir yöntem olan ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlara uygulanabilen renk giderici bir testtir (Re vd., 1999). Yöntem, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu yolu ile elde edilen 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS⁺) radikal monokasyonun absorbansındaki azalmanın ölçülmesine dayanır (Rice-Evans ve Miller, 1994; Re vd., 1999).

ABTS⁺, peroksil radikalleri veya diğer oksitleyiciler tarafından radikal katyonuna oksitlenir ve antioksidan maddelerin yoğun bir renge sahip ABTS⁺ radikal katyonu ile reaksiyona girmesi sonucunda da bu yoğun rengin açıldığı görülür (Prior vd., 2005). ABTS'nin absorpsiyon maksiması 415, 645, 734 ve 815 nm dalga boylarında olduğu; çoğu araştırmacı tarafından ABTS ve antioksidanlar arasındaki reaksiyonun 415 ve 734 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak çalışıldığı görülmektedir (Cano vd., 2000).

ABTS radikal giderici aktivite tayininde gerçekleşen reaksiyon mekanizması Şekil 2.10'de, kimyasal mekanizma ise Denklem 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.10 ABTS reaksiyon mekanizması (Bibi Sadeer vd., 2020)



(2.11)

2.2. Ultraviyole Koruyucu Aktivite

Özellikle sucul ortamlarda bulunan mikroorganizmaların uğraşması gereken streslerin başında, Ultraviyole (UV) radyasyonun neden olduğu DNA hasarı gelmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalar sonucunda birçok farklı DNA polimerazı tanımlanmış ve UV hasarına karşı DNA onarımında oynadıkları roller araştırılmıştır (Simonson vd., 1990). Ökaryotik *S. cerevisiae* hücrelerinin DNA onarımı yaptığı keşfedilmiştir (Terleth vd., 1989).

UV ışıkları 290 ile 320 nm dalga boylarında reaktif oksijen türlerinin üretimi yolu ile doğrudan veya dolaylı olarak hücre hasarlarına neden olabilir (Jurkiewicz ve Buettner, 1994). Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini her ne kadar önlese de UV'ye kronik maruz kalma sonucunda reaktif oksijen türleri DNA, proteinler ve lipitler gibi hücrenel bileşenlerin oksidatif hasarına neden olur (Ramachandran ve Prasad, 2008).

2.3. Sitotoksik Aktivite

2.3.1. Hücre ölümü

Çok hücreli organizmalarda hücre ölümü, doku homeostazını koruyan ve potansiyel olarak zararlı hücreleri ortadan kaldıran kritik ve aktif bir süreçtir. Hücre ölümü, önemli bir hasarın sonucu olarak gerçekleşebilmesine karşın, hayvanlardaki hücre ölümlerinin çoğu belirli sinyal olaylarının bir sonucu olarak aktif bir şekilde gerçekleşmektedir (Green ve Llambi, 2015). Genel olarak, üç tip hücre ölümü vardır; apoptoz (tip I hücre ölümü), otofajik hücre ölümü (tip II hücre ölümü) ve nekroz (tip III hücre ölümü) (Galluzzi vd., 2007).

2.3.1.1. Apoptoz (Tip I hücre ölümü)

Apoptoz, inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendini yok ettiği, genlerle düzenlenen, enerjiye gereksinim duyan, organizmadaki homeostaziyi koruyan fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan bir süreçtir (Tomatır, 2003). Bu programlı ölüm mekanizmasının nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmese de, hücrelerin genetiklerinde var olan ölüm programı çeşitli büyüme ve bölünme sinyalleriyle; tamiri mümkün olmayan hasarlar, hücre içi sinyaller, sitotoksik ajanlar, bazı kimyasal ve kansorejenler ve oksidatif stres gibi nedenlerin sonucunda başlamaktadır (Hampton ve Orrenius, 1998).

Tip I hücre ölümü olan apoptozun morfolojik, biyokimyasal ve diğer özellikleri Çizelge 2.4'te sunulmuştur.

Çizelge 2.4 Apoptozun morfolojik, biyokimyasal ve diğer özellikleri (Coşkun ve Özgür'den (2011) modifiye edilmiştir.)

Morfolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none"> • Hücre membranı sağlamdır. • Hücre küçülür. • Blebler oluşur. • Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. • Organeller sağlamdır. • Apoptotik cisimcikler oluşur. • Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir.
Fizyolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none"> • Programlıdır. • ATP gerektirir. • DNA kırıkları merdiven şeklini alır.
Diğer özellikler	<ul style="list-style-type: none"> • Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. • Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. • Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. • Enflamasyon görülmez.

Apoptoz; embriyonik dönemde gerçekleşen memeli üyelerinin el ve ayak parmaklarının arasındaki dokunun ortadan kalkması, merkezi sinir sisteminin şekillenmesi gibi; postnatal hayatta kemik iliğinin kan üretiminin denge tutulması, menstruasyon sırasındaki fonksiyonel tabakanın dökülmesi gibi; patolojik durumlarda diyabet, Parkinson hastalığı, bağışıklık sistemi hastalıkları, oksidatif stres, radyasyon gibi nedenler ile gerçekleşebilmektedir (Coşkun ve Özgür, 2011).

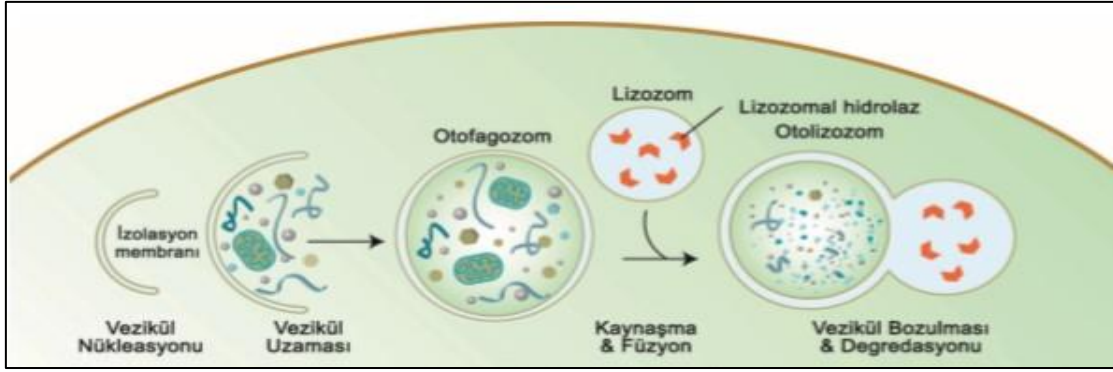
Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde; hücre ölüm reseptörleri (Fas, TNF, DR4, DR5, TRAIL gibi), Bcl- ailesi (apoptozu indükleyici Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa / apoptozu baskılayıcı Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1), kaspazlar (inflamatuar kaspazlar: kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 / başlatıcı kaspazlar: kaspaz-2, -8, -9, -10 / efektör

kaspazlar: kaspaz-3, -6, -7), kalsiyum (Ca^{++}) iyon konsantrasyonu değişimi ve endoplazmik retikulum stresi rol almaktadır (Wyllie, 1995). Apoptoz mekanizmaları ise, hücre içi ölüm sinyalleri ile mitokondri aracılı ve hücre dışı ölüm sinyalleri ile ölüm reseptörü aracılı olarak iki başlık altında ele alınmaktadır (Mizutani vd., 2005).

2.3.1.2. Otofaji (Tip II hücre ölümü)

Otofaji, hücre içi makromoleküllerin ve organellerin bir vakuol içine alınması ile primer lizozomlarla birleşip parçalanması olarak tanımlanmaktadır. Bu ölüm tipi ile anabolik ve katabolik fonksiyonlar dengelenir (Çoşkun ve Özgür, 2011). Uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji yolu ile parçalandıktan sonra geri dönüştürülürler. Oluşan yapı taşları, hücre büyümesi, hücre gelişimi ve hücre kullanımı için geri kullanılmaktadır (Arslan vd., 2011). Otofaji aşamalarının şematik gösterimi Şekil 2.11'te verilmiştir.

Tüm ökaryotik organizmalarda evrimsel olarak korunan katabolik bir süreç olarak tanımlanan otofaji, hücrelerin içindeki temel metabolik fonksiyonların düzenlenmesinden yaşlanma, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve lizozomal bozukluklar gibi çeşitli hastalıklara kadar, insan vücudunun homeostazını kontrol etmede merkezi düzenleyici nokta haline gelmiştir. Otofaji, bazal düzeyde, proteinlerin ve organellerin sitoplazmik dönüşümü yoluyla hücre içi koşulları düzenler (Saha vd., 2018). Bazı durumlarda, Atg5 ve Atg7 gibi otofajik proteinlerin silinmesi üzerine hücrelerde ubiquitin proteinlerin biriktiği bildirilmiştir. Bu da otofajinin hücrelerin protein dönüşümünü düzenlemede oynadığı vazgeçilmez rolü ortaya koymaktadır (Komatsu vd., 2005).



Şekil 2.11 Otofaji aşamaları (Karadağ, 2016)

Otofajinin kanser biyolojisinde çok önemli bir yeri olduğu kefedilmiştir. Buna göre, tümör başlangıcı ve kötü huyluluğa geçiş evresi sırasında tümör baskılayıcı bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Hasarlı hücreleri ve organelleri ortadan kaldırarak kanserin üstündeki inhibitör etkisini gösterir ve böylece kanserli hücre çoğalmasını ve genomik dengesizliği sınırlar. Kanser ilerlemesini önemli ölçüde kolaylaştıran tümör baskılayıcı p53 mutant geni, Akt / mTOR yolları aracılığı ile otofajik süreci önlemekle birlikte tümör oluşumu ile arasındaki etkili bağlantıyı yok etmektedir (Cordani vd., 2017).

3.2.1.3. Nekroz (Tip III hücre ölümü)

Nekroz, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreç olmakla birlikte çoğunlukla hipoksi, vücudumuzun ihtiyaç duymadığı arsenik gibi ağır metaller, insektisitler ve toksik maddelerin neden olduğu bir ölüm şeklidir. Nekroz sırasında artan mitokondriyel ROS üretimi nedeni ile nanopoptik proteazlar aktive olur. ATP üretimi azalırken, Ca^{++} kanalları açılır (Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotera ve Melino, 2004).

En sık karşılaşılan nekroz türü olan koagülasyon nekrozu, her tür iskemik olayda gözlenir. Koagülasyon nekrozu dışında; likefaksiyon nekrozu (dokunun enzimatik sindirimi), kazeöz nekroz (tüberküloz hastalığı ile karakterize), yağ nekrozu (yağ asitlerinin kalsiyum ile birleşmesi sonucu), kangrenöz nekroz (yaralanmalar sonucu bakterilerin etkisi ile) ve fibrinoid nekroz (bağ dokusu ve damarlarda) olmak üzere birçok farklı nekroz türü bulunmaktadır (Çoşkun ve Özgür, 2011).

Apoptozun aksine nekroz enfeksiyon sonucunda da ortaya çıkmaktadır. Hücresel içeriklerle beraber inflamatuvar moleküllerin hücreler arasındaki boşluğa salınımı ile oluşan inflamasyon yanıt diğer ölüm tiplerinden nekrozu ayırmaktadır (Jin ve El-Deiry, 2005). Nekrozun en belirgin özelliği ise hücre membranında şişmenin meydana gelmesi ve parçalanması, membranda bulunan lipitlerde hasarların meydana gelmesi gösterilebilir (Blank ve Shiloh, 2007).

Tip II hücre ölümü olan nekrozun morfolojik, biyokimyasal ve diğer özellikleri Çizelge 2.4'te sunulmuştur.

Çizelge 2.5 Nekrozun morfolojik, biyokimyasal ve diğer özellikleri (Coşkun ve Özgür'den (2011) modifiye edilmiştir.)

Morfolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hücre membranı bütünlüğü kaybolur. ▪ Hücre şişer. ▪ Büyük vakuoller oluşur. ▪ Organeller parçalanır. ▪ Hücre lizisi gerçekleşir. ▪ Fosfatidilserin translokasyonu yoktur.
Fizyolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none"> • İyon dengesi bozulur. • ATP gerekmez. • DNA rastgele parçalanır.
Diğer özellikler	<ul style="list-style-type: none"> • Hücreler gruplar halinde ölür. • Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. • Lizozomal enzimler salınır. • İnflamasyona neden olur.

Son yıllarda literatürde yer alan çalışmalarda, bazı nekrotik hücre ölümlerinin de programlanmış olabileceği yönündedir. Örneğin bir çalışma sonucunda TNF- α aracılığıyla oluşan hücre ölümünün programlı olduğu (Zhang vd., 2009), başka bir çalışma da ise kaspaz inhibitörlerinden bağımsız bir şekilde ROS üretimi ile nekrozun tetiklendiği (Ardestani vd., 2013) kaydedilmiştir.

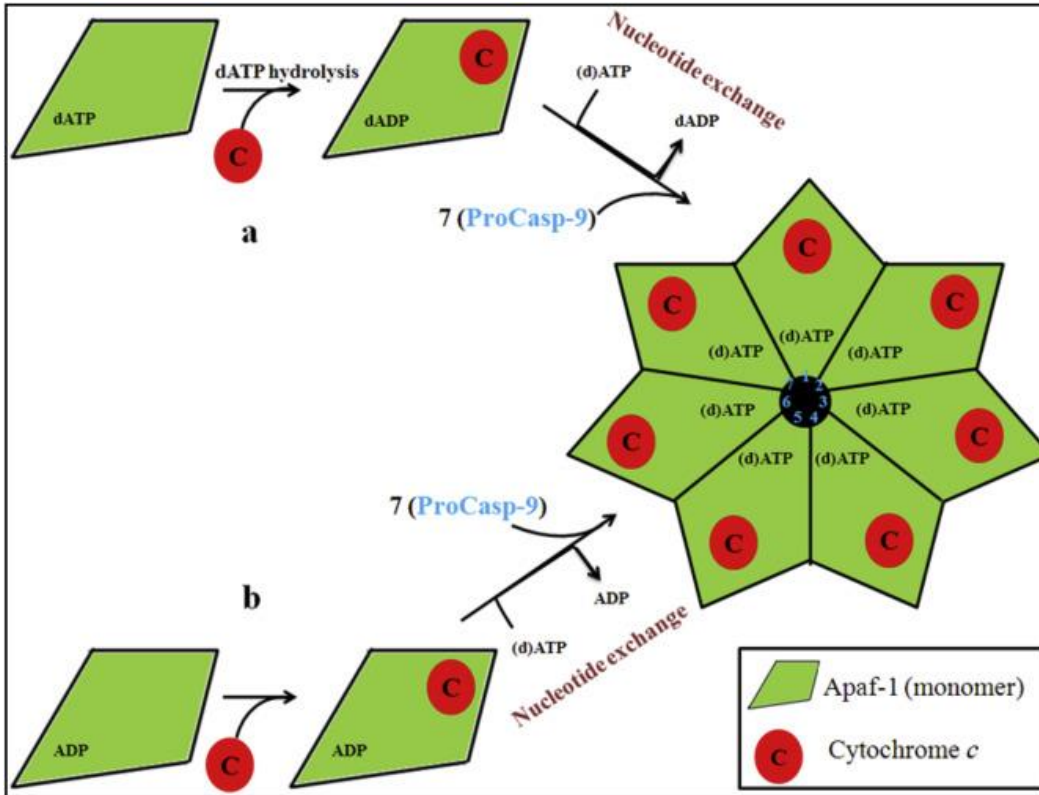
2.3.2. Hücre ölümü ile ilgili gen bölgeleri

Bu başlık altında apoptotik etkinin belirlenmesi amacı ile çalışmada kullanılan Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB, NF-KB1 ve GAPDH (Referans gen) gen bölgelerinden bahsedilecektir.

2.3.2.1. Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1)

Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1), *C. elegans* CED-4 geninin insan homologudur (Smith vd., 1999). Apaf-1 geni, apoptozu başlatan ve mitokondriye bağımlı ölüm yolunda çok önemli bir faktör olan sitoplazmik bir proteini kodlar (Kaman vd., 2019). Bu protein (N terminalinden) bir kaspaz domaini (CARD), bir ATPaz alanı (NB-ARC), birkaç kısa sarmal alan ve ardından WD40 tekrar alanının birkaç kopyasını içerir. Sitokrom c ve dATP'yi bağladıktan sonra, bu protein bir oligomerik apoptozom oluşturur. Apoptozom, Prokaspaze-9 proteinini bağlar ve ayırarak olgun, aktive edilmiş formunu serbest bırakır (Kim vd., 2006) (Şekil 2.12). Salvesan (2008) tarafından yapılan çalışma, apoptozomun kaspaz-9 dimerizasyonunu ve otakatalizi indükleyebileceğini öne sürmesine rağmen, bu reaksiyonun kesin mekanizması hala tartışılmaktadır.

Apaf-1, apoptoz, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok yolla ilişkilendirilir. Apaf-1, apoptozun intrinsik veya mitokondriyal yolunda aldığı önemli rol ile; hücre ölümünde düzenleme ve işlev ile ilişkilendirilmektedir (Shakeri vd., 2017). Apaf-1 protein ekspresyonu düşüktür, bu da onu apoptozom oluşumu ve apoptoz sinyallemede sınırlayıcı bir faktör yapar. Apaf-1 geninin promoter bölgesinin, CpG adası olarak adlandırılan oldukça yüksek bir G / C içeriği içerdiği bulunmuştur. CpG'nin metilasyonuna bağlı Apaf-1 gen inaktivasyonu lösemi hücre dizilerinde gözlenir ve beklenen demetilasyon, bu hücrelerde Apaf-1 ekspresyonunu geri yükler (Yoshida vd., 1998; Soengas vd., 2001).



Şekil 2.12 Apaf-1yolağı (Shakeri vd., 2017)

2.3.2.2. Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK-1)

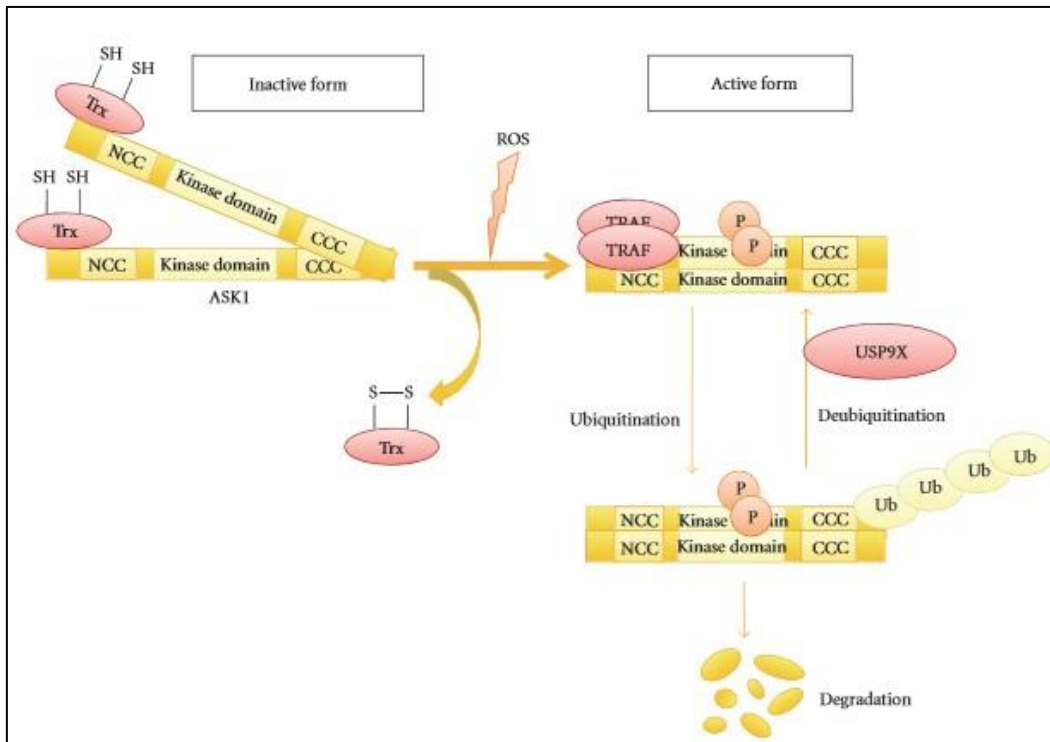
Mitojenle aktive olan protein kinaz 5 (MAP3K5) olarak da bilinen apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1), MAP kinaz ailesinin bir üyesidir ve bu nedenle mitojenle aktive olan protein kinaz yolunun bir parçasıdır. Oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve kalsiyum akışı gibi bir dizi strese yanıt olarak c-Jun N-terminal kinazı (JNK) ve p38 mitojenle aktive olan protein kinazları Raftan bağımsız bir şekilde aktive eder.

ASK1, C-terminal sarmal coiled-coil domaini (CCC) aracılığıyla oligomerize edilir (aktivasyonu için bir gereklilik); fakat indirgenmiş tioredoksin (Trx), kalsiyum ve integrin başlatıcı protein 1'in (CIB1) baskılayıcı etkisi ile inaktif bir formda kalır (Yoon vd., 2019). Trx, ASK' kinaz aktivitesini N-terminal çift kıvrımlı etki alanına (NCC) doğrudan bağlanarak inhibe eder; integrin başlatıcı protein 1 ve ASK1 aktivasyonunu sırası ile redoks veya kalsiyum duyarlı şekilde düzenler. ASK1 aktivatörü olan TNF- α reseptörü ile TRAF2

ve TRAF6 rekabet eder ve büyük kütle kompleksi oluşturmak için ASK1'e alınır (Noguchi vd., 2005). ROS kaynaklı ASK1 aktivasyon mekanizmaları Şekil 2.13'te sunulmuştur.

ASK1 gen transkripsiyonu, NF-kb proteini RelA'nın aktivasyonu yoluyla IL-1 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenebilir (Nygaard vd., 2018) ve TNF- α , ASK1 proteinini deubikütinasyon yoluyla stabilize edebilir (He vd., 2006). Sonuç olarak, mitojenle aktive olan protein kinaz ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak, ASK1 ekspresyonunun düzenlenmesi hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrasıdır.

ASK1'in kanser, diyabet, romatoid artrit, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir (Hattori vd., 2009). ASK1-p38 yolunun ROS ile indüklenen aktivasyonu, dendritik hücrelerde ve makrofajlarda TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimine ve ASK1'e bağlı üretimine yol açar (Soga vd., 2012).

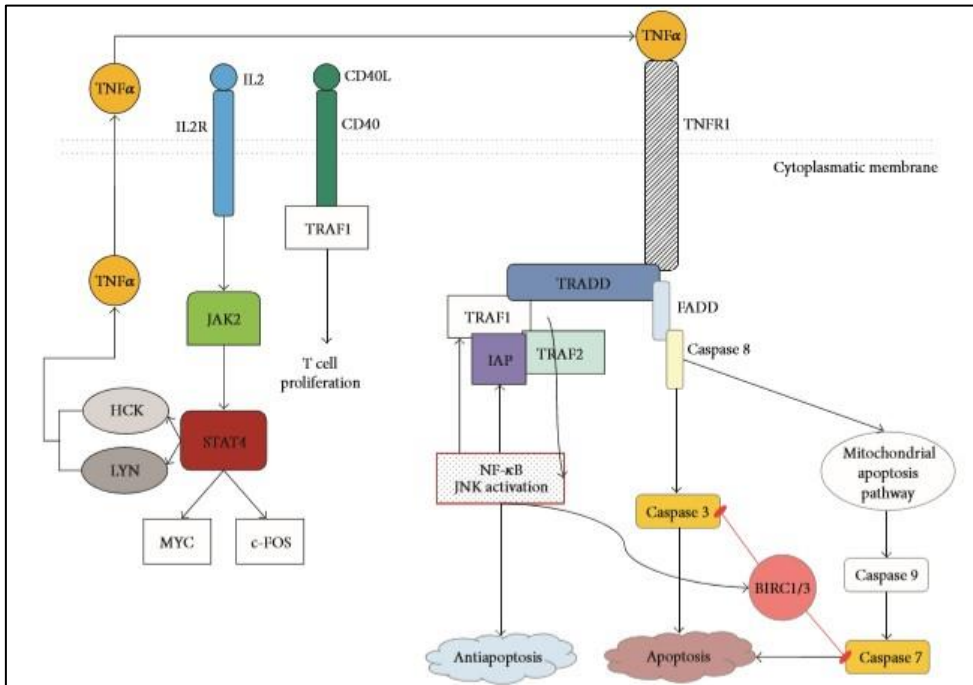


Şekil 2.13 ROS kaynaklı ASK1 aktivasyon mekanizmaları (Soga vd., 2012)

2.3.2.3. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktörü süper ailesinin bir üyesi olan Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) inflamatuvar hastalıkların patogenezinde, hücre regülasyonu, hücre farklılaşması, kanserli hücrelerin yıkımı ve özellikle hücre içi patojenlere karşı enfeksiyonlara immün aracılı yanıtta rol oynayan polipeptit yapıda bir sitokindir (Pompili, vd., 2013). Tümör nekroz faktörünün alfa ve beta olmak üzere iki tipi bulunmakla birlikte, TNF- α genellikle makrofajlar ve monositler tarafından salınmasına rağmen T ve B hücreleri, mast hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve tümör hücreleri gibi birçok farklı hücreden de sentezlenebilir (Gözde vd., 2008).

TNF sinyal iletiminde apoptoz ve inflamasyon mekanizmaları olmak üzere iki çeşit yol vardır. TNF, TNF resöptörü I ve II resöptörlerini bağlayabilir. TNF resöptörü II çoğunlukla bağışıklık sistemi hücrelerinde bulunurken, TNF reseptörü I ise çoğu dokuda eksprese olabilmektedir. NF- κ B'nin etkinleştirilmesi, MAPK yollarının etkinleştirilmesi ve ölüm sinyalinin tetiklenmesi gibi TNFR1 sinyal yolları vardır (Şekil 2.15).



Şekil 2.14 TNFR1 sinyal yolu (Ion vd., 2016)

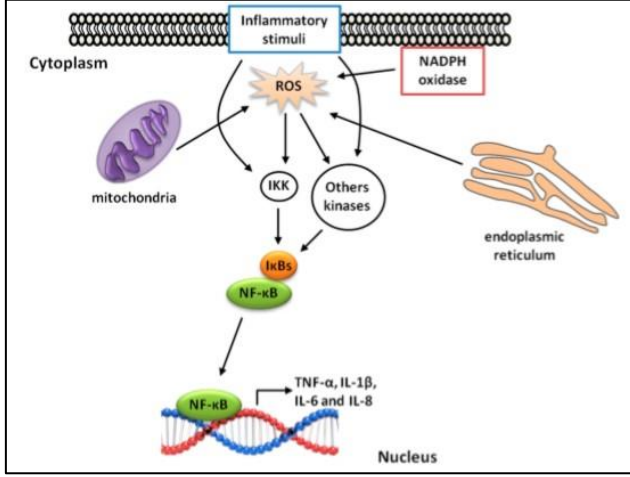
2.3.2.4. Nükleer faktör kappa B (NF-KB) ve Nükleer faktör kappa B1 (NF-KB1)

Nükleer faktör kappa B (NF-KB) aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisi olup, DNA'nın transkripsiyonu, sitokin üretimi ve hücrelerin hayatta kalmasını kontrol eden bir protein kompleksidir. Neredeyse tüm hayvan hücre tiplerinde bulunan NF-KB sitokinler, serbest radikaller, ağır metaller ve ultra viyole ışınlar gibi uyarılara karşı hücreyel yanıtın bir parçasında rol oynamaktadır (Gilmore, 2006). Nükleer faktör kappa B'nin olası yanlış düzenlenmesi kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi sonuçlarla ilişkilendirilmiştir.

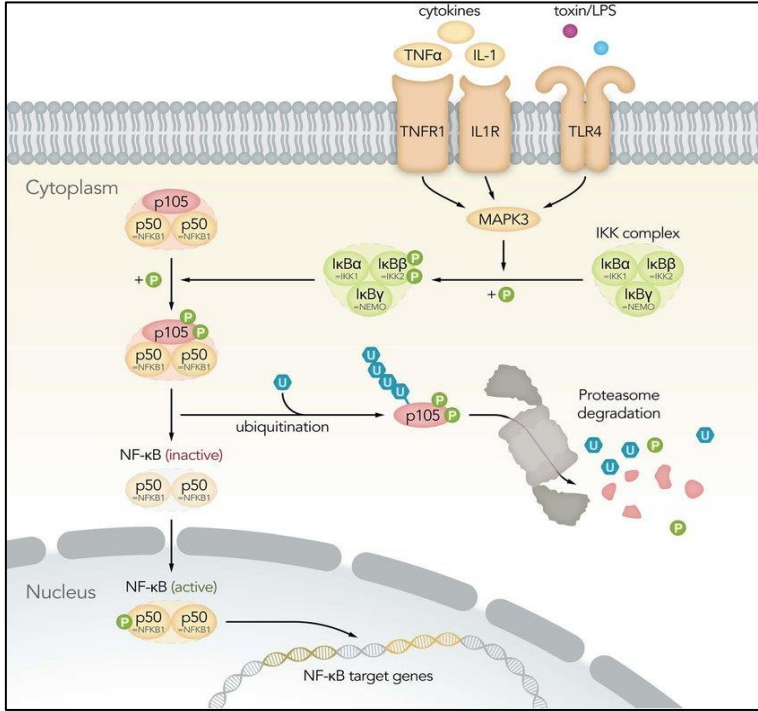
NF-KB, RelB ile heterodimerleşerek gen transkripsiyonunu destekleyen DNA ile üçlü bir kompleks oluşturur. NF-KB aktivitesinin bilinen indükleyicileri; reaktif oksijen türleri (Şekil 2.15), tümör nekroz faktörü alfa, interlökin 1-beta, bakteriyel lipopolisakkaritler, izoproterenol, kokain ve iyonlaştırıcı radyasyondur (Flohé, 1997). Tümör nekroz faktörü sitotoksitesinin baskılanması, antioksidan enzimlerin indüksiyonuna ve JNK'lerin sürekli aktivasyonuna bağlıdır (Papa vd., 2006). NF-KB'nin reseptör aktivatörü (RANK), NF-KB'nin merkezi aktivatörüdür. Bu reseptör aktivatörü RANK ligandı için homoloğu olan osteoprotegerin (OPG) bağlanarak, NF-KB'nin reseptör aktivatörünü inhibe eder (Baud'Huin vd., 2007).

p50 / p105 (NF-kB1), p52 / p100 (NF-kB2), p65 (RelA), c-Rel ve RelB homodimerleri veya heterodimerleri NF-KB peptitleri tarafından oluşturulur. Rel-A / NF-kB1 heterodimeri, aktif NF-KB kompleksine en sık katılan alt birimdir (Beinke ve Ley, 2004). İnsanlarda NF-KB1 geni tarafından kodlanan alt birim NF-KB p105 proteindir. Bu gen, 50 kD'lik bir protein üretmek için 26S proteazomu tarafından birlikte dönüşümsel işlemde geçebilen 105 kD'lik bir proteini kodlar (Meyer vd., 1991). NF-KB'nin en bol formu p50 / p65 heterodimerinden oluşurken, p50 homodimerleri birçok uyarılmamış hücre ve dokuda baskındır. P50'nin her yerde ifade edilmesi, bu alt birimin geniş bir fizyolojik süreç aralığında kritik bir rol oynadığını göstermektedir. p50, NFKB1 geni tarafından kodlanır ve proteozomal işlemde sonra NF-KB1 / p105'in N-terminalinden üretilir ve NF_KB alt birimlerinin kaybı fizyolojik yaşlanma ile ilişkilidir (Bernal vd., 2014). Homodimerler ve heterodimerler oluşturan NF-KB alt birimleri, KB proteinlerinin (IKB)

inhibitörü tarafından sitoplazmada inaktif tutulur; NF-KB sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla IKK'nin fosforilasyonu ve degradasyonu, NF-KB dimerlerinin çekirdeğe translokasyonuna yol açar (Concetti ve Wilson, 2018) (Şekil 2.16).



Şekil 2.15 Reaktif oksijen türleri aracılı NF-KB'nin aktivasyonuna ait sinyalleşme mekanizması (Minatel vd., 2016)



Şekil 2.17 NF-KB1 sinyalleşme mekanizması (Brücher vd., 2019)

2.3.2.5. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) (Referans gen)

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), glikolizin altıncı aşamasını katalize eden ve böylece enerji ve karbon molekülleri için glikozu parçalamaya yarayan bir enzimdir. GAPDH, transkripsiyon aktivasyonu, apoptozun başlaması gibi birçok metabolik olmayan süreçte rol oynamaktadır (Williams vd., 2006). GAPDH kendi başına transkripsiyonu etkinleştirebilir ve sitozol ve çekirdek arasında hareket ederek metabolik durumu gen transkripsiyonuna bağlayabilir (Zheng vd., 2003).

Hara vd. (2005), GAPDH'nin apoptozu başlattığını gösterdi. GAPDH, kutanöz melanom gibi birçok insan kanserinde aşırı eksprese edilir ve ekspresyonu, tümör progresyonu ile pozitif korelasyon gösterir. Glikolitik ve antiapoptotik fonksiyonları, tümör hücrelerinin çoğalmasına ve korunmasına katkıda bulunur ve tümörjenez destekler. Özellikle GAPDH, sfingolipid seramidi uyaran kemoterapötik ilaçların neden olduğu telomer kısalmasına karşı koruma sağlar (Ramos vd., 2015). Aynı zamanda oksidatif stres gibi durumlar GAPDH fonksiyonunu bozarak hücre yaşlanmaya ve ölüme yol açar.

Housekeeping genler, temel hücre korunması ile ilgilidir ve bu nedenle, tüm hücrelerde ve koşullarda sabit ekspresyon seviyelerini korumaları beklenir. Bu genlerin tanımlanması, altta yatan hücre altyapısının açığa çıkmasını kolaylaştırır ve çeşitli yapısal genomik özelliklerin anlaşılmasını artırır (Eisenberg ve Levanon, 2013). Özellikle, GAPDH, tübülünler, siklofilin, albümin, aktinler 18S rRNA veya 28S rRNA gibi deneysel ekspresyon çalışmalarında birkaç memeli geni dahili kontroller olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Velculescu vd., 1999).

2.3.3. Lösemi

İstisnalar dışında kanserler, tekli somatik hücrelerden ve bunların soylarından köken almaktadır. Ortaya çıkan neoplastik klondaki hücrelerin gen aktivitesinde meydana gelen değişiklikler sonucunda seçime tabi olan değiştirilmiş fenotiplerde bir dizi genetik veya epigenetik değişiklikler birikir. Bunun sonucunda, normal çoğalmayı ve bölge kontrollerini göz ardı edebilen ve kansere dönüşen hücre popülasyonu gelişir (Ponder, 2001). Kanser

hücre fenotipinin ayırt edici özellikleri çoğalma ve farklılaşma için sinyallerin göz ardı edilmesi, sürekli yayılma kapasitesi, apoptozdan kaçınma, istila ve anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

John Hughes Bennett (1812-1875) tarafından ilk kez kanda gözlemlenen sorunun iltihap veya inflamasyon kaynaklı olmadığı ortaya kondu. İlk kez Henry Fuller 1846'da 'leukemia' terimini kullanmıştır (Atıcı, 2007). Kan kanseri veya kemik iliği kanseri olarak tanımlanan lösemi, kemik iliğinde üretilen beyaz kan hücrelerinden lenfoid ve myloid hücrelerinin kontrolsüz çoğalması nedeni ile oluşan bir kanser türüdür (Şekil 2.17). Lenfoid ve myloid hücreleri, sağlıklı akyuvar hücrelerinin işlevini yerine getirmesini engeller; bunun sonucunda da kansızlık, bağışıklık sisteminde düşüklük ve morarma gibi belirtiler meydana gelir. Lösemi en yaygın 15 yaşından küçük çocuklarda görülmesine rağmen, 55 yaşından büyük insanlarda da görülmektedir (Paul vd., 2016).

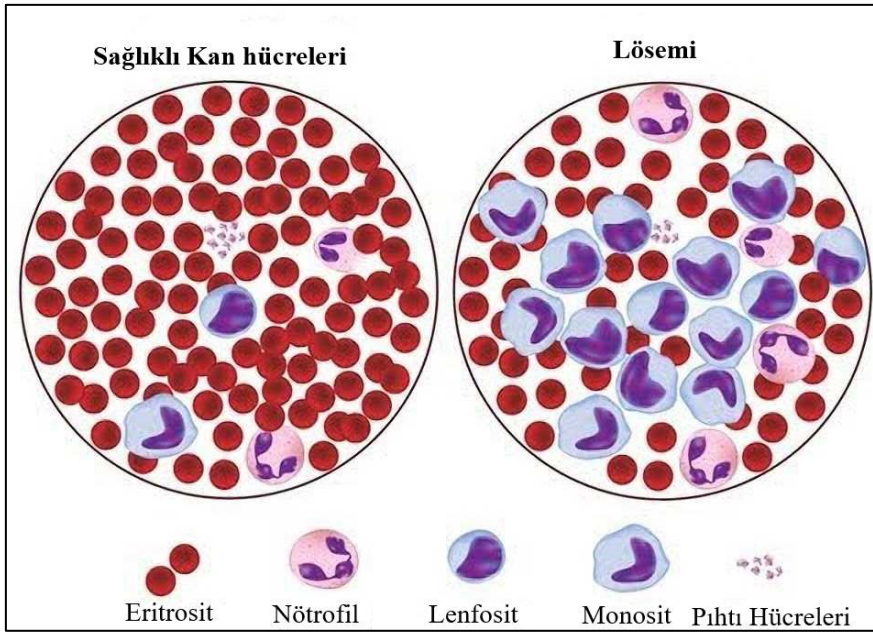
Genetik faktörler ile çevresel faktörlerin de kanser türlerinde rol oynadığı düşünülmektedir. Risk faktörleri olarak tütün ürünleri, iyonlaştırıcı radyasyon, bazı kimyasallara maruz kalma ve benzer nedenler yer almaktadır (Hutter, 2010). Dört ana tip lösemi tanımlanmıştır bunlar: akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik lenfositik lösemi (KLL) ve kronik miyeloid lösemi (KML) (Geary, 2000).

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), tek bir B veya T lenfosit progenitöründen kaynaklanan kötü huylu bir hastalıktır. Kemik iliğinde blast hücrelerinin çoğalması ve birikmesi, hematopoezin baskılanmasına ve ardından anemi, trombositopeni ve nötropeniye neden olur. Lenfoblastların ekstramedüller birikimleri çeşitli bölgelerde, özellikle meninksler, gonadlar, timus, karaciğer, dalak veya lenf düğümlerinde meydana gelebilir (Pui vd., 2014).

Akut miyeloid lösemi (AML), kök hücre bölünmesinde başarısız farklılaşma ve aşırı çoğalmanın miyeloblast adı verilen işlevsel olmayan hücrelerin birikimiyle sonuçlandığı bir grup klonal hematopoietik kök hücre bozukluğunu temsil eder (Stone vd., 2004).

Kronik lenfositik lösemi (KLL), klonal proliferasyon ve kanda, kemik iliğinde, lenf düğümlerinde ve dalakta neoplastik B lenfositlerinin birikmesi ile karakterize edilir (Rozman ve Montserrat, 1995).

Kronik miyeloid lösemi (KML) dönüştürülmüş, ilkel hematopoietik progenitör hücrelerin klonal miyeloproliferatif hücelere değişimi ile ortaya çıkmaktadır. Miyeloid, monositik, eritroid, megakaryositik, B lenfoid ve bazen T lenfoid soyları içerir (Faderl, 1999).



Şekil 2.17 Sağlıklı kan hücreleri ile lösemi hücrelerinin karşılaştırması (Ali ve Sultana, 2012)

2.4. Biyoaktif Metabolit Kaynağı Olarak Aktinomisetler

Biyoaktif metabolitler bitkiler, hayvanlar, bakteriler ve mantarlar gibi çeşitli organizmaların birincil ve ikincil metabolizmasının ürünleridir. (Demain ve Sanchez, 2009). İkinci metabolitler, farklı ve değişik kimyasal yapılarının yanı sıra çoğunlukla moleküler kütleleri düşüktür. İkincil metabolitlerin birincil metabolitlerden temel farkı ise hücrelerin yaşam döngüsünde bir işleve sahip olmamaları ve spesifik organizma gruplarını karakterize etmeleridir (Berdy, 2005).

Genetik yöntemlerle beraber yüksek verimli tarama teknikleri, bir milyondan fazla doğal bileşimin tanımlanmasına izin vermiştir. Tanımlanan bileşiklerden, 500.000 ile 600.000 ürün bitkisel kaynaklı, 50.000 ürün ise mikrobiyal kökenlidir. Yaklaşık olarak 200.000 ile 250.000 metabolitin içinden 22.500 kadarı mikroorganizmalar tarafından üretilmekte olup biyoaktivite belirtileri gösterir. Bu 22.500 metabolitin; %17'si tek hücreli bakteriler (özellikle *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp.), %38'i mantarlar, %45'i ise aktinomisetlerin fermentasyon ürünüdür. Metabolitlerin yaklaşık %75 kadarı filamentöz aktinomisetler olan *Streptomyces* cinsine ait türler tarafından üretilmektedir (Solecka vd., 2012).

Günümüzde kullanılan metabolitlerin neredeyse hepsi, mikrobiyal fermentasyon süreçlerinin bir ürünü veya kimyasal modifikasyonlarıdır (Donadio vd., 2002). *Streptomyces* cinsinin fermentasyon ürünlerinden olan antibiyotikler ve diğer endüstriyel bileşikler mikrobiyal ürünler arasında en zengin kaynak olarak gösterilmektedir (Ruiz vd., 2010). Antimikrobiyal aktiviteye sahip örnekler arasında; β -laktamlar, tetrasiklinler, aminoglikozitler, glikopeptitler, aminosiklitoller, linkozamitler, glikolipopeptitler, streptograminler, ansamisinler, kloramfenikoller, fenilpropanoidler bulunur (Singh ve Greenstein, 2000).

Streptomyces clavuligerus, başta β -laktamazların inhibitörü olan klavulanik asit olmak üzere penisilin N, sefamisin C ve holomisin üretir. Sefamisin C üreten aktinomiset suşları (*S. jumonjinensis*, *S. katsurahamanus* ve *S. clavuligerus* gibi) aynı zamanda klavulanik asit de üretmektedir (Solecka vd., 2012). Waksman (1944) tarafından *Streptomyces griseus* kültüründe bir aminoglikozid antibiyotik olan streptomisin keşfedilmiş olup bu bileşik gram negatif bakterilere karşı yüksek aktivite göstermektedir (Schatz vd., 1944). *Micromonospora echinospora* ve *Micromonospora purpurea*'nın fermentasyonu ile glikopeptit antibiyotiklerinin çoğu *Streptomyces* türleri tarafından üretilir. Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir antibiotik olan gentamisin üretilir. *S. kanamyceticus* tarafından kanamisin A, B ve C; *Streptomyces tenebrarius* tarafından esas olarak tobramisin karbamat, kanamisin B karbamat ve apramisin gibi aminoglikozid antibiyotik kompleksi; *Streptomyces fradiae* ise neomisin üretir (Solecka vd., 2012). Vankomisin *Amycolatopsis*

orientalis'in bir fermentasyon ürünü iken, teikoplanin (Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal), *Actinoplanes teichomyceticus* tarafından üretilir (Parenti vd., 1978). Polioksinler genellikle *Streptomyces cacaoivar*'ın ikincil metabolitleri olup; nikkomisiner ise *Streptomyces tendae* ve *Streptomyces ansochromogenes* tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir (Kimura ve Bugg, 2003).

Sıralanan örneklerden anlaşılacağı gibi aktinomisetlerin birçok farklı antibakteriyal ve antifungal özelliklere sahip ikincil metabolitlerin üreticisi olduğu görülmektedir. Aktinomisetlerin ürettikleri bu ikincil metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteleri dışında antioksidan, antikanser ve UV koruyucu özellikleri de bulunmakta olup, ayrıntılı bilgi ilgili alt başlıklarda sunulacaktır.

2.4.1. Aktinomisetlerin antioksidan özellikleri

Son yıllarda, serbest oksijen radikallerinin çeşitli hastalıklardaki önemli rolü, terapötik kullanıma sahip olan mikroorganizmalardan yeni ve güçlü antioksidan bileşiklerin araştırılmasına yol açmıştır (Kekuda vd., 2010). Doğal ürün bazlı ilaçlarda temel bir bileşeni metabolize eden aktinomisetlere yönelik arayışın giderek arttığı görülmektedir (Janardhan vd., 2014). Aktinomisetlerin antimikrobiyal metabolitlerinin aynı zamanda antioksidan etkiye sahip olduğu bilinmekle birlikte, bugüne kadar dihidroherbimisin A, propanoik asit, 2-aliloksifenol ve fenazinler ve saccharomonopyrone A gibi çeşitli aktinobakteri kökenli antioksidanlar tanımlanmıştır (Mohammadipanah ve Momenilandi, 2018).

Yapılan bir çalışma neticesinde antibakteriyal bir antibiotik olan karazostatin ve karbazomisin B olarak isimlendirilmiş olan bileşikler, α -tokoferolden *ex vivo* ve *in vitro* çalışmalarda daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (Kato, 1994). Başka bir çalışmada ise *Streptomyces prunicolor* tarafından izole edilen yeni metabolitler olan bentosiyaninler (A, B, C) ve bentofoenin sıçan karaciğer mikrozomlarında E vitamini ile karşılaştırılabilir antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. Farklı bir tarama çalışmasında ise üç farklı farmasötik bitkiden izole edilen 150 endofitik aktinomisetin %10,7'si antioksidan aktivite göstermiştir (Wu vd., 2019). *Streptomyces* sp VITNSJ2 suşunun aktif metabolitleri ile gerçekleştirilen DPPH çalışması sonucunda 5 mg/ml konsantrasyonda

maksimum inhibisyon %90,7 olarak bulunmuştur (Naine vd., 2012). *Streptomyces lincolnensis* M-20 suşundan izole edilen bioaktif metabolit protokatechualdehitin DPPH süpürücü aktivite yönteminden elde edilen IC₅₀ değeri 0,2 mM olarak bulunmuştur. *Streptomyces* sp. PA9 suşunun aktif metabolitlerinin % süpürücü aktivitesi %72 olarak bulunmuştur (Sivarajan vd., 2019). Başka bir çalışmada ise *Streptomyces* sp. VITTK suşu ile yapılan bir çalışmada hücre içi ve dışı metabolitlerin 5 mg/ml konsantrasyondaki süpürücü aktiviteleri %22 ve %96 olarak belirlenirken C vitaminin aynı konsantrasyonda aktivitesi %97 olarak bulunmuştur (Kannabiran, 2012). Sunulan diğer makalelerde *Streptomyces* VITSKVK5 izolatının antioksidan aktivitesi %50,1 (Saurav ve Kannabiran, 2012), *Streptomyces lincolnensis* M-20 izolatının 0,5 mM konsantrasyonda aktivitesi %80 (Kim vd., 2008), *Nocardopsis gilva* YIM 90087 izolatından elde edilen p-terfenilinin 2 mg/ml konsantrasyonda aktivitesi %54,9 (Tian vd., 2013), AC23 suşunun aktif metabolitlerinin 20 mg/ml'de % inhibisyonu 60 (Subathra vd., 2013), *Streptomyces coelicoflavus*'un beş farklı suşu ile yapılan çalışmada 20 µg/ml konsantrasyonda % inhibisyonları 68,91 ile 46,41 değerleri arasında (Rao ve Rao, 2013), MJM 10778 suşunun IC₅₀ değeri 20 ng (Lee vd., 2014), *Streptomyces gancidius* VITSD1'in 5 mg/ml'deki % inhibisyonu 65 (Duraikannu vd., 2014) olarak bulunmuştur.

Sunulan örneklerden de görüldüğü üzere DPPH radikal süpürücü aktivite farklı araştırma grupları tarafından gerçekleştirilen tarama çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir yöntem olmuştur.

2.4.2. Aktinomisetlerin UV koruyucu özellikleri

Ökaryotik hücrelerin genomları ultraviyole (UV) radyasyon, iyonlaştırıcı radyasyon ve genotoksik kimyasallar gibi genomun dışarıdan ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarlar gibi içeriden tehdit altındadır. Öte yandan, iyonlaştırıcı radyasyon, UV ışığı gibi DNA'ya zarar veren ajanlar kanser gibi yaygın hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Houtgraaf vd., 2006). Özellikle tedavi amacı ile kullanılan UV ışınlarının etkisinin azaltılması veya yok edilmesi amacı mikroorganizmaların UV ışınlarına karşı hücreleri koruyuculukları sorgulanmaya başlamıştır.

Streptomyces sp. MUM273b suşu ile insan keratinositleri (HaCaT) hücre hattında yapılan UV radyasyona karşı koruma çalışmasında, MUM273b izolatına ait ekstraktın 1, 2 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda UVB'nin neden olduğu keratinosit hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Tan vd., 2019). *Streptomyces* sp. JS520 suşundan izole edilen undesil prodigiozin (kırmızı) pigmentinin araştırılan UV koruyucu aktivitesinde, pigment içermeyen deney grubunda herhangi bir koruyuculuk olmazken; saf pigment eklenen hücreler ve pigmenti üreten hücrelerin UV koruyucu aktiviteleri sırasıyla %8 ve %22 olarak bulunmuştur (Stankovic vd., 2012). *Streptomyces* cinsine ait bir suştan izole edilen melanin pigmentinin MA olarak tespit edilen bileşeni ile *Bacillus thuringiensis* hücrelerinin UV ışığına maruz kaldığında canlılıkları sorgulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda MA bileşeni deney grubuna eklendiğinde veya eklenmediğinde UV ışınlama süresinin uzaması ile *Bacillus thuringiensis*'in hayatta kalma oranı azalmıştır (Li vd., 2018). *Streptomyces* sp. WMA-LM31 suşu ile yapılan bir başka UV koruyucu aktiviteyi belirleme çalışmasında, 2000 Jm⁻² UV dozunda WMA-LM31 suşu maksimum canlılık göstermiş olup, elde edilen verilere göre *E.coli* ile aynı dozlarda başarılı sonuç elde edilememiştir (Sajjad vd., 2018).

Literatürde bitki (Travasrou vd., 2019; Sun ve Tang, 2011; Seok vd., 2016) ve liken (Radice vd., 2016; Rancan vd., 2012; Nybakken vd., 2004) gibi farklı canlı türlerinin UV koruyucu aktivitesinin konu alındığı çok sayıda rapor sunulmasına karşın, aktinomisetlerin araştırıldığı makaleler kısıtlı görülmektedir.

2.4.3. Aktinomisetlerin sitotoksik özellikleri

Kanser, günümüzde en ciddi insan sağlığı sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Kanser tedavisi için kullanılan terapötik yöntemler cerrahi, radyoterapi, immünoterapi ve kemoterapidir (Gillet vd., 2007). Aktinomisetler, antibiyotikler, enzimler ve enzim inhibitörleri gibi çeşitli klinik etkilere sahip yeni biyoaktif bileşikler için en önemli kaynaklardan birisidir (Vijayakumar vd., 2007).

Onaylanmış ilaçların %60'ından fazlası doğal bileşiklerden elde edilir (Raja vd., 2010). Bu doğal bileşiklerin %50 kadarı aktinomisetler tarafından üretilir ve bu bileşiklerin antifungal, antibakteriyel ve antikanser aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Ravikumar

vd., 2010). Aktinomisetlerin ürettiği metabolitlerin, doğal bileşiklerin içindeki yeri düşünüldüğü zaman sitotoksik aktivitenin belirlendiği birçok çalışmaya konu olmuştur. Örneğin; aktinomiset suşu olan Y-09194L ile L1210 (Lenfosit lösemi) ve P388 (fare lösemisi) hücre hatlarında yapılan sitotoksik aktivite çalışması sonucunda IC₅₀ değerleri sırası ile 0,0427 ve 0,0140 µg/ml olarak bulunmuştur (Suzuki vd., 1991). *Streptomyces spectabilis* türünün SNF4435C ve D suşları ile yapılan başka bir çalışmada ise KB, K562, HL-60 ve fare hepatositi hücre hatlarında yapılan çalışma neticesinde IC₅₀ değerleri SNF4435C suşu için sırası ile 40, 45, 40, 10 mM iken, SNF4435D suşunda 45, 50, 40, 10 mM olarak bulunmuştur (Kurosawa vd., 2001). *Streptomyces* sp. KORDI-3238 suşundan izole edilen streptokordin metabolitinin MDA-MB-231, HCT 15, Pc-3, NCI-H23, ACHIN, LOX-IMVI ve K562 hücre hatlarında yapılan sitotoksikite çalışması sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri sırası ile 7,5, 7,8, 3,2, 3,5, 4,7, 7,4 ve 8,6 µg/ml olarak bulunmuştur (Jeong vd., 2006). *Streptomyces* VITSVK5 izolatında Vero, HEP-2 ve HEP-G2 hücre hatlarında yapılan çalışmada IC₅₀ değerleri sırasıyla 22,6, 2,8 ve 8,3 µg/ml olarak bulunmuştur (Saurav ve Kannabiran, 2012). Hep-G2 ve HeLa hücre hatlarında yapılan bir çalışmada ise *Streptomyces minutiscleroticus* M10A62 nolu izolatu kullanılarak sitotoksik aktivite çalışılmış ve elde edilen % inhibisyonları Hela hücresinde (50 µg/ml) %99,5 iken Hep-G2 hücre hattında (50 µg/ml) %100 olarak bulunmuştur (Ramya vd., 2015). Actinomycetes EGY2 ve EGY39 nolu izolatlarının MDA-MB-231 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri 19.50±0,03 ve 39.6±0,43 µg/ml olarak bulunmuştur (Abdelfattah vd., 2016). Selim ve diğerleri (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *Streptomyces carpaticus*'un hücre dışı polisakkaridlerinin (A, B, C, D nolu) MCF-7 ve HCT-116 hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi belirlenmiştir. Sonuç olarak sırasıyla A metaboliti %38,9 ve 36,0, B metaboliti %37,3 ve 41,6, C metaboliti %51,7 ve 59,1 ve D metaboliti için %28,9 ve 30,3 olarak sitotoksik aktivite belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. GMY01 nolu suşun MCF-7 hücre hattındaki sitotoksikitesi araştırılmış ve elde edilen IC₅₀ değeri 85,73 µg/ml olarak bulunmuştur (Werdyani vd., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Mikroorganizmalar ve hücre hatları

3.1.1.1. Aktinomiset izolatları

Çalışmada ekstrem koşullardan izole edilen ya da farklı araştırcılar tarafından çalışmada kullanılmak üzere sunulan toplam 319 adet aktinomiset izolatu kullanılmıştır. Kullanılan aktinomiset izolatlarına ait veriler Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları

Sıra No	- Lokalite	Kod/Kaynak	İzolat Kodu	Lokalite/İzolat Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
1 ^a	Yeniçağ – Bolu	Prof. Dr. Nevzat Şahin (19 Mayıs Üniversitesi)	YC 925, MTSP31, YC 408, GC 716, GC 330, YC 710, YC 114	Sediment	7
2	Tatvan – Bitlis		31NTSP, SPNT21	Kıyı toprağı	2
3	Merkez – Bolu		GTA35		1
4	Karapınar – Konya		C39AT		1
5	Karapınar – Konya		MTSC22		1
6	Merkez – Manisa	Prof. Dr. Mustafa Oskay (Manisa Celal Bayar Üniversitesi)	SHB17_30	Ilımlı halofil (%7 NaCl) ve termofil (45 °C), antibakteriyal aktivite (Spil Dağı gözlem kulesi yakını - 38°34'08.0"N-27°27'18.5"E)	1
			MA1	Plastik degradasyonunda önemli, Alkanotrofik (Saruhan Mahallesi - 38°36'41.5"N-27°25'44.9"E)	1
			SHB17_28	2100 m bitki rizosferinden izole (Spil Dağı zirve - 38°34'02.7"N-27°27'15.7"E)	1
7	Soma – Manisa		SHB17_83	Antifungal aktivite, pH:9 ve 50 °C'de büyüebilme (Kocasivri Tepesi - 39°15'41.4"N-27°43'20.2"E)	1
8	Çiğli – İzmir		SHB_27	Ilımlı halofil (%7 NaCl) ve termofil (45 °C), antibakteriyal aktivite (İzmir Doğal Yaşam Parkı - 38°29'30.4"N-26°57'49.2"E)	1

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları (devam)

Sıra No	Lokalite	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	Lokalite/İzolat Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
8	Çiğli – İzmir	Prof. Dr. Mustafa Oskay (Manisa Celal Bayar Üniversitesi)	SHB_30	Alkolofilik, pektinaz aktivite (İzmir Doğal Yaşam Parkı - 38°29'30.4"N-26°57'49.2"E)	1
9 ^b	İnönü – Eskişehir	1.2.	105	Çimento Fabrikası (Fabrikadan 100 metre)	1
		1.3.	109	Çimento Fabrikası (Fabrikadan 150 metre)	1
		1.4.	111, 112, 113, 114	Çimento Fabrikası (Hammadde (Klinker))	4
10	Karaçam Köyü (Sivrihisar – Eskişehir)	2.1.	216, 217	Nikel –Demir Ocağı (Ocak)	2
		2.3.	211	Nikel –Demir Ocağı (Etek – Yüzey)	1
		2.4.	206, 208	Nikel –Demir Ocağı (Yol)	2
		2.5.	201, 202, 224, 227, 230	Nikel –Demir Ocağı (Köy)	5
			271		1
11	Muratdere Köyü (Bozüyük – Bilecik)	4.1.	411, 412, 418	Bakır Ocağı	3
		4.2.	421, 422		2
12	Mayıslar Köyü (Sarıcakaya – Eskişehir)	6.1.	603	Krom Ocağı (Ayıöldü Deresi, Silisli toprak yüzeyi)	1
		6.2.	609, 610, 613	Krom Ocağı (Silisli ve limonitli toprak)	3
		6.4.	622, 624, 625, 628	Krom Ocağı (MTA 6 no' lu Sondaj Bölgesi, Polimetal)	4
		6.5.	632	Krom Ocağı (MTA 6 no' lu Sondaj Bölgesi, Krom)	1
		6.6.	633	Krom Ocağı (Ayıöldü Deresi, Sülfürlü bozulmuş kayacı)	1

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları (devam)

Sıra No	Lokalite	Kod ve Kaynak	İzolot Kodu	Lokalite/İzolot Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
13	Karadeniz Bakır İşletmeleri (Küre – Kastamonu)	7.1.	701, 702, 705, 706	Bakır Ocağı (Bakibaba Ocağı, Limonitli toprak)	4
		7.2.	708, 709, 712, 713, 714	Bakır Ocağı (Bakibaba Ocağı, Limonitli toprak)	5
		7.3.	715, 717, 718, 722	Bakır Ocağı (Aşıköy Ocağı)	4
		7.4.	723	Bakır Ocağı (Aşıköy Ocağı)	1
		7.5.	725, 727, 728, 729, 733	Bakır Ocağı (Curuf - Polimetal bölgesi)	5
14	Balya Kurşun Ocağı (Balıkesir)	10.2.	1006	Kurşun Ocağı (Ocak atık alanı (dip bölgesi))	1
		10.3.	1003	Kurşun Ocağı (Ocak atık alanı (Curuf))	1
		10.5.	1002, 1004	Kurşun Ocağı (Çökeltme havuzu)	2
15	Uluabat Gölü (Mustafa Kemal Paşa – Bursa)	12.1.	1202, 1206, 1210, 1211	Uluabat Gölü (6. İstasyon)	4
		12.2.	1213, 1214, 1220	Uluabat Gölü (8. İstasyon)	3
		12.4.	1231	Uluabat Gölü (12. İstasyon)	1
16	Düzkır Mağarası (Aladağlar – Niğde)	C - 1	C1-1, C1-2, C1-8, C1-9, C1-12, C2-1	Düzkır mağarası (1. İstasyon)	6
		C - 2	C2-2, C2-4	Düzkır mağarası (2. İstasyon)	2
		C - 3	C3-1, C3-3, C3-4, C3-5, C3-10	Düzkır mağarası (3. İstasyon)	5
		C - 4	C4-2, C4-3, C4-4, C4-5 C4-6, C4-7, C4-9, C4-11, C4-12, C4-13	Düzkır mağarası (4. İstasyon)	10

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları (devam)

Sıra No	Lokalite	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	Lokalite/İzolat Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
16	Düzkır Mağarası (Aladağlar – Niğde)	C - 5	C5-1, C5-2, C5-6, C5-7, C5-11, C5-12, C5-14, C5-15	Düzkır mağarası (5. İstasyon)	8
		C - 6	C6-1, C6-3, C6-5, C6-6, C6-8, C6-9, C6-10, C6-12, C6-14	Düzkır mağarası (6. İstasyon)	9
		C - 7	C7-1, C7-2, C7-5, C7-7	Düzkır mağarası (7. İstasyon)	4
17	Cinbar Vadisi (Aladağlar – Niğde)	D - 1	D1-1, D1-2	Cinbar vadisi (1. İstasyon)	2
		D - 4	D4-1, D4-2, D4-3	Cinbar vadisi (4. İstasyon)	3
		D - 5	D5-5	Cinbar vadisi (5. İstasyon)	1
18	Dim Mağarası (Alanya – Antalya)	1.3.	107	Oluşum	1
		1.5.	118		1
19	Yalan Dünya Mağarası (Alanya – Antalya)	2.1.	201	Oluşum	1
20	Mayıslar Mağarası (Sarıcakaya – Eskişehir)	3.5.	313, 324	Kum çarşak – yüzey	2
21	Sorkun Mağarası (Mihalıççık-Eskişehir)	5.2.	502, 503	Toprak (– 368 m)	2
		5.3.	510, 518, 525	Oluşum (– 368 m)	3

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları (devam)

Sıra No	Lokalite	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	Lokalite/İzolat Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
22	Tilkiler Mağarası (Antalya)	6.1.	602, 613		2
23	Tozman Mağarası (Sarıcakaya – Eskişehir)	7.1.	706	Oluşum	1
		7.3.	711, 712, 715		3
		7.4.	718, 720		2
24	Mencilis Mağarası (Safranbolu – Karabük)	8.4.	816, 817	Oluşum	2
		8.5.	819		1
		8.6.	824, 825	Toprak	2
25	Sipahiler Mağarası (Amasra – Bartın)	9.7.	910	Toprak	1
26	Oylat Mağarası (İnönü – Bursa)	10.1.	1002	Toprak	1
27	Peynirkuyu Mağarası (Manyas – Balıkesir)	11.3	1106, 1109	Toprak	2
		11.4.	1112	Oluşum	1
		11.5.	1115, 1117		2
		11.6.	1126		1
28	Mürüvvetler Mağarası (Manyas – Balıkesir)	12.1.	1202	Toprak	1
		12.3.	1206, 1208, 1209		3
		12.4.	1210, 1211		2
		12.6.	1215, 1231	Oluşum	2
		12.8.	1220, 1221	Oluşum	2

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları (devam)

Sıra No	Lokalite	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	Lokalite/İzolat Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
28	Mürüvvetler Mağarası (Manyas – Balıkesir)	13.2.	1306	Oluşum (Suçıkan)	1
		13.4.	1314, 1315	Toprak (Suçıkan)	2
29	Ayvacık Düdeni (Ödemiş – İzmir)	14.1.	1403	Toprak	1
		14.2.	1431, 1446		2
		14.5.	1470, 1473		2
		14.6.	1482		1
		14.7.	1496		1
30	Hacı Hüsrev Mağarası (İnönü – Eskişehir)	15.2.	1504	Oluşum	1
		15.4.	1509	Toprak	1
31	Demirözü Mağarası (Haymana – Ankara)	16.1.	1601	Oluşum	1
		16.3.	1606		1
		16.6.	1613		1
		16.7.	1615		1
32	Bahçecik Mağarası (Merkez – Bilecik)	17.3.	1707	Oluşum	1
		17.4.	1708		1
33	Ayvaini Mağarası (Mustafa Kemal Paşa – Bursa)	18.5.	1812, 1814	Oluşum	2
34	Balatini Mağarası (Beyşehir – Konya)	19.2.	1907	Oluşum	1
		19.3.	1908, 1910		2
		19.4.	1913, 1917, 1918		3

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları (devam)

Sıra No	Lokalite	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	Lokalite/İzolat Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
34	Balatini Mağarası (Beyşehir – Konya)	19.7.	1923	Oluşum	1
		19.10.	1932		1
		19.11.	1934		1
35 ^c	Morca Düdeni (Gazipaşa-Antalya) ^c	1	101i, 102i, 103i, 104i, 105i, 106i, 107i, 108i, 151i	-550 metre	9
		2	201i, 202i, 203i, 205i, 206i, 207i, 208i, 209i, 210i, 212i, 213i, 214i, 215i, 250i, 251i, 252i, 254i	-170 metre	17
		3	402i, 403i, 404i, 451i	-100 metre (1. Galeri)	4
36	Aspendos (Serik-Antalya)	1	1101, 1102, 1103, 1404, 1405, 1701, 1702, 1703, 1901	Domus, 1, N 37 cm	9
		2	2901, 2904	Domus, 2, N 79 cm	2
		3	3100, 3103, 3104, 3107, 3109, 3110, 3111, 3112, 3114, 3115, 3402, 3901, 3902, 3903, 3906	Domus, 3, N 111 cm	15
		4	4103, 4104, 4105, 4401, 4403, 4404, 4702, 4901, 4902, 4903	Domus, 4, N 134 cm	10

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan aktinomiset izolatları (devam)

Sıra No	Lokalite	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	Lokalite/İzolat Özelliği	Toplam İzolat Sayısı
36	Aspendos (Serik-Antalya)	5	5100, 5400, 5701, 5901, 5902, 5903	Domus, 5, N 163 cm	6
		6	6102, 6103	Domus, 6, N 189 cm	2
		7	7101, 7400, 7701, 7702, 7703, 7704, 7902, 7905, 7906, 7907, 7908	NYM 7, Çeşme, Layer 3, Depozit 53	10
		8	8101, 8400, 8700, 8701, 8903	NYM 7, Çeşme, Layer 3, Depozit 53	5
		9	9101, 9104, 9105, 9902, 9903	NYM 8, Çeşme, Layer 3	5
		10	10100, 10400, 10701, 10903	NYM 8, Çeşme Alanı, Layer 3	4
		11	11100, 11104, 11105, 11106, 11403, 11701, 11901, 11904, 11906, 11907, 11908	DSS-S1, Sarnıç, 1, Depozit 3	11
		12	12103, 12106, 12700, 12701, 12702, 12906	DSS-S1, Sarnıç, 1, Depozit 3, Seramik Alt	6

a: 1-8 nolu lokalitelerden farklı araştırma kurumlarında görev alan araştırmacılar tarafından izole edilen ve bu çalışmada kullanılmak üzere sunulan izolatlar

b: 9-35 nolu lokalitelerden laboratuvar ekibinde yer alan farklı araştırmacılar tarafından önceki çalışmalar kapsamında izole edilerek Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fungikültür Laboratuvarında korunan izolatlar

c: 36 ve 37 nolu lokalitelerden bu çalışma kapsamında izole edilen izolatlar

3.1.1.2. Test mikroorganizmaları

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında test mikroorganizması olarak 6 bakteri ve 3 maya standart suşu kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, (standart antibiyotik disklerin yanı sıra) antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinen 3 tip tür kullanılmıştır. Test mikroorganizmaları ve tip türler Çizelge 3.2’de ifade edilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları ve tip türler

Mikroorganizmalar		Suş adı	Suş no ^a
Test Mikroorganizmaları	Gram (+) Bakteri	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
		<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B-744
		<i>Micrococcus luteus</i>	NRRL 1018
	Gram (-) Bakteri	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
		<i>Salmonella typhimurium</i>	NRRL B-4420
		<i>Serratia marcescens</i>	NRRL B 2544
	Maya	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803
		<i>Candida albicans</i>	ATCC 60193
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NRRL Y-12632
Tip türler	Aktinomiset	<i>Streptomyces venezuelae</i>	NRRL ISP 5230
		<i>Streptomyces rimosus</i>	NRRL ISP 5260
		<i>Streptomyces violaceolatus</i>	NRRL ISP 5438

^a ATCC: American Type Culture Collection, NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection

3.1.2. Hücre hatları

Çalışmada kullanılan, K562 kronik myeloid lösemi hücre hattı (ATCC kodu: CCL-243), HL-60 insan akut promiyelositik lösemi hücre hattı (ATCC kodu: CCL-240) ve THP-1 akut monositik lösemi hattı (ATCC kodu: TIB-2) ATCC’den temin edilmiştir.

K562 hücre hattı ilk kez insandan ölümsüzleştirilmiş miyelojenöz lösemi hattıdır. K562 hücreleri eritro lösemi tipinde hücreler olup, 53 yaşındaki bir miyelojenöz lösemi hastası kadından üretilmiştir (Lozzio ve Lozzio, 1975). Hücreler süspanse hücre olup yuvarlaktır ve yapışmazlar. Bcr: Abl füzyon geni için pozitifdir ve hem farklılaşmamış

granüositlere (Klein vd., 1976) hem de eritrositlere (Andersson vd., 1979) proteomik benzerlik gösterir.

HL-60 hücre hattı lösemi hastalığının başlarında olan 36 yaşındaki bir kadından izole edilip üretilmiştir ve nötrofilik promiyelositik morfoloji gösterirler (Gallagher vd., 1979). Bu hücrelerin çoğalmak için trasferrin ve insülin resöptörlerinin aracılığına ihtiyaç duyar. Bu bileşiklerden herhangi birinin ortamdan çıkarılması sonucunda proliferasyon hemen durur (Breitman vd., 1980). 1,25-dihidroksivitamin D3, 12-O tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) ve GM-CSF gibi diğer bileşikler, HL-60'ı sırasıyla monositik, makrofaj benzeri ve eozinofil fenotiplere farklılaşmaya teşvik edebilir. Yuvarlak ve süspanse hücre olan HL-60 hücreleri, miyeloid farklılaşmasının moleküler olaylarını ve bu süreç üzerindeki fizyolojik ve farmakolojik elementlerin etkilerini incelemek için sürekli bir insan hücresi kaynağı sağlar (Ratanachoo vd., 2002).

THP-1 hücre hattı akut monositik lösemi hastasından türetilen bir insan monositik hücre hattıdır ve protein-protein etkileşimlerinin immüno sitokimyasal analizinde ve immüno histokimyada lösemi hücre hatlarını test etmek için kullanılır. THP-1 hücreleri büyük, yuvarlak ve tek hücreli bir morfoloji sergilerler (Tsuchiya vd., 1980). Bu hücre hattı akut monositik lösemili 1 yaşındaki bir erkek çocuğun kanından elde edilmiştir (Matsuo vd., 1997).

3.1.3. Besiyerleri

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan RPMI-1640 Medium dışında tüm besiyerleri 1,2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta ve 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. RPMI-1640 Medium hücre kültürü şartlarına uygun olarak steril edilmiş olarak temin edilmektedir.

Yeast extract – Malt extract Agar (ISP2) (Shirling ve Gottlieb, 1996)

Yeast extract	4.00	g
Malt extract	10.00	g
Glukoz	4.00	g
Agar	10.00	g

Distile su	1000 ml
pH:	7.3

Çalışmada, aktinomiset izolatlarının aktiflenmesinde ve izolasyonunda kullanılmıştır. Sterilizasyondan sonra 50 şer µg/ml sikloheksimid ve nistatin içerecek biçimde antibiyotik ilave edilen ortam (Williams ve Cross, 1971; Goodfellow ve Williams, 1983; Mc Carthy ve Williams, 1990), aktinomisetlerin topraktan izolasyonunda (Huck et al., 1991) üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Nişasta Kazein Agar

Çözünür nişasta	10.00 g
Vitamin free casein (Difco)	0.30 g
KNO ₃	2.00 g
NaCl	2.00 g
K ₂ HPO ₄	2.00 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.05 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0.01 g
CaCO ₃	0.02 g
Agar	18.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Bu besiyeri çalışmada aktiveleme (Sowndhararajan ve Kang, 2013; Rao ve Rao, 2013) ve izolasyon (Subathra vd., 2013; Ramya vd., 2015) olmak üzere iki farklı amaç için kullanılmıştır. Her iki amaç doğrultusunda da besiyeri içeriğinde bulunan K₂HPO₄ diğer maddelerden bağımsız olarak otoklavlanarak, steril edildikten sonra besiyerine eklenmiştir.

Sterilizasyondan sonra 50 şer µg/ml sikloheksimid ve nistatin içerecek biçimde antibiyotik ilave edilen ortam (Williams ve Cross, 1971; Goodfellow ve Williams, 1983; Mc Carthy ve Williams, 1990), aktinomisetlerin topraktan izolasyonunda üreme ortamı olarak kullanılmıştır (Küster ve Williams, 1964).

Tryptone Yeast Extract Agar (ISP1)

Trypton	5.00 g
Yeast extract	3.00 g
Agar	20.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 – 7.2

Aktinomiset izolatlarının aktiflenmesinde kullanılmıştır.

Soya Unu Mannitol Agar

Soya unu	20.00 g
Mannitol	20.00 g
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	8.0 – 8.5

Çalışmada hem aktifleme besiyeri olarak hem de izolasyon besiyeri olarak kullanılmıştır. Aktinomisetlerin topraktan izolasyonu için steril edilmiş besiyeri ortamına 50'şer µg/ml olacak şekilde sikloheksimid ve nistatin eklenmiştir.

Raffinose Histidine Agar (Selvin, 2004)

Raffinose	5.00 g
Histidine	1.00 g
K ₂ HPO ₄ . H ₂ O	1.00 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.50 g
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2 – 7.4

Sucul ortamlardan izole edilmiş aktinomiset izolatlarının aktiflenmesinde ve izolasyonunda kullanılmıştır. Steril edilen besiyerinin içine 50'şer µg/ml sikloheksimid ve nistatin ilave edilmiştir.

Minimal Agar

Glukoz	0.50	g
Yeast extract	0.50	g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.50	g
NaCl	0.50	g
K ₂ HPO ₄	1.00	g
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.5 – 8.0	

Minimal agar, aktinomiset izolatlarının aktiflenmesinde ve izolasyonunda kullanılmıştır. İzolasyon aşamasında steril edilen besiyerinin içine 50'şer µg/ml sikloheksimid ve nistatin ilave edilmiştir.

N-Z Amine Agar (Rosi vd., 1981)

Glukoz	10.00	g
Çözülebilir nişasta	20.00	g
Yeast extract	5.00	g
Pepton from casein	5.00	g
CaCO ₃	1.00	g
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.2	

Çalışmada, aktinomiset izolatlarının aktiflenmesinde kullanılmıştır.

Gliserol Asparagin Agar (ISP5)

L-Asparagin	1.00	g
Gliserol	10.00	g
K ₂ HPO ₄	1.00	g
Shirling and Gottlieb iz element çözeltisi*	1	ml
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.0 – 7.4	

*İz elementi çözeltisi (Shirling ve Gottlieb, 1996)

FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0.10	g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0.10	g
ZnSO ₂ . 7 H ₂ O	0.10	g
Distile su	100	ml

Çalışmada, aktifleme besiyeri olarak kullanılan Gliserol Asparagin Agar, iz elementi çözeltisi eklendikten sonra steril edilmiştir.

Müller Hinton Agar (MHA)

Ticari hazır besiyerinden (Himedia) 34 g/L oranında tartılarak, 1,2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında test mikroorganizması olarak kullanılan bakterilerin üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Ticari hazır besiyerinden (Acumedia) 65 g/L oranında tartılarak, 1,2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla mayaların üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Yeast Pepton Dextrose Agar (YPDA)

Pepton from meat	20.00 g
Yeast extract	10.00 g
Glukoz	20.00 g
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml

UV koruyucu aktivite çalışmasında üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Yeast extract – Malt extract Broth (ISP2)

Yeast extract	4.00 g
Malt extract	10.00 g
Glukoz	4.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.3

Yeast extract – Malt extract Broth çalışmada fermentasyon besiyeri olarak kullanılmıştır.

Nişasta Kazein Broth

Çözünür nişasta	10.00 g
Vitamin free casein	0.30 g
KNO ₃	2.00 g
NaCl	2.00 g
K ₂ HPO ₄	2.00 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.05 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0.01 g
CaCO ₃	0.02 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Bu besiyeri çalışmada fermentasyon besiyeri olarak kullanılmıştır. Besiyeri içeriğinde bulunan K_2HPO_4 , besiyerinin içeriğinde bulunan diğer maddelerden ayrı olarak steril edildikten sonra besiyerine ilave edilmiştir.

Tryptone Yeast Extract Broth (ISP1)

Tripton	5.00 g
Yeast extract	3.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 – 7.2

Çalışmada fermentasyon besiyeri olarak kullanılmıştır.

Soya Unu Mannitol Broth

Soya unu	20.00 g
Mannitol	20.00 g
Distile su	1000 ml
pH	8.0 – 8.5

Çalışmada aktinomisetlerin fermentasyon besiyeri olarak kullanılmıştır.

Yeast Pepton Dextrose Broth (YPDB)

Pepton from meat	20.00 g
Yeast extract	10.00 g
Glukoz	20.00 g
Distile su	1000 ml

UV koruyu aktivite çalışmasında mayaların aktiflenmesi amacı ile kullanılmıştır.

Mueller Hinton Broth (MHB)

Ticari hazır besiyerinden (Himedia) 21 g/L oranında tartılarak, 1,2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında test mikroorganizması olarak kullanılan bakterileri aktiflemek için kullanılmıştır.

Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 30 g/L oranında tartılarak, 1,2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında mayaların aktifleme ortamı olarak kullanılmıştır.

RPMI-1640 – β -Mercaptoetanol Medium (Amagasaki vd., 1990)

FBS	20.0	ml
Puromycin	0.2	ml
Amphotericin B	2.0	ml
Penicilin – Streptomycin (PS)	2.0	ml
B-Mercaptaetanol	0.8	μ l
RPMI 1640	200.0	ml

Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin aktiflenmesi ve pasajlanmasında kullanılmıştır. Besiyeri içeriğindeki maddelerin üzerine selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir RPMI eklenerek 200 ml'ye tamamlanır.

3.1.4. Çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler

Çalışmalarında kullanılan cam ve metal malzemeler sterilizatörde 180°C'de 2 saat muamele edilerek steril edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan sıvı maddeler 121°C'de, 1.5 atm basınç altında 20 dakika otoklavlanarak; ısıya duyarlı diğer sıvı kimyasallar ise selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir.

Bortezomib

Konsantrasyonu 500mM olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülmüştür. Kültür mediumunda çeşitli seyreltmeler yapılarak, her çalışma kapsamında taze hazırlanmıştır.

%0,1'lik Tween 80' – Ringer Çözeltisi

Ringer tablet	1	adet
Distile su	500	ml

İzotonik bir çözelti olan ringer çözeltisi, 1 adet ringer tabletinin 500 ml distile su içerisinde çözülmesiyle elde edilmiştir. Elde edilen ringer çözeltisine %0,1'lik olacak şekilde tween 80' ilave edilmiştir.

%20'lik Gliserol Çözeltisi

20 ml gliserol, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

PBS Çözeltisi

Hücrelerin yıkanmasında kullanılmak üzere, 1 adet fosfat bakır salin tabletinin, 100 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

%20'lik β Karoten Çözeltisi

Bir ml kloroform içinde 0,2 mg β Karoten çözümlenerek hazırlanmıştır.

ABTS Cözeltisi

On ml, 7mM ABTS Reaktifi ile 176 µl, 140mM potasyum persülfat cözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

Fosfat Tamponu

Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite yönteminde kullanılmak üzere 200 mM'lık fosfat tamponu Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 tuzları ile pH'ı 6.6 olacak şekilde hazırlanmıştır.

Lipit peroksidasyon yöntemlerinde 40 mM Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 tuzları ile pH'ı 7.0 olan fosfat tamponu hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.3'te, diğer kimyasal ve cözeltiler ise Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan cihazlar

Ekipmanlar	Marka ve Model
Vortex	Velp Scientifica 2x3 / Daihan
Spektrofotometre	Shimadzu UV2450 UV-VIS Spectrophotometer
Çalkalamalı inkübatör	Invova 44 New Brunswick Scientific
Etüvler	Memmert
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Otoklav	Alp.
Cedex	Innovatis, ABD
Eliza (Mikro Plaka Okuyucu)	Biotek
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Hassas Terazi	Sartorius, Almanya
Santrifüj	Eppendorf, Almanya

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan cihazlar (devam)

Ekipmanlar	Marka ve Model
Mikro santrifüj	Hettich, Almanya
Liyofilizatör	Christ ALPHA 2-4 LD plus Velp Scientifica
Steril Kabin	Thermo Electron Corporation Hera Safe
Isıtıcı ve Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Tec D-91126 Scwabach
Mikropipetler ve Multipipetler	Nichipet EX, Japonya
Su banyosu	Nuve, Lab Companion, Kore
pH – Metre	Eutech Instruments Ion 510
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD
DNA ve RNA çalışma kabini HEPA/UV PZR	UVP, Türkiye
Light Cycler 480 Real-Time PCR System	Roche, İsviçre
xCELLingence E-plate 16	BioTek, Almanya
PZR Thermal Cycler (Gradient PZR)	Takara, Japonya

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ve çözeltiler

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	Kullanım Amacı
%0.005'lik DPPH çözeltisi Metanol	DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini
Folin Ciocalteu Reaktifi %20'lik Na ₂ CO ₃ çözeltisi Gallik Asit	Total Fenolik İçerik Tayini
2 mM FeCl ₂ 5 mM Ferrozin	Metal Şelatlayıcı Antioksidan Aktivite
ABTS K ₂ S ₂ O ₈ Etanol	ABTS Radikal Katyon Renksizleştirme Yöntemi
B Karoten Linoleik Asit Tween 80 Kloroform	B Karoten – Linoleik Asit Yöntemi
Tripan Blue	Cedex Cihazında Hücre Sayımı
Askorbik Asit BHT	Pozitif Kontrol

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ve çözeltiler (devam)

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	Kullanım Amacı
Bortezomib	MTS yönteminde Pozitif Kontrol
DMSO	Çözücü
FBS (Fetal Bovine Serum)	Besiyeri içeriğinde
%1'lik Potasyum ferrisiyanid %10'luk TCA %0,1'lik FeCl ₃ Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄	Redükleyici Güç Ölçümü ile Antioksidan Aktivite Tayini
Linoleik asit Tween 20 NaH ₂ PO ₄ . 7H ₂ O Na ₂ HPO ₄ %30'luk NH ₄ SCN %3,5'luk HCL FeCl ₂ %75'lik Etanol %20'lik TCA %0,67'lik TBA	Lipit Peroksidasyon Yöntemleri
Etil Asetat	Ekstraksiyon
Cycloheximide Nistatin	İzolasyon
Tripan Blue	Cedex Cihazında Hücre Sayımı
Askorbik Asit BHT	Pozitif Kontrol
Tripsin-EDTA 10X	Pan Biotech, Almanya
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferatin	Promega
MagNA Lyser	Roche, Almanya
MagNA Pure Compact RNA izolasyon kiti	Roche, Almanya
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche, Almanya

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Aktinomisetlerin izolasyonu, saklanması, aktiflenmesi ve inokulant hazırlanması

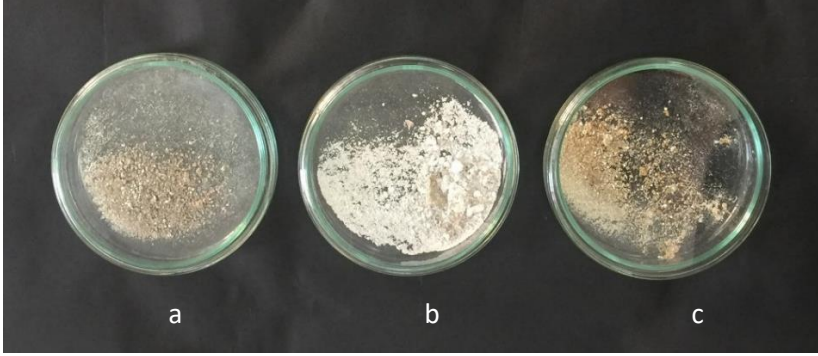
3.2.1.1. Aktinomisetlerin izolasyonu ve saklanması

Morca mağarası ve Aspendos antik kentinden farklı araştırmacılar tarafından alınan sediment/toprak örnekleri, çalışmamızda aktinomiset bakterilerin izolasyonu için kaynak olarak kullanılmak üzere laboratuvarımıza sunulmuştur. Bu bakterilerin izolasyonu için örnekleme yapılmış olan lokalitelerin isim ve bilgileri Çizelge 3.1’de görülmektedir. Çalışma kapsamında 3 sediment (Morca mağarası) ve 12 toprak örneği (Aspendos antik kenti) olmak üzere toplam 15 farklı lokalitelerden alınmış olan örnekler izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

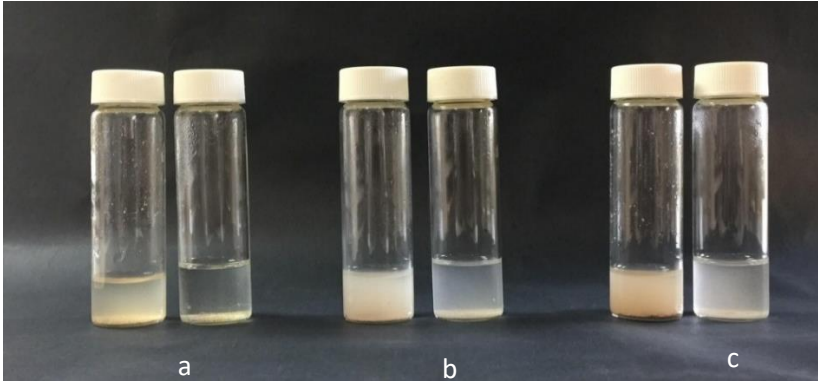
Toprak örneklerinden izolasyon çalışmaları seyreltme plaka tekniği ve direkt serpm tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tekniklerle izolasyon aşamasına geçilmeden önce, toprak örneklerinin ön işlemlerden geçirilmesinin izolasyon verimini arttırdığı verisi (Williams ve Cross, 1971; Goodfellow ve Williams, 1983) göz önüne alarak, aktinomiset sporlarının susuz ortamı tolere edebilme yeteneği ile diğer vejetatif bakterilerin sayısını düşürmek amacıyla, petrilere alınan her toprak örneğinin içine %1 gram CaCO₃ eklenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 hafta boyunca kurutulmuştur (Williams ve Cross, 1971; El-Nakeeb ve Lechevalier, 1963). Şekil 3.1’ de %1’lik CaCO₃ ve sediment karışımının olduğu petrilere sunulmaktadır.

Seyreltme plaka tekniği ile izolasyon, Crawford (1978)’un önerdiği klasik yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kurutulan toprak örneklerinden Ringer çözeltisi kullanılarak 10¹ – 10⁵ olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmış (Şekil 3.2), hazırlanan seyreltme serileri spor oluşturmeyen bakteri sayılarının düşürülmesi amacı ile 50 °C’de, 1 saat karanlık ortamda muamele edilmiştir. Uygulama süresinin sonunda her dilüsyon serisinden 1’er ml alınarak steril boş petrilere konulmuştur. Dilüsyonların eklendiği petrilere üzerine önceden steril edilmiş, 45°C’ye kadar soğutulmuş 50µg/ml sikloheksimid ve nistatin içeren 5 farklı besiyeri (ISP2, NKM, SMM, RHA, MMA) 3 paralel olacak şekilde

dökülmüştür. 27°C’de, 7 – 14 gün inkübasyon sırasında ve/veya sonrasında elde edilen aktinomiset kolonileri, saflaştırılarak uygun şekilde korunmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.1 Morca mağarasına ait sediment ve %1’lik CaCO₃ karışımı. a. -550. Metre, b. -170. Metre, c. -100. metre



Şekil 3.2 Morca Mağarasına ait sedimentlerin stok ve 10⁻¹’e ait dilüsyonları. a. -550. metre, b. -170. metre, c. -100. metre



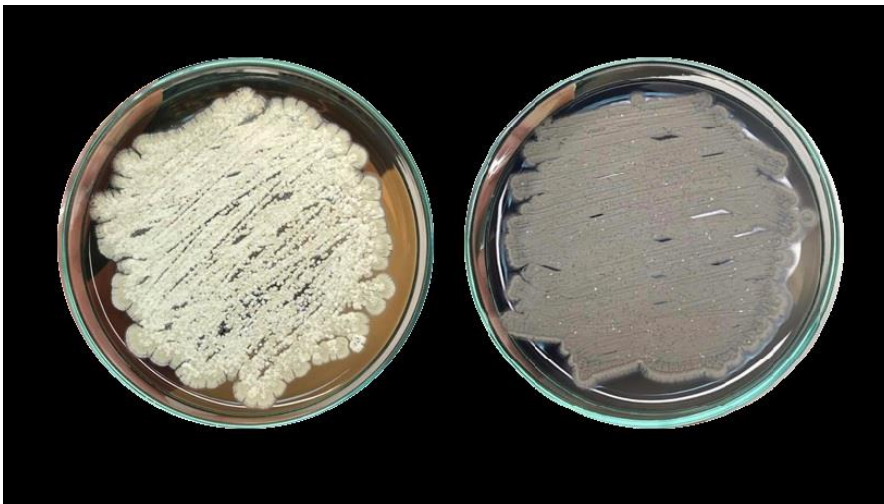
Şekil 3.3 Aktinomiset izolasyon yönteminin uygulandığı petri kapları

Direkt serpmeye yöntemi ise Williams ve Cross (1971) tarafından önerildiği şekilde uygulanmıştır. Önceden steril edilmiş, 45°C'ye kadar soğutulmuş 50µg/ml sikloheksimid ve nistatin içeren 5 farklı besiyeri (ISP2, NKM, SMM, RHA, MMA) 3 paralel olacak şekilde petrilere dökülmüştür. Bu yöntemle göre; elekten geçirilen toprak örnekleri steril spatül kullanılarak direkt olarak bu petrilere üzerine serpilmiş ve petrilere 27°C'de, 7 – 14 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında ve sonrasında gözlemlenen aktinomiset kolonileri saflaştırılmıştır.

Saflaştırma işleminden sonra izolatlar besiyeri, lokalite ve örneklem yerlerini içerecek şekilde isimlendirilmiştir (Çizelge 3.1). İzole edilen örnekler %20'lik gliserol içinde 3 paralel halinde -20°C'de cryotüplerde muhafaza edilmiştir. Başka kurumlarda görev yapan araştırmacılardan temin edilen ve kültür koleksiyonumuzda bulunan aktinomiset izolatları da aynı biçimde muhafaza edilmiştir.

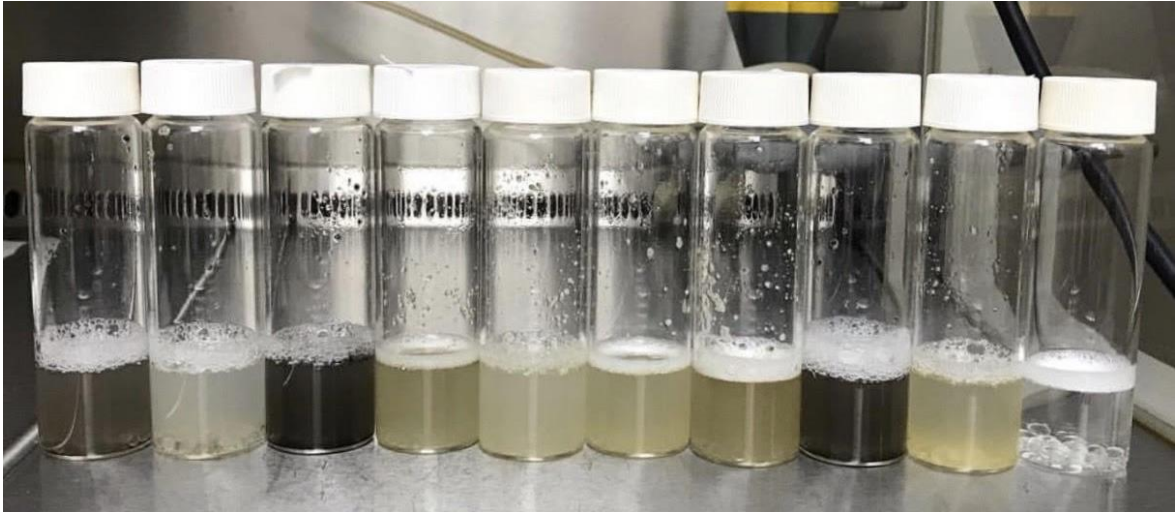
3.2.1.2. Aktinomiset izolatlarının aktiflenmesi ve inokülant hazırlanması

Muhafaza edilen aktinomiset izolatlarının aktiflenmesi için ISP1, ISP2, ISP5, NKM, SMA, RHA, MMA ve N-Z Amine Agar gibi birçok besiyeri kullanılarak uygun aktifleme ortamı belirlenmiştir. Tüm izolatlar sporlanmanın en iyi gözlemlendiği aktifleme besiyerinde karanlık ortamda, 27°C'de, 10 gün inkübe edilmiştir. İzolatların uygun aktifleme ortamındaki morfolojileri Şekil 3.4'te sunulmuştur.



Şekil 3.4 Örnek olarak seçilen iki izolatın aktifleme ortamındaki makromorfolojileri a. 3107 kodlu izolat - YEME besiyeri, b. 1117 kodlu izolat - NKM besiyeri

Uygun aktiveleme besiyerinde 10 gün inkübasyon sonunda oluşan sporlar petri yüzeylerinden steril kürdan yardımı ile toplanmıştır. Aktinomiset sporlarının izotonik bir ortamda bulunması amacı ile spor süspansiyonu Ringer çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Ayrıca aktinomiset sporlarının spor süspansiyonu içinde homojen olarak dağılması amacıyla Ringer çözeltisi içine %0,1'lik Tween 80 ilave edilmiş ve spor süspansiyonu içeren şişelerin içine 2 mm çapında cam boncuklar atılmıştır. Hazırlanan tüm spor süspansiyonları vorteks yardımıyla karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve bu yolla inokülant elde edilmiştir. İnokülant olarak kullanılan spor süspansiyolarına ilişkin temsilci bir görüntü Şekil 3.5' de sunulmuştur.



Şekil 3.5 İnokülant olarak kullanılan aktinomiset spor süspansiyonları

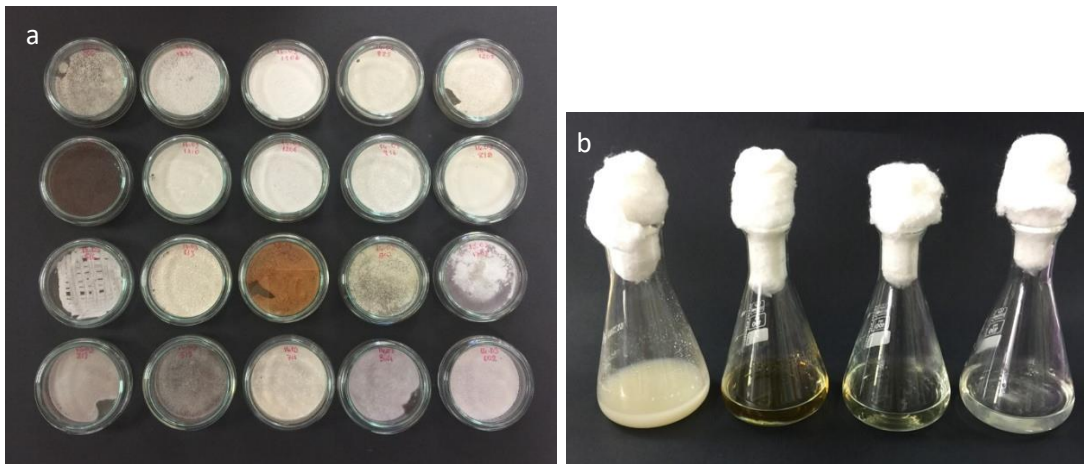
3.2.2. Fermentasyon besiyeri seçimi

Çalışmanın ilk aşamasında DPPH radikal giderici aktivite ve toplam fenolik madde tayini ile gerçekleştirilecek olan tarama çalışmasında kullanılmak üzere doğru ve yüksek performans gösterecek bir besiyerinin seçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla aktinomiset izolatları arasından 5 farklı mağaradan (Sarıcakaya /Eskişehir, Mustafa Kemal Paşa/Bursa, Tilkiler/Antalya, Safranbolu/Karabük, Manyas/Balıkesir) izole edilmiş olan 5 adet izolat (313, 602, 819, 1812 ve 1210) temsilci olarak seçilerek dört farklı besiyerinde üretilmiştir.

DPPH radikal giderici aktivite ve toplam fenolik madde tayini yöntemlerinden elde edilen sayısal veriler 'İstatistiksel analizler' başlığı altında belirtilen istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir.

Seçilen temsilci izolatlar öncelikle Yeast Extract – Malt Extract agar besiyerinde 4 paralel olacak şekilde 27°C'de 10 gün süresince aktiflenmiştir (Şekil 3.6 a). Tarama çalışmasında kullanılacak fermentasyon besiyerini belirlemek için Soya Unu Mannitol Broth (SMM), Yeast Extract – Malt Extract Broth (YEME), Tryptone Yeast Extract Broth (TYB) ve Nişasta Kazein Broth (NKM) olmak üzere dört farklı sıvı besiyerine %10 inokülasyon yapılmıştır. İnoküle edilen tüm besiyerleri 27°C'de, 100 rpm'de 10 gün inkübe edilmiştir (Şekil 3.6 b).

İnkübasyon süresinin sonunda, kültürler Whatman No 1 filtre kağıdından geçirilerek kültür sıvılarının hücrelerden ayrılması sağlanmıştır (Şekil 3.7). Filtreden geçirilen kültür sıvıları daha sonra 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı alınarak DPPH radikal giderici aktivite ve toplam fenolik madde tayini amacı ile kullanılmıştır. Bu aşamada DPPH radikal giderici aktivite ve toplam fenolik madde tayini kullanılan yöntemler, antioksidan aktivite çalışmaları başlığı altında ayrıntılı biçimde açıklanmıştır.



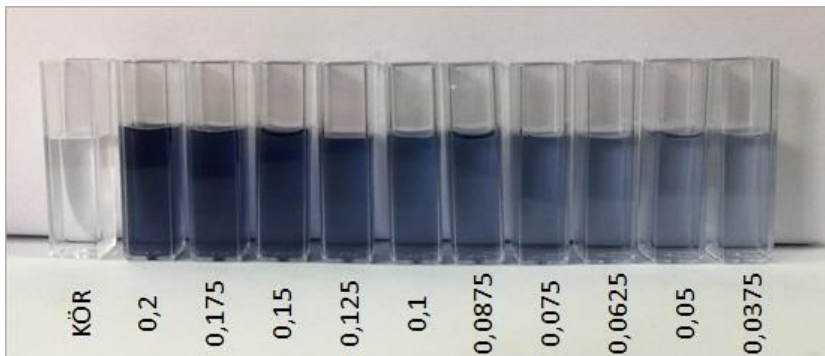
Şekil 3.6 Aktiflenmiş aktinomiset izolatları (a) Fermentasyon besiyerleri. (b) Soldan sağa; SMM, YEME, TYB, NKM.



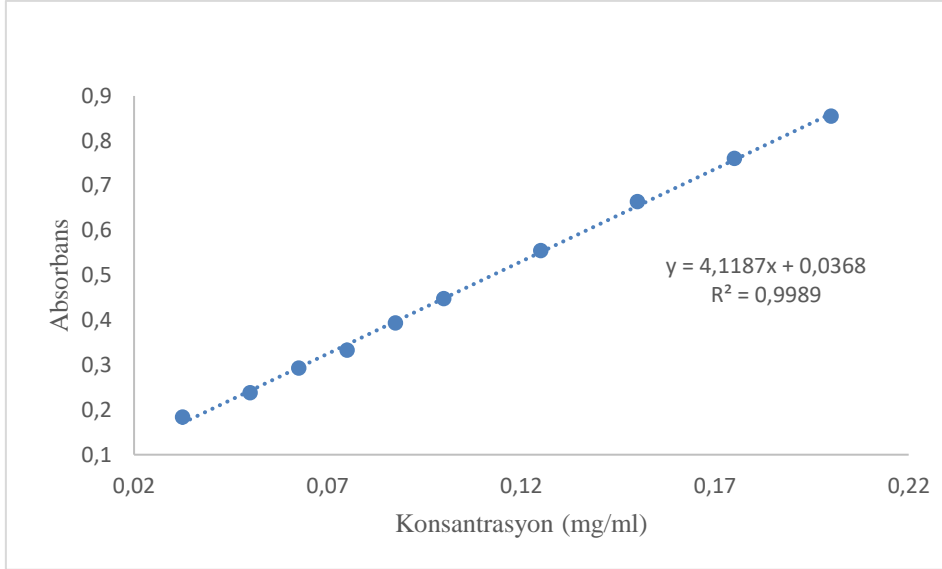
Şekil 3.7 313 izolatının Whatman No 1 filtre kağıdından süzülmesi

3.2.2.1. Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde miktarı tayin edilirken dört farklı besiyerine ait kültür sıvıları ve negatif kontrol olarak inokülasyon yapılmamış besiyerleri kullanılmıştır. Sonuçlar, fenolik bir bileşik olduğu bilinen gallik asitin standart eğri grafiğinden elde edilen standart eğri formülüne göre gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır (Singleton ve Rossi, 1999). Gallik asitin farklı konsantrasyonlarındaki renk değişimi Şekil 3.9’de ve standart eğri grafiği Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.8 Fermentasyon besiyeri seçiminde farklı konsantrasyonlarda kullanılan gallik asitin renk değişimi



Şekil 3.9 Fermentasyon besiyeri seçiminde kullanılan gallik asit standart eğri grafiği

3.2.2.2. DPPH radikal giderici aktivite

DPPH radikal giderici aktivite yönteminde, dört farklı besiyerine ait kültür sıvıları kullanılmış olup sonuçlar % inhibisyon değeri olarak verilmiştir (Kedare ve Singh, 2011).

3.2.3. Yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatların seçimi

Çalışmada farklı özellikteki lokalitelerden izole edilen çok sayıda aktinomiset izolatı kullanılmıştır. Bu izolatlarının tümünü antikanser aktivitelerinin araştırılması pratik ve ekonomik nedenlerle çok mümkün görülememektedir. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılacak aktinomiset izolatlarını belirlemek için sırasıyla antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite ve sitotoksik aktivite yöntemleri kullanılarak bir tarama çalışması gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Antioksidan aktivite

İzolatların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile DPPH radikal giderici aktivite yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem antioksidan aktivite çalışmaları başlığı altında ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

DPPH yöntemi ile yapılan tarama çalışması kapsamında, Çizelge 3.1’de sunulan toplam 319 aktinomiset izolatının DPPH radikal süpürücü aktivite (%) değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla ilk olarak izolatlar önceden belirlenmiş uygun aktifleme besiyerlerinde 27°C’de 10 gün aktiflenmiştir. Aktiflenen aktinomiset kültürlerinden spor süspansiyonları hazırlanmış ve fermentasyon besiyeri olarak belirlenen YEME besiyerine % 10 olacak şekilde inokülasyon yapılmış, 27°C’de 100 rpm’de çalkalamalı olarak 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. On günlük inkübasyon sonunda kültür sıvıları Whatman No 1 filtre kağıdından süzöldükten sonra 6000 rpm’de, 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı ayrılarak DPPH radikal süpürücü aktivitenin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan inokülasyon yapılmamış YEME besiyeri aynı işlemlere tabi tutulmuştur. DPPH reaktifi ve pozitif kontroller (askorbik asit ve BHT) taze olarak hazırlanmıştır.

3.2.3.2. Antimikrobiyal aktivite

Aktinomisetler çeşitli biyoaktif sekonder metabolitleri üretebilme potansiyelleri nedeniyle antimikrobiyal aktivite çalışmasına konu olmuştur (Lam, 2006; Singh vd., 2006; Bernal vd., 2015). Antimikrobiyal potansiyelin belirlenmesindeki çalışmalar genellikle aktif metabolitin besiyerine difüzyonu ilkesine dayanmaktadır. Bu ilkeye uygun olarak aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri, ‘Petride Agar Diskleri Yöntemi’ kullanılarak belirlenmiştir (Ichikawa vd., 1971).

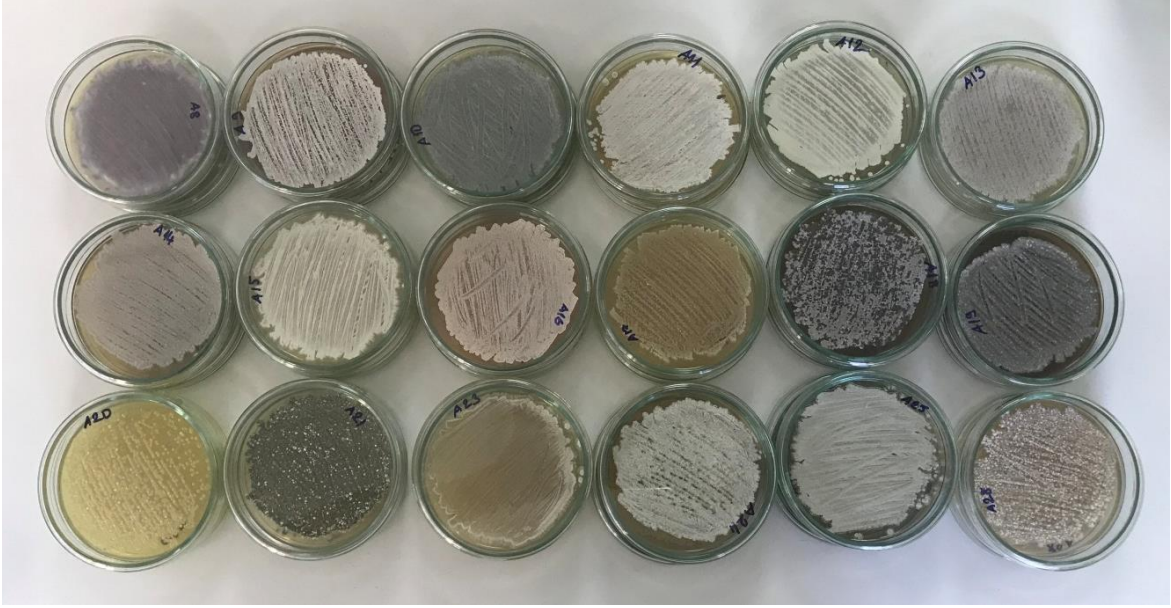
Bu çalışmada kullanılacak olan ve başka çalışmalarda antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiş olan izolatlar bu kapsamda değerlendirilmemiştir. Bu aşamada sadece bu çalışma kapsamında izole edilen ve antioksidan aktivitelerine göre seçilen (%25’den düşük ve %70’ten yüksek aktiviteye sahip olan) aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. DPPH süpürücü aktivite yöntemiyle taranan izolatlar içinden en yüksek (%70 üstü) ve en düşük (%25 altı) antioksidan aktivite gösteren izolatlar içinden daha önceden başka araştırmacılar tarafından antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmemiş olan toplam 30 adet izolatın antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Petride Agar Diskleri ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla toplam 30 aktinomiset izolatı (Çizelge 3.5) ve 3 pozitif kontrol suşu (*Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces violaceolatus*) NKM besiyerinde 27°C’de 10 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyona bırakılan

aktinomiset izolatlarından temsilci olarak seçilen 18 tanesinin petri kaplarındaki üreme özellikleri Şekil 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.5 Antimikrobiyal aktivite tarama çalışmasında kullanılan aktinomiset izolatları

Sıra no	İzolat No	Sıra no	İzolat No	Sıra no	İzolat No
1	MA1	11	613	21	8101
2	227	12	411	22	3110
3	C3-3	13	208	23	4103
4	404i	14	603	24	11105
5	207i	15	202	25	NTSP31
6	201i	16	C6-14	26	YC114
7	210i	17	C5-11	27	C2-4
8	YC925	18	C6-9	28	9903
9	YC408	19	C6-6	29	2904
10	717	20	C6-10	30	5903

Test mikroorganizmalarından mayalar (*Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerine ekilerek 2 gün, 30°C' de aktiflenmiştir. Üreyen mayalar Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerine inoküle edilerek 30°C'de, 80 rpm'de çalkalamalı olarak 2 gün inkübe edilmiştir. Bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*) ise Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerinde 37 °C'de 1 gün aktiflenmiştir. Aktiflenen bakteriler, Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerine inoküle edilerek 37 °C'de, 80 rpm'de, 1 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda test mikroorganizma kültürlerinin absorbanı 625 nm'de 0,08 – 0,1 absorbanı ($10^6 - 10^8$ kob/ml) verecek şekilde Mc Farland standardı 0.5'e göre, kör olarak steril MHB ve SDB besiyerleri kullanılarak, ayarlanmıştır. Bu yolla hazırlanan test mikroorganizmalarının kültürleri, her petri yüzeyine 0.1 ml olacak şekilde aktararak Drigalski spatülü ile yayılmış ve petriyeri yarım saat dinlenmeye bırakılarak kültürlerin besiyerine absorbe olması sağlanmıştır.



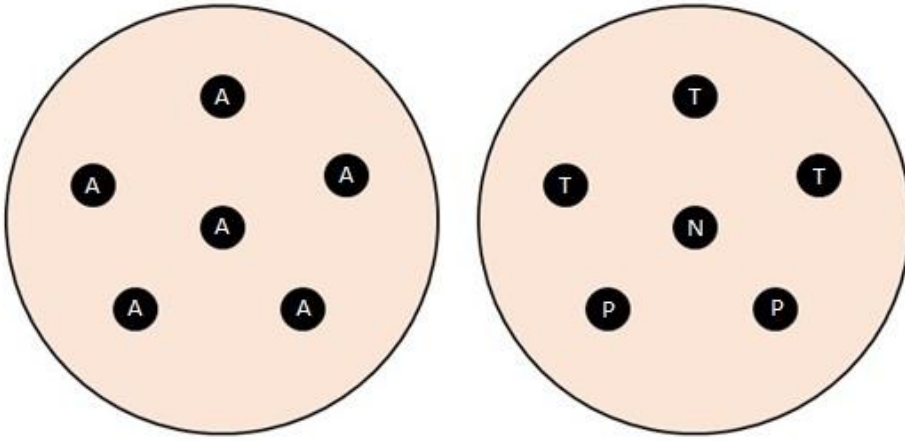
Şekil 3.10 Antimikrobiyal aktivite özellikleri belirlenecek aktinomiset izolatlarının üreme özellikleri

On günlük inkübasyon süresinin sonunda üremiş olan aktinomiset izolatları ve pozitif kontrol kültürlerinin sporlanmış yüzeyleri seçilerek 6 mm çapında agar diskleri çıkarılarak çalışmaya hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.11). Ichikawa vd.nin (1971) önerdiği yöntemde, çıkarılan agar diskleri önceden yüzeyine test mikroorganizması yayılmış olan petrilerin üzerine yerleştirilmiştir. Bu işlem her petriye 6 disk gelecek biçimde Şekil 3.12’de sunulduğu şekilde tasarlanmıştır.

Pozitif kontrol olarak kullanılan tip türler dışında, standart antibiyotikler içeren diskler de pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Bu amaçla Chloramphenicol (30 µg), Vancomycin (30 µg), Ketoconazole (10 µg) ve Fluconazole (10 µg) olmak üzere 2’şer adet antibakteriyal ve antifungal disk kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise inokülasyon yapılmamış NKM besiyerine ait petriden çıkarılan agar diskleri kullanılmıştır.



Şekil 3.11 Üremiş bir aktinomiset izolatına ait 6 mm çapında agar diskleri



Şekil 3.12 Deney tasarımı (A: Aktinomiset izolatlarına ait agar diskleri, T: Pozitif kontrol olarak kullanılan tip türler, P: pozitif kontrol olarak kullanılan Standart antibiyotik diskleri, N: negatif kontrol olarak kullanılan besiyeri agar diski

Aktinomisetlere ait agar diskleri ve deney kontrol diskleri petrilere yerleştirildikten sonra; bakteriler 24 saat, mayalar 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Outdouch vd., 2001). İnkübasyon süreleri dolduğunda oluşan inhibisyon zon çapları dijital kumpas yardımıyla iki farklı düzlemde mm cinsinden ölçülmüştür. Elde edilen inhibisyon sonuçları antimikrobiyal aktivitesi olduğu bilinen tip türler ve standart antimikrobiyal diskleri kapsayan pozitif kontrol gruplarının inhibisyon sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Böylece aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığı tespit edilmiştir. Antioksidan

aktiviteye sahip olup antimikrobiyal aktivite göstermeyen izolatların (Çizelge 3.6) sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır.

Çizelge 3.6 Sitotoksik aktivitesi taranan izolatlar

İzolat No	Antioksidan Aktivite	Antimikrobiyal aktivite
404i	+	-
C6-14	+	-
C2-4	+	-
717	+	-
1918	+	-
C6-6	-	-
1606	-	-
C6-10	-	-
MA-1	-	-
C3-3	-	-

3.2.3.3. Sitotoksik aktivite

Yapılan tarama çalışması sonucunda antimikrobiyal aktivite göstermeyen 10 izolat; en yüksek antioksidan aktivite gösteren 404i, C6-14, C2-4, 717 ve 1918 nolu izolatlar ile en düşük antioksidan aktiviteye sahip C6-6, 1606, C6-10, MA1, C3-3 izolatlarının sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu aşamada yapılan sitotoksik aktivite çalışması bir tarama çalışması olup en yüksek ve en düşük antioksidan aktiviteye sahip izolatlar içinden yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olan izolatların belirlenmesi amaçlanmıştır.

MTS yöntemi kullanılarak K562, HL-60 ve THP-1 hücre hatlarında izolatlara ait metabolitlerin sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Her izolatın 500, 250, 125, 42,5 ve 31,25 µg/ml konsantrasyonları ile pozitif kontrol olan bortezomibin 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,625 µg/ml konsantrasyonu 4 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar % canlılığın belirlenmesi amacıyla Denklem 3.1’de verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Yapılan bu çalışmada hücrelerin aktiflenmesi, sayılması ve yöntem ‘Antikanser aktivite çalışmaları’ başlığı altında ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{100}{A_{\text{Kontrol}} / A_{\text{Örnek}}}$$

(3.1)

A_{Kontrol} : Kontrolün absorbansı

$A_{\text{Örnek}}$: Örneğin absorbansı

3.2.4. Biyoaktif metabolit eldesi

Sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan “Antioksidan aktivite çalışmaları” ve “Sitotoksik aktivite çalışmaları” başlıkları altındaki yöntemler, 3.2.3. başlığında sunulan çalışmalar ile seçilen izolatların ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle aktif olan sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu amacıyla öncelikle sıvı – sıvı ekstraksiyonu çalışmaları yapılmıştır.

3.2.4.1. Sıvı – sıvı ekstraksiyonu

On günlük çalkalamalı inkübasyon koşullarında üretilen 404i, 1918, 717, C6-14 ve C2-4 izolatlarına ait kültürler Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek kültür sıvısının pelletlerden ayrılması sağlanmıştır. Süzüm işlemi ile elde edilen kültür sıvıları, 6000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar hacimce 1:3 oranında etil asetat ile muamele edilmiştir. Bu aşamada maksimum ekstrakt eldesi için yüzey alanını arttırmak amaçlanmış olup, her 10 ml kültür sıvısı için 10 ml etil asetat eklenen cam tüpler iyice çalkalanmıştır. Faz ayrımı oluştuktan sonra etil asetat tabakası toplanmıştır ve aynı işlem 2 kere daha tekrarlanmıştır. Etil asetat rotary evaporatör kullanılarak uçurulmuş ve elde edilen kuru ekstraktlar metanolde çözülerek konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra etil asetat kullanımıyla yapılan sıvı – sıvı ekstraksiyon yönteminin aktif metabolitlerin ayrılmasındaki başarı oranının test edilmesi amacıyla, ekstrakte edilmemiş, ekstraksiyon sonrası ve yeniden aktiflenen izolatların kültür sıvılarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

3.2.4.2. Liyofilizasyon

Çözücülerin uzaklaştırılması amacıyla sıvı – sıvı ekstraksiyonuna alternatif olarak liyofilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Liyofilizasyon işlemi, ekstraktın -80°C 'de dondurulmasına ve donmuş olan maddenin sublimasyonu ile çözücülerin maddelerden uzaklaşması işlemi olarak tanımlanmaktadır (Deepak ve Iqbal, 2015; Gaidhani vd., 2015).

Sıvı-sıvı ekstraksiyonda kullanılan izolatlardan antioksidan aktivitesi yüksek çıkan 404i ve 1918 izolatlarına ek olarak antioksidan aktivitesi düşük olan MA1 izolatta liyofilizasyon yöntemine dahil edilmiştir. Hem yüksek hem düşük antioksidan aktivite gösteren izolatların bir arada değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalkalamalı olarak inkübe edilen 404i, 1918, MA1 ve inokülasyon yapılmamış YEME besiyeri on günün sonunda Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek, 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası toplanan süpernant kısımları 1'er ml olacak şekilde cam şişelere aktararak -80°C 'de dondurulmuştur. Daha sonra -80°C den çıkarılan süpernantlar, kurutma amacıyla liyofilizatörde 3 gün bırakılarak süblime edilmiştir.

Kurutma işleminin sonunda ekstraktların konsantrasyonları su ve metanolla çözülerek 1 mg/ml olarak ayarlanmıştır. İki farklı çözücüde konsantrasyonları ayarlanan izolatların DPPH radikal süpürücü aktiviteleri belirlenmiş ve sıvı – sıvı ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlara ait aktivitelerle karşılaştırılmıştır.

3.2.5. Antioksidan aktivite çalışmaları

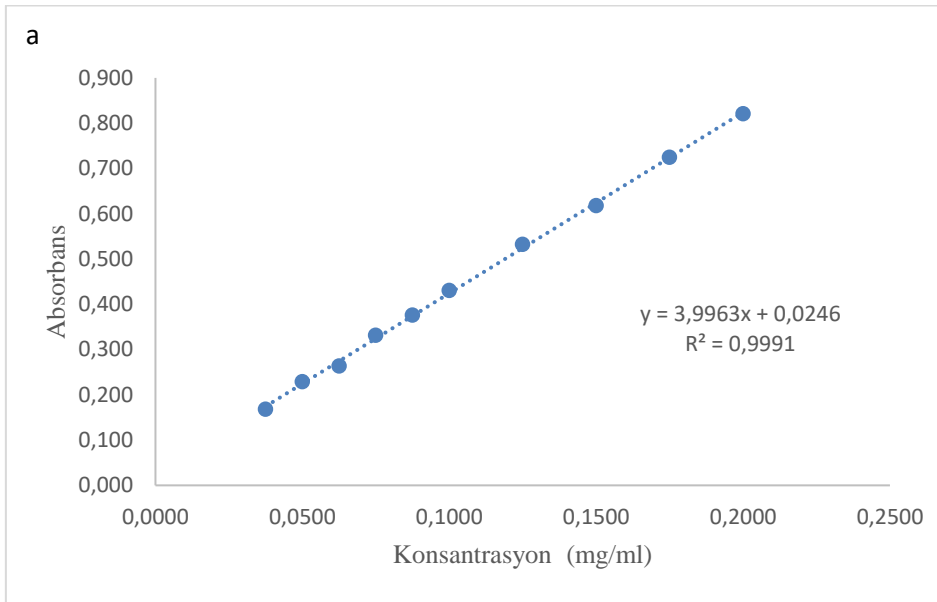
Diğer izolatlar arasından tarama çalışmaları verilerine göre seçilen 404i ve C3-3 izolatlarının antioksidan aktiviteleri farklı yöntemler kullanılarak ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır.

3.2.5.1. Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayininde Singleton ve Rossi (1999) tarafından önerilen şekilde Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) kullanılmıştır.

Yöntemde liyofilize kültür sıvısı örnekleri distile su içinde çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklere 1:10 oranında distile su ile hazırlanan Folin-Ciocalteu reaktifi eklendikten üç dakika sonra Na₂CO₃ eklenerek karanlık ortamda 2 saat inkübe edilmiştir. Spektrofotometrik bir yöntem olan toplam fenolik madde tayini, inkübasyon süresi sona erdiğinde 750 nm’de absorbans ölçümü yolu ile gerçekleştirilmiştir (Kamtekar vd., 2014).

Negatif kontrol olarak, inokülasyon yapılmamış YEME besiyeri kullanılmıştır. Fenolik bir bileşik olduğu bilinen gallik asitin standart eğri grafiğinden elde edilen formüle göre sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.13’te gallik asit eğrisi ve gallik asitin farklı konsantrasyonlarındaki renk değişimleri sunulmuştur.



Şekil 3.13 Gallik asite ait standart eğri grafiği

3.2.5.2. DPPH radikal giderici aktivite

Çalışmada, Brand–Williams vd.nin (1995) önerdiği yöntemin modifiye edilmiş şekli kullanılmıştır. Bu amaçla radikal olarak %5’lik DPPH çözeltisi metanol içinde çözülerek hazırlanmıştır. C3-3 ve 404i izolatlarının liyofilize kültür sıvıları distile su içinde çözülerek konsantrasyon serisi (2-20 mg/ml) hazırlanmış ve koyu renkli şişelere dağıtılmıştır. Şişelere

dağıtılan örneklerin üzerine DPPH çözeltisi eklenerek 30 dakika, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 517 nm’de absorbands ölçümü yapılmıştır.

Pozitif kontrol olarak askorbik asit (0,08-0,25 mg/ml) ve BHT’nin (0,1-1 mg/ml) farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise liyofilize YEME besiyerinin farklı konsantrasyon serileri (2-20 mg/ml) kullanılmıştır. Denklem 3.2’de verilen eşitlik kullanılarak % inhibisyon hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

(3.2)

A_{DPPH} : DPPH çözeltisinin metanole karşı absorbandsı

$A_{\text{Örnek}}$: Liyofilize kültür sıvısının yöntem sonucundaki absorbands değeri

Hesaplanan % inhibisyon değerleri ile inhibisyon – konsantrasyon grafiği oluşturulmuş, R^2 değeri 0,99 olan bir doğru ve bu doğrunun denklemi elde edilmiştir. Bu denklem yardımı ile her bir örneğin %50 renk açılımını sağlayan derişimleri %50 inhibisyon (EC_{50}) değeri olarak hesaplanmıştır (Gezer vd., 2006).

3.2.5.3. Redükleyici güç tayini

Redükleyici güç tayini, Chang vd.nin (2002) belirttiği yöntemle uygulanmıştır. Farklı konsantrasyon serileri (0,1-1 mg/ml) hazırlanan liyofilize kültür sıvıları, negatif kontrol (YEME besiyeri) ve pozitif kontroller (Askorbik asit ve BHT) şişelere aktarıldıktan sonra üzerlerine %1’lik potasyum ferrisiyanid ve 200 mM potasyum tamponu eklenmiştir. Bu işlemde sonra 50°C’de su banyosunda 20 dakika inkübe edilen örneklerin ferrosiyanide redüklenmesi sağlanmıştır. Sonrasında reaksiyonun durdurulması için TCA (%10) eklenen karışım, 650 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst tabakası toplanan örneklere distile su ve $FeCl_2$ (%0,1) eklenmiştir. Demirklorürün karışıma eklenmesi ile ferrisiyanid ve demirklorür bir araya gelerek ferik ferrosiyanidi oluşturmuştur. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi ile ferik ferrosiyanidine ait olan prussian mavisi renk oluşur ve bu rengin absorbandsı 700 nm’de

ölçülerek, 0.5 absorbansa karşılık gelen değer EC₅₀ değeri olarak kabul edilir (Chang vd., 2002; Arora ve Chandra, 2011).

3.2.5.4. Beta karoten – linoleik asit antioksidan aktivite tayini

Beta karoten – linoleik asit yönteminde linoleik asitin hava ve ısı oksidasyonu sonucunda oluşan alkil peroksitler, yüksek oranda doymamış olan beta karoten molekülüne saldırır ve beta karoten molekülü çift bağlarını kaybettiğçe spektrofotometre kullanılarak izlenebilen turuncu rengini kaybeder (Wettasinghe ve Shahidi, 1999; Aydın vd., 2015).

Beta karoten ve linoleik asit ile antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacı ile Shon vd. (2003) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Çalışmada kullanılacak olan distile su, çalışmadan önce 24 saat boyunca hava pompası yardımıyla oksijenlendirilmiştir. Emülsiyon hazırlanması aşamasında, kloroform içinde çözülen beta karotenin üzerine linoleik asit eklenerek kloroform uçurulmuştur ve oksijenli su karışıma eklenmiştir. Körler için hazırlanan emülsiyonda aynı işlemler beta karoten kullanılmadan sırası ile uygulanmıştır. Reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla su banyosu 50°C'ye ayarlanmıştır.

Çalışmada 404i, C3-3 izolatlarına ait liyofilize kültür sıvılarının, negatif kontrol olan YEME besiyerinin ve pozitif kontrollerin (Askorbik asit ve BHT) konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyde, BHT'nin negatif kontrolü olarak metanol kullanılmıştır. Aynı ayrı tüplere dağıtılan emülsiyonların üzerine örnekler konduğu anda vorteks ile karıştırılıp 0. dakika absorbansları 470 nm'de ölçülmeye başlanmıştır. Çalışmada 0, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika olmak üzere toplam yedi okuma yapılmıştır. Elde edilen absorbanslardan Denklem 3.3'te verilen eşitliğe göre beta karotenin % renk değişimi hesaplanmıştır.

$$\text{Renk Değişimi (\%)} = \frac{\text{Abs}_0 \times 100}{\text{Abs}_t}$$

(3.3)

- Abs₀ : Örneğin 0 anındaki absorbansı
 Abs_t : Örneğin t zamandaki absorbansı
 T : Zaman (20, 40, 60, 80, 100, 120 dakika)

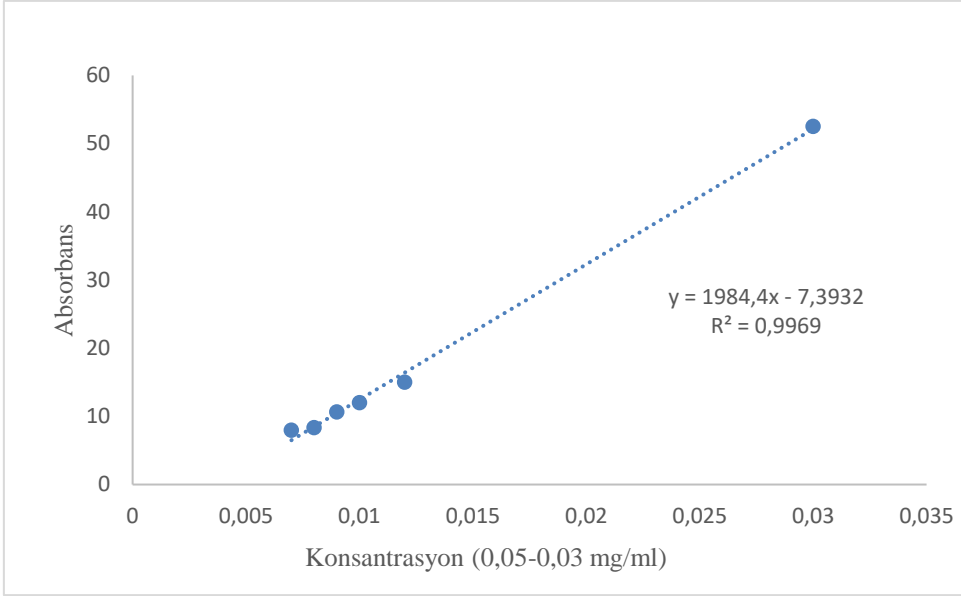
3.2.5.5. Metal şelatlayıcı aktivite tayini

Çalışmada 404i ve C3-3 izolatlarının ve negatif kontrolün (YEME besiyeri) seri konsantrasyonları 0,1-1,0 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Deney tüplerine alınan örneklerin üzerine FeCl₂ ve ferrozin eklendikten sonra distile su konularak hacim 5 ml'ye tamamlanmıştır. Kör olarak FeCl₂ ve distile su karışımı kullanılmıştır. Absorbanslar, 10 dakikanın sonunda 562 nm'de okunmuştur. Elde edilen sonuçlar yüksek şelatlama aktivitesi olduğu bilinen etilendiamin tetraasetik asitin (EDTA) 0,003-0,03 mg/ml seri hazırlanan konsantrasyonları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.14). Metal şelatlama aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Denklem 3.4'te verilen formül kullanılmıştır (Loizzo vd., 2012).

$$\text{Metal Şelatlayıcı Aktivite (\%)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Örnek}}} \times 100$$

(3.4)

- A_{Kontrol} : Negatif kontrolün absorbansı
 A_{Örnek} : Ekstreyi içeren çözeltinin absorbansı



Şekil 3.14 EDTA'nın standart eğri grafiği

3.2.5.6. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi

ABTS çalışmadan 16 saat önce potasyum persülfat ile muamele edilerek, koyu mavi – yeşil renkli ABTS⁺ radikali hazırlanmıştır. Çalışma öncesinde 404i ve C3-3 izolatlarına ait liyofilize kültür sıvılarının konsantrasyon serileri (0,1-1,0 mg/ml), negatif kontrol olarak YEME besiyeri, pozitif kontrol olarak askorbik asit (0,6-60 µg/ml) ve BHT 1,0-100 µg/ml hazırlanmıştır. Örneklerin üzerine 7 mM ABTS çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında, 5 dakika inkübe edildikten sonra sonra 734 nm'de absorbanlar ölçülmüştür. Radikal inhibisyonunun ve ABTS çözeltisinin renginde olabilecek herhangi bir değişiminin belirlenmesi amacı ile ABTS'nin ilk ve son absorbanları ölçülmüştür. Sonuçlar % radikal inhibisyon değeri ve EC₅₀ değeri olarak sunulmuştur. ABTS⁺ radikal katyonundaki % renk inhibisyonu Denklem 3.5'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Radikal İnhibisyonu (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{ABTS}} - \text{Abs}_{\text{Örnek}}}{\text{Abs}_{\text{ABTS}}} \times 100$$

(3.5)

Abs_{ABTS} : ABTS çözeltisinin etanole karşı absorbanansı

$\text{Abs}_{\text{Örnek}}$: Örneklerin absorbanansı

3.2.5.7. Lipit peroksidasyonu

Bu başlık altında lipit peroksidasyon ürünlerini ölçen Ferrik Tiyosiyanat (FTC) yöntemi ve Tiyobarbiturik Asit (TBA) yöntemi ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

Ferrik Tiyosiyanat (FTC) yöntemi ile lipit peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, bir dizi serbest radikal aracılı zincir reaksiyon prosesi içerir ve çeşitli biyolojik hasar türleri ile ilişkilidir (Beyhan vd., 2010). Ferrik tiyosiyanat yönteminde hava ile oksitlenen reaksiyon karışımına eklenen linoleik asit tarafından, lipit oksidasyonun ana ürünü ve oksidasyonun ilk aşamalarında üretilen hidroperoksit miktarı dolaylı olarak ölçülür (Inatani vd., 1983; Gülçin, 2003). Linoleik asit oksidasyonu sırasında ferroz (Fe^{2+}) iyonları ferrik (Fe^{3+}) iyonlarına yükseltgenerek amonyum tiyosiyanat ile birleşir ve kırmızı renge sahip ferrik tiyosiyanat üretir (Chapman ve Mackay, 1949; Önay Uçar vd., 2006). Ferrik tiyosiyanatın oluşturduğu kırmızı renk, maksimum 500 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Burci vd., 2015). Absorbanstaki azalma, reaksiyon ortamında linoleik asidin kullanılmaması ve hidroperoksitlerin parçalanmasından türetilen ikincil ürünlerin ortaya çıkması nedeniyle oksidasyonun kesintiye uğradığını açıklamaktadır (Chen vd., 1996; Burci vd., 2015).

Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan stok çözeltisi için 404i ve C3-3 izolatlarının, YEME besiyerinin ve askorbik asitin konsantrasyonları 1 mg/ml olarak ayarlanmıştır. Deney her gün örnek içeren stok çözeltisinden ve örnek içermeyen stok çözeltisinden (Deneyin negatif kontrolü) alınan karışımlarla 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Stok çözeltileri deney süresince 37°C'de inkübe edilmiştir. Stok çözeltisinden alınan örneklerin üzerine

%75'lik etanol ve %30'luk amonyum tiyosiyanat eklenerek üç dakika beklenmiştir. Örneklerin üzerine daha sonra FeCl₂ ve fosfat tamponu eklenerek 5 dakika inkübe edilmiş ve 500 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbansların güne bağlı % inhibisyonları Denklem 3.d'de verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - \left(\left(\text{Abs}_{\text{Örnek}} \div \text{Abs}_{\text{Kontrol}} \right) \times 100 \right)$$

(3.6)

Abs örnek : Örnek içeren stok çözeltisinin absorbansı

Abs kontrol : Örnek içermeyen stok çözeltisinin absorbansı

Tiyobarbiturik Asit (TBA) yöntemi ile lipit peroksidasyonu

Tiyobarbitürik asit yöntemi, lipit peroksidasyonunu belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Nagababu vd., 2010). Bu yöntem, TBA'nın lipit peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan malonaldehid (MDA) ile reaksiyonuna dayanır (Salih vd., 1987; Nagababu vd., 2010). Yöntemin temel prensibi, örneğin sıcaklık yolu ile asidik ortamda, 1 molekül malonaldehidin ve 2 molekül TBA'nın reaksiyona girmesi ile pembe bir malonaldehid – TBA kompleksi oluşturması sonucunda, bu pembe rengin 532 nm.'de ölçülmesidir (Wilbur, 1949; Tokur vd., 2006).

Çalışmada, Ferrik Tiyosiyanat yöntemi için hazırlanan stok çözeltileri kullanılmıştır. Stok çözeltilerinden alınan reaksiyon karışımlarının üzerine %20'lik trikloroasetik asit ve %0,67'lik TBA çözeltisi eklenerek 100°C'de su banyosunda, 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler 3000 rpm'de 40 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısımları alınarak absorbansları 532 nm'de ölçülmüştür. Reaksiyon karışımları her gün aynı aşamalardan geçirilerek, 6 gün boyunca güne bağlı inhibisyonları hesaplanmıştır (Denklem 3.6).

3.2.6. UV koruyucu aktivite çalışması

Bu çalışmada, UV ışığa maruz bırakılan *S. cerevisiae* hücrelerinin UV hasarından korunmasında, izolatlara ait metabolitlerin etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

D'Costa ve Santoro (2009) tarafından önerilen yöntem çalışmada UV koruyucu aktivitenin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere, Yeast Pepton Dextrose Broth (YPDB) besiyerine inoküle edilen *S. cerevisiae* hücreleri iki gün 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, Mc Farland No: 0,5'e (625 nm'de 0,008-0,1 absorbans aralığı) göre Ringer çözeltisi içinde hücre yoğunluğu ayarlanmış ve YPDB besiyeri ile 10³'lük dilüsyonu hazırlanmıştır. 404i ve C3-3 izolatlarının, YEME besiyerinin ve askorbik asitin konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde ayarlanarak, 10³ olacak şekilde ayarlanan dilüsyon kabına aktarılmıştır. Maya ve örnek karışımları daha sonra boş petrilere aktararak 30 saniye UV ışığa maruz bırakılmış ve üzerlerine Yeast Pepton Dextrose Agar (YPDA) dökülerek 2 gün boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Çalışmada negatif kontrol olarak, ekstrakt bulunmayan koşullarda UV ışığa maruz bırakılan ve bırakılmayan maya hücreleri kullanılmıştır. Sonuçlar 48 saat sonra koloni sayımı yapılarak Denklem 3.7'de sunulan eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Koruyucu Aktivite (\%)} = \frac{\text{NK} - \text{NK}_{\text{UV}}}{\text{NK} - \text{Örnek}} \times 100$$

(3.7)

- NK : UV ışığa maruz bırakılmayan ve ekstrakt içermeyen besiyerindeki koloni sayısı
- NK_{UV} : UV ışığa maruz bırakılan ve ekstrakt içermeyen besiyerindeki koloni sayısı
- Örnek : UV ışığa maruz bırakılan ve ekstrakt içeren besiyerindeki koloni sayısı

3.2.7. Antikanser aktivite çalışmaları

'3.2.3.3. Sitotoksik aktivite' başlığı altında yapılan tarama çalışması sonucunda seçilen 2 aktinomiset izolatına (404i ve C3-3) ait aktif metabolitlerin antioksidan aktivite çalışmaları yapıldıktan sonra sitotoksik aktivitelerini belirlemek amacıyla bu başlık altında MTS yöntemi ile sitotoksik ve apoptotik aktivitelerinin ve ilgili genler üzerindeki ifadeleri araştırılmıştır.

3.2.7.1. Hücre hatlarının aktiflenmesi ve sayılması

K562 ve HL-60 hücreleri RPMI-1640 besiyerinde, THP-1 hücreleri ise RPMI-1640 besiyerinin B-Mercaptaetanol (%0,4) ile desteklenmesi ile hazırlanan RPMI-1640 / B-Mercaptaetanol besiyerinde %5 CO₂'li inkübatörde, %95 bağıl nemde, 37 °C'de süspansiyon kültür ortamında çoğaltılmıştır. Kültür ortamında yaklaşık %70'lik hücre yoğunluğuna ulaştığında (2-3 gün) Pasajlanarak çoğaltılmıştır.

Yapışmayan özellikte hücre oldukları için, PBS ile yıkanarak 1200 rpm'de, 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda pellet kısmı alınıp üzerine taze besiyeri eklenerek karıştırılmıştır.

MTS yöntemini uygulanmadan önce Cedex-Roche cihazında hücre sayımı yapılmıştır. Steril lamel üzerine 10 µl hücre ve 10 µl Tripan Blue boyası eklenmiştir ve karışımdan 10 µl çekilerek Cedex lamına aktarılmıştır. Yapılan ölçüm 1 ml'deki canlı hücre sayısını vermektedir. Ölçümün yapılması için hücre canlılığı %90 ve üzeri olmalıdır. Her kuyucukta istenilen hücre sayısı 5×10^3 olacak şekilde hesaplama yapılmıştır.

404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitlerinin Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB ve NF-KB1 genlerinin ifadesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışma için ise 6 kuyucuklu plakalara, her kuyuda 1 ml besiyerinde 1×10^6 milyon hücre olacak şekilde hücre ekilmiştir.

3.2.7.2. MTS yöntemi ile sitotoksik aktivitenin belirlenmesi

Literatürdeki çalışmalar doğrultusunda, *in vitro* koşullarda sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan MTS yöntemi; testin kolaylığı ve toksisitenin hızlı bir göstergesi olmasından dolayı sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Malich vd., 1997).

MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – 5- (3-carboxymethoxyphenyl) – 2- (4 - sulfophenyl)- 2H- tetrazolium) deneyi, bir tetrazolyum tuzunun, 37 °C'de canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ile renkli, sulu çözünür bir formazan ürününe dönüştürülmesine dayanır. Dehidrojenaz enzimleri tarafından üretilen formazan miktarı, kültürdeki canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır ve 490 nm'de ölçülebilir (O'Toole vd., 2003).

404i ve C3-3 izolatlarının liyofilize kültür sıvıları suda çözülerek kullanılmış olup, konsantrasyonlar çift kuvvet olarak hazırlanmıştır. K562 ve HL-60 hücreleri için RPMI-1640 besiyeri, THP-1 hücreleri için ise çift kuvvetli RPMI-1640 / B-Mercaptaetanol besiyerinde ekilmiştir ve üzerlerine 404i ve C3-3 izolatlarının liyofilize kültür sıvıları seyreltilerek konsantrasyonları 500, 250, 125, 62,5 ve 31,25 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha önceden (18-24 saat) HL-60, K562 ve THP-1 hücre hatlarının geliştirildiği 96 kuyucuklu plakalara konsantrasyonları ayarlanmış 404i ve C3-3 izolatlarının liyofilize kültür sıvıları 4 paralel olacak şekilde 100 µl içinde 5×10^3 hücre olacak şekilde eklenmiş ve %5'lik CO₂ etüvünde, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyucuğa 40 µl MTS boyası (CellTiter 96) eklenerek 4 saat sonunda Eliza cihazında 490 nm'de ölçüm yapılmıştır.

Çalışmada inoküle edilmemiş YEME besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmış ve liyofilize edilen örneklerle aynı şekilde konsantrasyonları hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olan bortezomibin beş farklı konsantrasyonu (10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,625 µg/ml) kullanılmıştır. Deney ve kontrol grubu 4 paralel olarak çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlarla % canlılık ve logaritmik eğriden elde edilen R² formülünden IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.7.3. 404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitlerinin Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB ve NF-KB1 genlerinin Real Time PZR ile etkisinin belirlenmesi

Gerçek zamanlı Real Time-PZR geniş dinamik ölçüm aralığına sahip olması, yüksek hassasiyetli ve tekrarlanabilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Orlando vd., 1998). Ters transkripsiyon (RT) ve ardından polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), mRNA'nın saptanması ve ölçülmesi için güçlü bir aracı temsil eder (Pfaffl, 2004). Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmanın genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasında kullanılmaktadır. Ancak RNA'ların revers transkripsiyonu ile elde edilen komplementer DNA (cDNA) ile PZR yöntemi gerçekleştirilebilir (Bustin, 2002).

Bu çalışmada MTS yöntemi ile sitotoksik aktivitesi belirlenen izolatların ve pozitif kontrol olan bortezomibin IC₅₀ konsantrasyonları kullanılmıştır. Çalışılan konsantrasyonlar sayımı yapılmış ve önceden geliştirilmiş ve IC₅₀ değeri açısından karşılaştırıldığında daha etkili bulunan HL-60 ve THP-1 hücrelerinin olduğu ortama aktarılmış ve %5'lik CO₂ etüvünde, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 4 °C'de, 1200 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilen hücrelerin süpernatant kısımları atılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra mRNA sentez kiti (Roche) kullanılarak, total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için pelletlerin üzerine 220 µl liziz tamponu eklenerek pipetlenen örnekler Magna Pure Compact İsolation kitine ait tüplere alınarak, Magna Pure cihazına yerleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların verimi 260 nm ve 280 nm optik dansitede, nanodrop kullanılarak spektrofotometrik ölçümle belirlenmiştir. Sonrasında cDNA sentezi için her örnekten 100 ng RNA alınmıştır.

Elde edilen RNA'ların cDNA'ya sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit prosedürü uygulanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu tüplerine her örnek için 100 ng total RNA'ya 1µl Oligo 18 primeri eklenerek total hacim 11.4 µl olacak şekilde steril distile su ile tamamlanmıştır. PZR tüpleri daha sonra Thermal Cycler'da 10 dakika boyunca 65°C'de denatüre edilmiştir. Denatürasyon işleminde sonra tüplerin üzerine 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction tamponu, 0.5 µl RNase inhibitörü, 2 µl dNTP karışımı, 1 µl DTT, 1.1 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase ilave edilerek

toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler PZR Thermal Cyclers'da 55 °C'de 30 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen cDNA'lar Light Cyclers 480 Real Time PZR cihazında amplifikasyon için kullanılmıştır.

Real Time PCR yöntemi, cihaza uygun kit ve primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar LightCyclers 480 PZR cihazında Apaf-1, Ask-1, TNF-α, NF-KB ve NF-KB1 genlerine spesifik primerler ve PZR kiti, kit protokolüne uygun olarak cihazda çoğaltılmıştır. Çalışmada housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Light Cyclers PCR 480 uyumlu 96'lık well plakelere sırasıyla 4 µl H₂O, 10 µl Prob Master, 1 µl Primer (SYBR Green) ve 5 µl cDNA (Reverse ve forward Primer karışımı) eklenmiştir. Hazırlanan karışımlar her gen bölgesi için ayrı ayrı olacak şekilde 96'lık özel PZR plakasına yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra niceliksel ölçüm amacıyla plakalar Light Cyclers 480 Real Time-PCR cihazına yerleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar 'Advanced Relative Quantification' programı (Software Release 1.5.0 SP4 version 1.5.0.39) kullanılarak 404i, C3-3 izolatlarının aktif metabolitleri ve bortezomibin Apaf-1, Ask-1, TNF-α, NF-KB ve NF-KB1 ekspresyonu üzerindeki etkileri hesaplanmış ve normalize edilerek karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri Çizelge 3.7. de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer	Yönü (5'-3')	Uzunluk (bp)	Dizi
Apaf-1	Forward	20	5'-TGA GCC CAC TCA ACA GCA AA-3'
	Reverse	23	5'-TGT CCT TAC ACT GGA AGA AGA GA-3'
Ask-1	Forward	24	5'-TTC ACA CAA AAC GGA TGT AAC ATT-3'
	Reverse	26	5'-CCT AAA CAG TTA TGG TCA CAT TTT GG-3'
TNF-α	Forward	20	5'-GCC CTA CTA TTC AGT GGC GA-3'
	Reverse	20	5'-GAG CTT CTT CCC ACC CAC AA-3'
NF-KB	Forward	20	5'-AGA GGG AGG AGG GCC TTT AG-3'
	Reverse	20	5'-CGG GTC CGC GTA TCT TTG TA-3'
NF-KB1	Forward	18	5'-CGC CGC TTA GGA GGG AGA-3'
	Reverse	20	5'-GGT ATG GGC CAT CTG CTG TT-3'
GAPDH	Forward	20	5'-GTC AAG GTC GAG AAC GGG AA-3'
	Reverse	20	5'-AAA TGA GCC CCA GCC TTC TC-3'

3.2.8. İstatistiksel analizler

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, SPSS for Windows paket programı kullanılarak bilgisayar ortamında anlamlandırılmıştır. Tek Yönlü Anova testi, ikiden fazla gruplarda anlamlı farklılığın belirlenmesi amacı ile kullanılan bir analiz yöntemidir (Anderson, 2001). Hangi grupların birbirinden farklı olduğunu belirlemek için ise Post Hoc testleri kullanılmalıdır (Shingala ve Rajyaguru, 2015). Bu nedenle SMM, YEME, TYB ve NKB besiyerlerinin içinden hangi besiyerinin fermentasyon besiyeri olarak kullanılacağını belirlemek amacıyla, önce Tek Yönlü Anova testi ve sonrasında Tukey HSD (Tam olarak önemli fark) testi yapılmıştır. Tüm istatistiksel sonuçların anlamlılık düzeyi 0,05 olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Aktinomisetlerin İzolasyonu

Bu çalışma kapsamında Aspendos antik kenti (Antalya) ve Morca mağarasından (Mersin) izole edilen toplam 117 aktinomiset izolatı, laboratuvarımızda bulunan izolatlar ve diğer araştırma kurumlarında görev yapan araştırmacılardan temin edilen izolatlar birlikte kullanılmıştır. Bu izolatların kod, kaynak, izolat numarası ve her lokatiteden elde edilen toplam izolat sayılarına ilişkin veriler Çizelge 2.1’de sunulmuştur. İzolasyon seyreltme plaka yöntemi ve direk serpme yöntemi kullanılarak yapılmış olup, bu çalışmada elde edilen toplam 117 izolat ve kullanılan diğer izolatlar -20°C’de % 20 gliserol çözeltisi içinde saklanmıştır.

Antik kentlerin yüzyıllar boyunca el değmemiş olduğu ve bu nedenle ilgili döneme ait mikrobiotanın korunduğu öngörülmektedir. Bu kapsamda antik kentlerden izole edilen aktinomisetler ile yapılacak sonraki çalışmalar da her açıdan önem arz etmektedir.

Literatürde sunulan bilgilerin ışığında antik kentlerin izolasyon amacıyla örneklem noktaları olarak çok tercih edilmediğini; ancak Mısır’ da bulunan Zagazig şehrinde yer alan eski taş anıt mezarlığından (Saleh, 2013) ve Tunus’ta bulunan Roma su kemerleri kalıntılarında (Hezbri ve Karima, 2015) alınan örneklerle aktinomiset izolasyonu yapıldığını görmekteyiz.

Mağaralardan aktinomisetlerin izolasyonlarına yönelik ilk çalışmalar 1990’lı yıllarda görülmektedir (Arroya ve Arroya, 1996). Arroya ve Arroya’nın (1996) İspanya’da Altamira mağarasında en muhtemel sayı ve plaka sayımı yöntemleri kullanarak farklı mevsimlerde mikrobiyatayı incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar doğrultusunda esas olarak *Streptomyces* ve *Nocardia* gibi heterotrofik aktinomiset cinslerinin öne çıktığını ileri sürmüştürler. Fakat aktinomisetlerin mağaradaki dağılımı ve çeşitliliği hakkında yayınlanmış veriler nispeten sınırlıdır.

Metalik madenlerin bulunduğu mağaralardan aktinomiset izolasyonu ile ilgili çalışmaların literatürde kısıtlı olmasına karşın ilk kez Lee (2006) Kore’de bulunan doğal altın madeni bulunan bir mağaradan yeni bir tür olan *Nocardia jejuensis* sp.’yi izole etmeyi başarmıştır.

Pek çok araştırmacı benzer yöntemleri kullanarak aktinomiset izolasyonu gerçekleştirerek mikrobiotayı incelemişlerdir. Groth vd. (1999) tarafından Kuzey İspanya’nın Karstik mağaralarındaki (Altamira ve Tito Bustillo) aktinomisetler incelenmiştir. Alınan örnekler peptone yeast extract brain heart infusion medium (PY-BYI), casein mineral medium, triptic soy agar, nişasta kazein medium, ISP5, sikloheksimid agar, humic acid agar, malt – yeast extract agar gibi bir çok farklı besiyerinde çalışılmıştır. İzole edilen örnekler morfolojik ve kemotaksonomik açıdan Shirling ve Gottlieb’in (1966) önerdiği şekilde incelenmiştir.

Çin’de bulunan Reed Flute mağarasından alınan toprak örnekleri 1 gram toprak örneğine 10 ml fosfat tamponu (pH: 7.2) olacak şekilde karıştırılmıştır. Toprak partikülleri sedimentlerden ayrılarak dilüye edilmiş ve kazein mineral media alınmıştır (Groth vd., 1999). Çalışma kapsamında iki aerobik, gram pozitif bakteri izole edilmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda HKI 01 2ZT ve HKI 0132 suşları mikrokoksine cinsleri arasında yeni bir takson oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır.

Jeju adasında (Kore) bulunan doğal bir mağaradan toprak örnekleri Lee (2006) tarafından alınmıştır. Toprak örnekleri izolasyon aşamasından önce kurutulmuş ve seri dilüsyonları hazırlanarak nişasta kazein agar besiyerine inoküle edilmiş olup, petriyerler 14 gün 30°C’de inoküle edilmiştir. Neredeyse tüm izolatlar seyreltme yöntemiyle izole edildikten sonra 16S rRNA gen dizisi saflaştırılmış ve PZR yapılmıştır. Kemotaksonomik incelemelerin sonucunda izole edilen bakterilerin *Nocardia* cinsine ait olduğu ortaya çıkmıştır.

Niyomvong vd. (2012) tarafından Tayland’ta 12 toprak örneği adı henüz konmamış 4 farklı tropikal mağaradan yüzeyin 5 cm altından izolasyon amacıyla steril plastik poşetlere alınmıştır. Elekten geçirilip öğütülmeden önce 7 ile 10 gün boyunca oda sıcaklığında toprak örnekleri kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin pH’ları Reed ve Cummings’in (1945)

önerdiği yöntemle ayarlanmıştır. İzolasyon amacıyla üç farklı yöntem kullanılmıştır. 1 gram toprak örneği 9 ml % 0,85'lik NaCl çözeltisi içine konulmuş ve 10^1 dilüsyonu oda sıcaklığında 150 rpm hızda çalkalanmıştır. Birinci ve ikinci yöntem olarak; nemli toprak örnekleri su banyosunda 6 dakika 50°C 'de, kuru toprak örnekleri 1 saat boyunca 120°C 'de sıcaklıkta tutulmuştur. Üçüncü yöntem olarak 1 grama 9 ml % 0,85'lik NaCl çözeltisi karıştırılarak, 9 ml toprak çözeltisine % 1,5 fenol süspansiyonu eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika ünkübe edilmiştir. İnkübasyonların sonunda 10^4 dilüsyonu % 0,85'lik NaCl çözeltisiyle hazırlanarak önceden nalidixic acid (25 $\mu\text{g/ml}$) ve ketoconazole (100 $\mu\text{g/ml}$) ilave edilmiş nişasta kazein agar ve humic acid vitamin agar besiyerlerine inokülasyon yapılmıştır. 30°C 'de inkübe edilen örneklerden 2 hafta sonra saflaştırma işlemi yapılmıştır. Sonuç olarak 276 aktinomiset izolatı elde edilmiştir. Yapılan idendifikasyon çalışmaları sonucunda % 94,6 *Streptomyces* cinsi, % 5,4 aktinoplanetler, *Gordonia*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea* ve *Saccharopolyspora* cinsine ait suşlar tanımlanmıştır.

Başka araştırmacılar tarafından yapılan bu çalışmalar direkt serpme yöntemiyle izolasyonun, seyreltme plaka yönteminin modifikasyonlarına göre daha az tercih edildiği göstermektedir. Toprak/sediment örneklerinin izolasyon amacıyla kurutulması, seyreltilmesi, antimikrobiyal madde kullanımıyla seçici besiyerlerinin desteklenmesi uygulamaları diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Farklı mağaralardan izole edilen aktinomiset izolat sayıları, her mağarada örnekleme yapılan lokalite sayısına, ekosistemdeki değişikliklere, mağarada bulunan oluşum ve bileşenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir.

Pek çok araştırmacının da benzer yöntemler kullandığı izolasyon çalışmaları çoğunlukla antimikrobiyal aktivite ve sitotoksisite çalışmaları (Şen vd., 2011), enzim çalışmaları (Groth vd., 1999), biyoaktif metabolit izolasyonu, (Nakaew vd., 2009) ve/veya identifikasyonu amacıyla yapılmış olup, herhangi bir antioksidan aktivite belirleme yönteminde mağaralardan izole edilen aktinomiset örneklerinin kullanılmadığı görülmektedir.

4.2. Fermantasyon Besiyeri Seçimi

Seçilen temsili izolatlar (313, 602, 819, 1812 ve 1210 kodlu izolatlar) tarama çalışmasında kullanılacak fermentasyon besiyerini belirlemek için kullanılan tüm besiyerlerinde (SMM, YEME, TYB ve NKM) oldukça iyi üreme göstermiştir (Şekil 4.1).



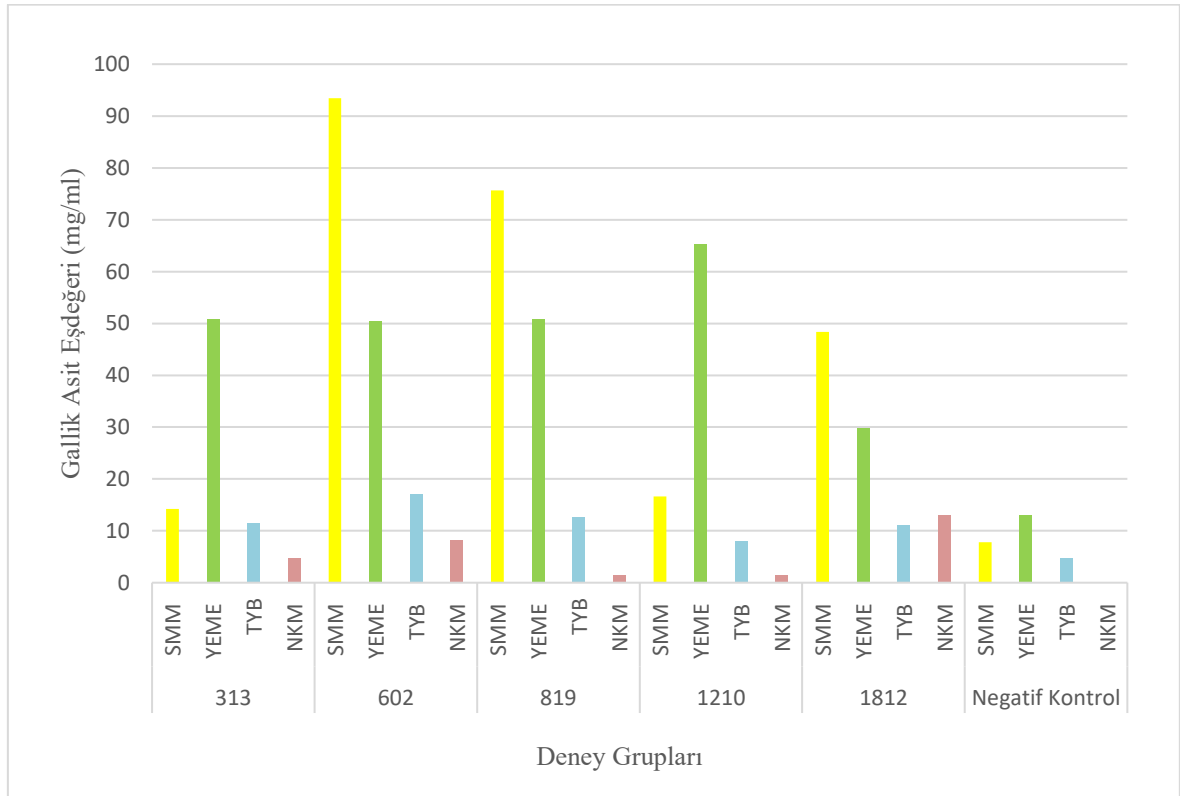
Şekil 4.1 Farklı izolatların SMM besiyerindeki gelişimi (Soldan sağa, inoküle edilmemiş SMM, 313, 602, 819, 1210 ve 1812 kodlu izolat kültürleri)

4.2.1. Toplam fenolik madde tayini

Kültür sıvısıyla yapılan toplam fenolik madde miktar tayininde sonuçlar gallik asit standart eğri formülü kullanılarak, gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. 313, 602, 819, 1210, 1812 izolatlarına ait kültür sıvılarının toplam fenolik madde içeriği gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmış (Şekil 4.2) ve ortaya çıkan renk değişimi Şekil 4.3'te sunulmuştur.

313 izolatında en yüksek toplam fenolik madde miktarı 0,154 mg/ml gallik asit eşdeğeri olarak YEME besiyerinde elde edilmiştir. Sırasıyla SMM, TYB ve NKM besiyerlerinde fenolik madde miktarı düşmektedir. 602 izolatı için en yüksek toplam fenolik madde miktarı, SMM besiyerinde 0,286 mg/ml, YEME besiyerinde 0,175 mg/ml gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Bu izolat TYB ve NKM besiyerlerinde 0,1 mg/ml gallik asit eşdeğerinden daha düşük fenolik madde miktarına sahiptir. 819 izolatı SMM besiyerinde

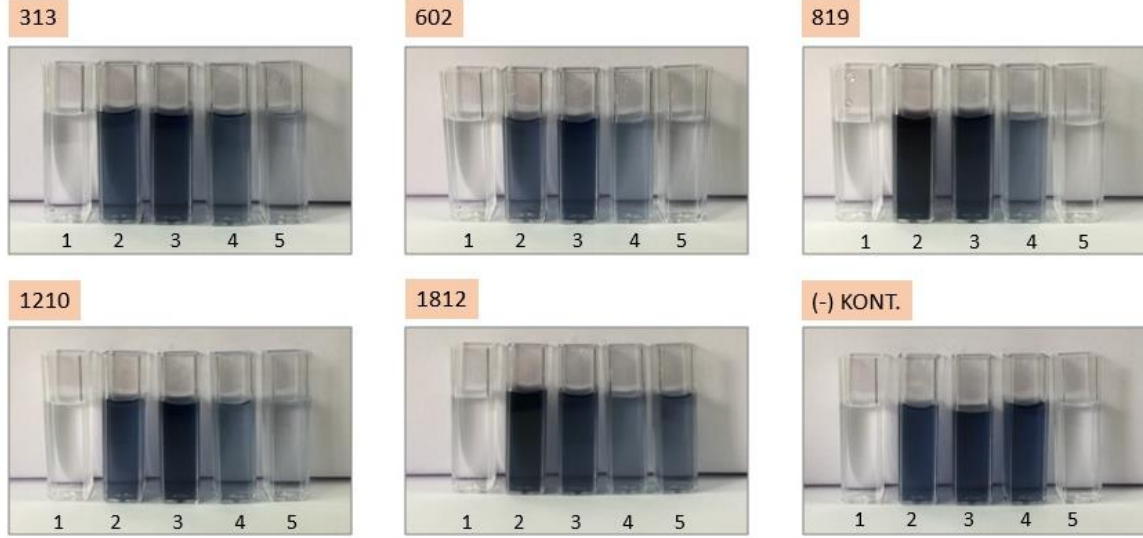
0,297 mg/ml, YEME besiyerinde 0.204 mg/ml, TYB besiyerinde 0,065 mg/ml ve NKM besiyerinde 0,005 mg/ml gallik asit eşdeğeri olarak sonuç vermiştir. En yüksek fenolik madde miktarı 1210 izolatu için 0,182 mg/ml gallik asit eşdeğeri olarak SMM besiyerinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fenolik madde miktarı YEME, TYB ve NKM besiyeri sırasıyla düşmektedir. 1812 izolatu SMM besiyerinde 0,231 mg/ml iken YEME besiyerinde 0,152 mg/ml gallik asit eşdeğeri. Diğer besiyerlerinde fenolik madde miktarının daha düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.2 Temsilci izolatların farklı fermentasyon besiyerlerinde total fenolik madde içeriği sonuçları

Tüm izolatlara ait sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde SMM ve YEME besiyerleri toplam fenolik madde miktarı açısından öne çıkmaktadır. NKM ve TYB besiyerleri diğer iki besiyerine göre aktivite açısından düşük kalmaktadır. 602, 819 ve 1812 izolatları SMM besiyerinde; 313, 1210 izolatları ise YEME besiyerinde en yüksek toplam fenolik madde miktarına ulaşmıştır. Negatif kontroller kendi aralarında değerlendirildiği zaman, NKM besiyerinde hiçbir aktivite görülmezken; SMM besiyerinde aktivitenin en yüksek olduğu

görülmektedir. Negatif kontroller ile izolatlar bir arada değerlendirildiğinde ise izolatların yüksek olmamakla birlikte fenolik madde içerdikleri sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.3 Fermentasyon besiyeri seçimi aşamasında izolatların farklı besiyerleri için renk değişimi (1: Kör, 2: SMM, 3: YEME, 4: TYB, 5: NKM)

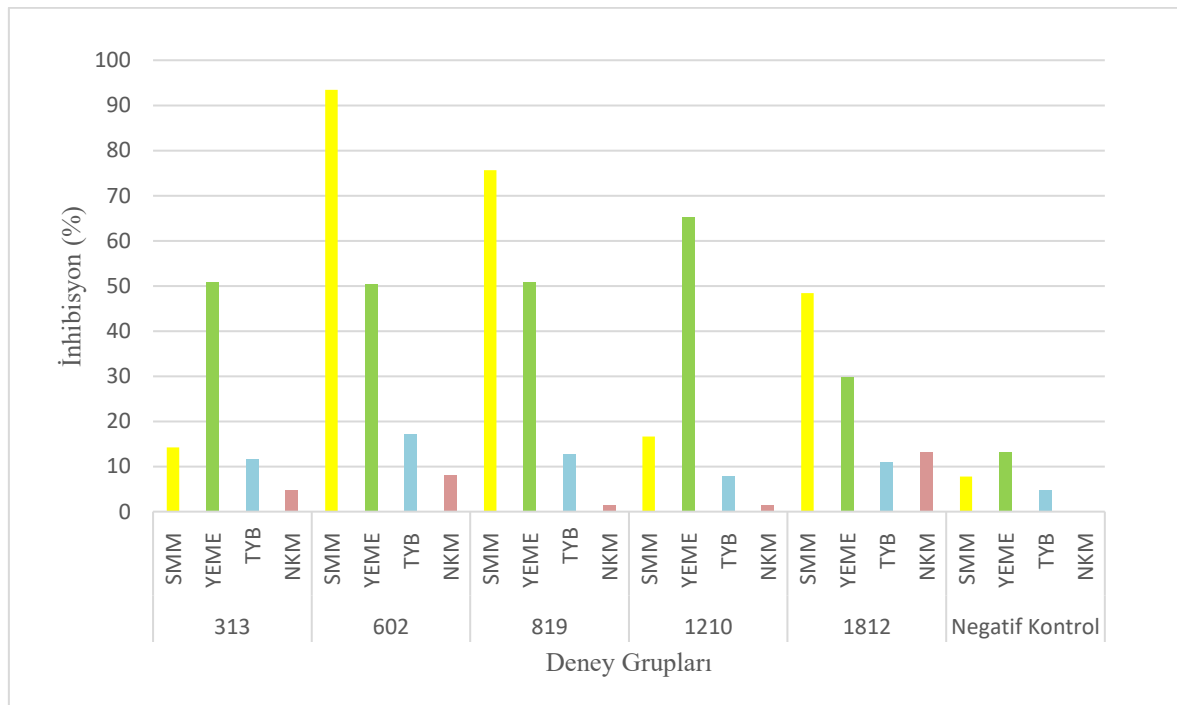
Zhong vd. (2011) yeni bir *Streptomyces* türünü S-Medium (Baker, 1990) sıvı besiyerinde 180 rpm, 28°C'de 14 gün inkübe etmişlerdir. Kültür sıvısını 3000 rpm'de 30 dakika santrifüjledikten sonra fenolik madde tayini yöntemini santrifüjlenmiş kültür sıvısını kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, toplam fenolik madde miktarı $13,59 \pm 0,17$ mg/ml gallik asit eşdeğeri olarak bulunmuştur.

Literatürde yapılan çalışmaların çoğunluğunu fenolik bileşiklerce zengin olan bitkiler oluşturmaktadır. Farklı mikroorganizma türleri (Cheung vd., 2003, Palacios vd., 2011) ve aktinomisetlerle (Narendhran vd., 2014, Gautham ve Onkarappa 2013) yapılan çalışmaların çoğunda kültür sıvısı yerine farklı konsantrasyonlarda ekstrakt kullanıldığı görülmektedir. Besiyeri seçiminde tarama yöntemi olarak toplam fenolik madde tayini yöntemi diğer antioksidan yöntemlerine göre nispeten daha az tercih edilmiştir.

4.2.2. DPPH radikal giderici aktivite

Deney izolat kültür sıvılarının DPPH radikalini süpürücü kapasitesinin ölçülmesine dayanmaktadır. DPPH'ın içindeki azot atomunun elektronu, antioksidanlardan karşılık gelen hidrojen atomunu alarak hidrazine oluşumunu azaltılır (Contreras-Guzman ve Srong, 1982). Hidrazine oluşumunun azalması da yüksek serbest radikal süpürme kabiliyeti ve buna bağlı olarak yüksek antioksidan aktivite olarak kabul edilmektedir (Kim ve Kim, 2006).

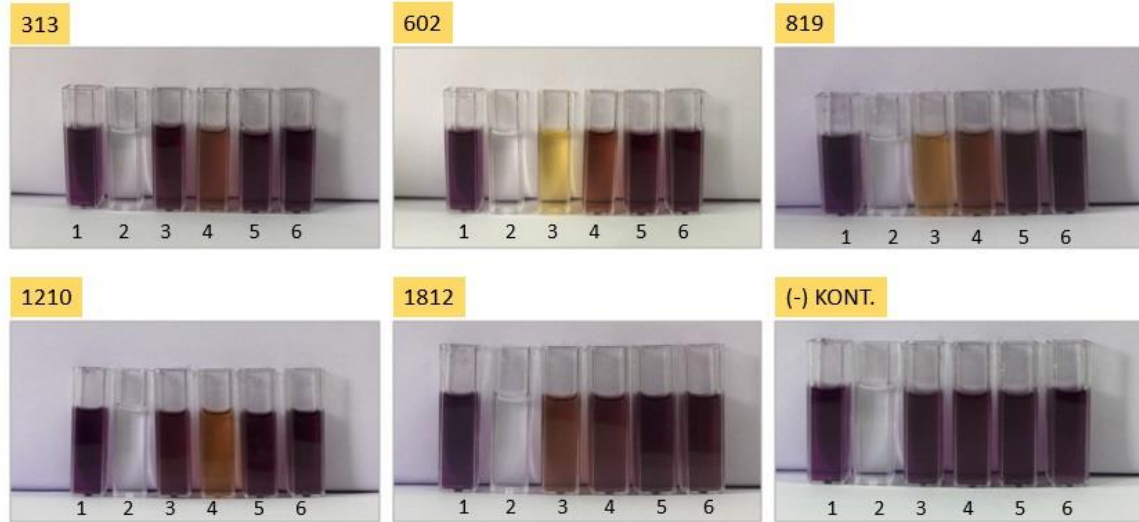
DPPH radikal giderici aktivite yönteminde çalışılan kültür sıvılarının % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır ve farklı besiyerlerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.4). Çalışmadaki izolat ve besiyerlerinin DPPH radikali ile tepkimesi sonucu oluşan renk değişimleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.4 Fermentasyon besiyeri seçiminde kullanılan temsilci izolatların farklı besiyerlerindeki % inhibisyon değerleri

313 izolatı en yüksek giderimi YEME besiyerinde %51 inhibisyon ile yapmıştır. Bu izolat ile diğer besiyerlerinde kayda değer sonuçlar elde edilememiştir. 602 izolatı %94'lük bir giderimle SMM besiyerinde; %50 giderimle YEME besiyerinde yüksek aktiviteler göstermiştir. 819 izolatı SMM besiyerinde %75, YEME besiyerinde %50 aktivite

göstermiştir. 1210 izolatı YEME besiyerinde %65 aktivite gösterirken diğer besiyerlerinde aktivite %20'nin altında kalmaktadır. 1812 izolatında ise tüm besiyerlerinde aktivite %50'nin altında kalmıştır.



Şekil 4.5 Fermentasyon besiyeri seçiminde kullanılan izolatların DPPH radikal süpürücü aktivitelerine ilişkin renk değişimleri (1: DPPH, 2: Kör, 3: SMM, 4: YEME, 5: TYB, 6: NKM)

Genel bir değerlendirme olarak Yeast extract – Malt extract ve Soya unu Mannitol Broth besiyerlerinde diğer besiyerlerine göre daha yüksek aktivite gerçekleşmiştir. 602, 819 ve 1812 izolatlarında SMM besiyerinde, 313 ve 1210 izolatlarında YEME besiyerinde en yüksek süpürücü aktivite görülmüştür. Negatif kontrollerin hepsi %15 inhibisyon değerinin altında kalmıştır; bu sonuç ışığında izolatların gösterdiği % aktivite anlamlı değerler olarak değerlendirilmektedir.

DPPH yönteminin kullanıldığı çalışmalarda çoğunlukla belirli konsantrasyonlarla kullanılan ekstraktlar ile EC₅₀ değeri hesaplanmıştır (Solecka vd., 2018, Almasi vd., 2018). Bunun yanında bazı çalışmalarda kültür sıvısı ve biyomas kullanılarak da tarama çalışmalarının gerçekleştirildiğini görmekteyiz. Sowndhararajan ve Kang (2013) *Streptomyces* sp. kullanarak yaptıkları DPPH radikal giderici aktivite deneyinde kültür sıvısını, liyofilize kültür sıvısını ve biyoması farklı besiyerlerinde test etmişlerdir. ISP1, ISP4, ISP5, ISP7, SCB, MYEB, NB, PDB, PM3 ve PM5 besiyerlerinde üretilen izolatların biyomasları hesaplanarak en yüksek biyomas oluşumunun görüldüğü Maltoz yeast extract

medium fermentasyon besiyeri olarak seçilmiştir. DPPH süpürücü aktivite yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda biyomasın ve kültür sıvısının % giderim sonuçları karşılaştırılmıştır. Giderim sonuçlarına bakıldığı zaman kültür sıvısı ile çalışıldığında biyomas örneğine göre aktivite %80 daha fazla olmuştur. Maltoz yeast extract medium kullanılarak elde edilen liyofilize örnek ve etilasetat ekstraktının farklı konsantrasyonları DPPH yöntemiyle çalışıldığında ise ekstraktan elde edilen aktivite liyofilize edilmiş örnekten %20 fazla olmuştur.

Literatür verilerinde kültür sıvısı kullanmanın avantaj olduğu görülmektedir. Maltoz yeast extract medium ile yapılan çalışmanın ışığında, besiyeri içeriği olarak bakıldığında yeast ekstraktın aktinomisetler tarafından kullanılmasıyla pozitif sonuçlar elde edilmiş olabileceği sonucuna ulaşılırken bu çalışmada bizim çalışmamıza göre YEME besiyerinin düşük aktivite oluşturduğu görülmektedir.

Başka bir çalışmada, 651 *Streptomyces* izolatının aseton ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda %50 inhibisyon gösteren izolatlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiş olup diğer tarama çalışmalarıyla izolatlar arasında eleme yapılmıştır (Anzai vd., 2008). Bu çalışma referans alınarak besiyeri seçiminde %50 ve üzeri aktivitenin görüldüğü besiyerlerine yoğunlaşmanın doğru olduğunu düşünülmektedir. Bu bakış açısı ile %50 ve üzeri aktivite görülen YEME ve SMM besiyerleri dikkat çekmektedir.

Total fenolik ve DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları istatistiksel analiz yöntemlerinin ışığında değerlendirilmiştir. Tek Yönlü Anova testi sonucunda, elde edilen P değeri 0,05'in altında bir değer olduğu için besiyerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. Tek Yönlü Anova testine ait sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Tek Yönlü Anova testi sonuçları (*: $p < 0,05$)

Varyans Analizi Çizelgesi					
Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Model	71634,772 ^a	8	8954,346	35,831	<,001
İZOLAT	3091,662	4	772,915	3,093	,023
BESİYERİ	22182,905	3	7394,302	29,588	<,001*
Error	12995,130	52	249,906		
Total	84629,901	60			

a. $R^2 = ,846$ (Düzeltilmiş $R^2 = ,823$)
*: $p < 0,05$

Tek Yönlü Anova testi sonucunda belirlenen anlamlı farklılıktan sonra uygulanan Tukey HSD testinde, çoklu karşılaştırmalar incelendiğinde SMM, TYB ve NKB'den farklı, YEME ise TYB'den farklı olarak bulunmuştur. Homojen alt setlere bakıldığı zaman NKB ve TYB, SMM ve YEME aynı sette bulunmuştur. Bu da ikili kolerasyonların farklı olmadığı anlamına gelmektedir. Yapılan Post Hoc test sonuçları Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Total fenolik ve DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçlarının birlikte değerlendirilmesiyle ve yapılan istatistiksel analiz yöntemlerinin ışığında çalışmamızda tarama çalışması için iki besiyeri (YEME, SMM) öne çıkmaktadır. SMM ve YEME besiyerlerinin istatistiksel olarak birbirine benzer ve daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Kültür sıvılarının süzülmesi konusundaki zorluk dikkate alınarak SMM besiyeri elenerek çalışmanın sonraki aşamalarında YEME besiyerinin fermentasyon besiyeri olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.2. Tukey HSD testlerinin sonuçları

Çoklu Karşılaştırmalar								
Tukey HSD								
(I) BESİYERİ		(J) BESİYERİ		Ortalama	Standart	p	95% Güven Aralığı	
				Farkları (I-J)	Hata		Alt Sınır	Üst Sınır
dimension2	SMM	dimension3	YEME	-1,1975	5,77242	,997	-16,5181	14,1230
			TYB	34,4411*	5,77242	<,001	19,1205	49,7617
			NKB	40,7373*	5,77242	<,001	25,4167	56,0579
	YEME	dimension3	SMM	1,1975	5,77242	,997	-14,1230	16,5181
			TYB	35,6387*	5,77242	<,001	20,3181	50,9592
			NKB	41,9348*	5,77242	<,001	26,6143	57,2554
	TYB	dimension3	SMM	-34,4411*	5,77242	<,001	-49,7617	-19,1205
			YEME	-35,6387*	5,77242	<,001	-50,9592	-20,3181
			NKB	6,2962	5,77242	,697	-9,0244	21,6168
	NKB	dimension3	SMM	-40,7373*	5,77242	<,001	-56,0579	-25,4167
			YEME	-41,9348*	5,77242	<,001	-57,2554	-26,6143
			TYB	-6,2962	5,77242	,697	-21,6168	9,0244

*. P< 0,05

Çizelge 4.3. İstatistiksel analizler sonucunda besiyerlerinin birbirine benzerlik durumları

Tukey HSD			
BESİYERİ	N	Alt setler	
		1	2
dimension1	NKB	15	5,5549
	TYB	15	11,8510
	SMM	15	46,2922
	YEME	15	47,4897
	p		,697

 $\alpha = 0,05$

4.3. Yüksek Antioksidan Aktivite Gösteren İzolatların Seçimi

Yapılan antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite tarama çalışmaları sonucunda, antioksidan aktivite yöntemini esas kabul ederek yüksek antioksidan aktivite gösteren aktinomiset izolatlarının seçimi yapılmıştır.

4.3.1. Antioksidan aktivite

DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemiyle taraması yapılan 319 aktinomiset izolatına ait % inhibisyon değerleri Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre %70 ve üstü aktivite gösteren izolat sayısı 22'dir. Aladağlardan 4, Aspendosdan 6, mağaralardan 5, metalik madenlerden 4 ve Prof. Dr. Nevzat Şahin' den edinilen sediment kökenli 3 izolat olmak üzere toplam 22 izolat %70 ve üzeri inhibisyon değerleri göstermiştir. Yüksek aktivite gösteren izolatlar içinde mağaralardan izole edilenlerde daha yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite belirlenmiştir.

En yüksek antioksidan aktivite (%90,23) gösteren izolat, Morca mağarasından izole edilen 404i kodlu aktinomiset izolatı olmuştur. C6-14, C2-4, 1701 ve YC925 izolatları sırasıyla %81,17, %78,56, %77,81 ve %77,13 aktivite göstererek 404i izolatıyla birlikte toplam 319 izolatın içinde ilk 5 en iyi aktivite gösteren izolat olarak öne çıkmaktadır.

En düşük aktivite gösteren izolatlara bakıldığında ise %25 aktivitenin altında kalan izolat sayısı 24 olarak bulunmuştur (Aladağlar: 3, Manisa: 1, Aspendos: 7, Mağaralar: 9, Metalik madenler: 3, Prof. Dr. Nevzat Şahin' den edinilen sediment kökenli: 1). Aladağlardan izole edilen C3-3 en düşük aktiviteyi gösteren izolat olmuştur, sırasıyla 10400, MA1, C6-10 ve 1606 kodlu izolatlar C3-3 izolatını takip etmektedir. Bu izolatlara ait % inhibisyon değerleri ise %0,91, %2,57, %17,66, 17,95 ve 20,09'dur.

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi (%)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolot Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
1 ^a	Yeniçağ – Bolu	Prof. Dr. Nevzat Şahin (19 Mayıs Üniversitesi)	YC 925	77,13
			MTSP31	72,10
			YC 408	70,35
			GC 716	38,88
			GC 330	38,68
			YC 710	34,18
			YC 114	22,37
2	Tatvan – Bitlis		31NTSP	52,00
			SPNT21	35,62
3	Merkez – Bolu		GTA35	37,62
4	Karapınar – Konya		C39AT	30,10
5	Karapınar – Konya		MTSC22	29,91
6	Merkez – Manisa	Prof. Dr. Mustafa Oskay (Manisa Celal Bayar Üniversitesi)	SHB17_30	62,02
			MA1	17,66
7	Soma – Manisa		SHB17_28	60,21
8	Çiğli – İzmir		SHB17_83	52,70
			SHB_27	50,23
9 ^b	İnönü –Eskişehir	1.2.	SHB_30	34,26
		1.3.	105	31,31
			109	56,90

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
9 ^b	İnönü –Eskişehir	1.4.	111	46,94
			112	55,82
			113	46,20
			114	26,23
10	Karaçam Köyü (Sivrihisar –Eskişehir)	2.1.	216	56,30
			217	28,80
		2.3.	211	49,45
		2.4.	206	60,54
			208	71,41
		2.5.	201	59,75
			202	22,67
			224	34,28
			227	24,30
			230	35,52
271	32,04			
11	Muratdere Köyü (Bozüyük –Bilecik)	4.1.	411	73,50
			412	46,22
			418	58,16
		4.2.	421	55,77
			422	52,88

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
12	Mayıslar Köyü (Sarıcakaya – Eskişehir)	6.1.	603	23,50
		6.2.	609	59,69
			610	55,29
			613	74,95
		6.4.	622	59,81
			6024	50,50
			625	45,98
			628	30,31
6.5.	632	43,57		
6.6.	633	68,67		
13	Karadeniz Bakır İşletmeleri (Küre – Kastamonu)	7.1.	701	67,93
			702	43,05
			705	49,21
			706	36,09
		7.2.	708	38,42
			709	49,00
			712	50,88
			713	51,29
			714	38,80

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
13	Karadeniz Bakır İşletmeleri (Küre – Kastamonu)	7.3.	715	37,94
			707	76,13
			718	38,83
			722	64,67
		7.4.	723	48,81
		7.5.	725	60,36
			727	43,90
			728	49,24
			729	40,83
733	38,00			
14	Balya Kurşun Ocağı (Balıkesir)	10.2.	1006	43,61
		10.3.	1003	38,86
		10.5.	1002	35,17
			1004	49,38
15	Uluabat Gölü (Mustafa Kemal Paşa – Bursa)	12.1.	1202	46,25
			1206	48,25
			1210	36,19
			1211	38,10
		12.2	1213	42,57
			1214	56,40
			1220	32,40
		12.4.	1231	59,79

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
16	Düz kır Mağarası (Aladağlar – Niğde)	C - 1	C1-1	53,04
			C1-2	45,79
			C1-8	65,68
			C1-9	34,66
			C1-12	36,59
			C2-1	63,91
		C - 2	C2-2	44,26
			C2-4	78,56
		C - 3	C3-1	40,43
			C3-3	0,91
			C3-4	44,30
			C3-5	39,55
			C3-10	69,13
		C - 4	C4-2	33,11
			C4-3	42,81
			C4-4	30,60
			C4-5	37,84
			C4-6	64,82
			C4-7	52,34
			C4-9	28,03
C4-11	49,01			
C4-12	27,73			

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
16	Düzkır Mağarası (Aladağlar – Niğde)	C - 4	C4-13	46,55
		C - 5	C5-1	39,74
			C5-2	42,82
			C5-6	29,14
			C5-7	43,82
			C5-11	76,84
			C5-12	40,90
			C5-14	33,06
			C5-15	65,89
		C - 6	C6-1	53,01
			C6-3	59,66
			C6-5	36,81
			C6-6	20,46
			C6-8	47,01
			C6-9	72,72
			C6-10	17,95
			C6-12	61,61
		C - 7	C7-1	33,53
			C7-2	29,49
			C7-5	27,24
C7-7	35,51			

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
17	Cinbar Vadisi (Aladağlar – Niğde)	D - 1	D1-1	36,93
			D1-2	32,20
		D - 4	D4-1	41,99
			D4-2	40,85
			D4-3	36,88
D - 5	D5-5	32,74		
18	Dim Mağarası (Alanya – Antalya)	1.3.	107	41,89
		1.5.	118	23,09
19	Yalan Dünya Mağarası (Alanya – Antalya)	2.1.	201	35,20
20	Mayıslar Mağarası (Sarıcakaya – Eskişehir)	3.5.	313	42,38
			324	43,10
21	Sorkun Mağarası (Mihalıççık – Eskişehir)	5.2.	502	27,86
			503	47,52
		5.3.	510	37,80
			518	40,58
			525	48,28

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
22	Tilkiler Mağarası (Antalya)	6.1.	602	41,37
			613	51,98
23	Tozman Mağarası (Sarıcakaya – Eskişehir)	7.1.	706	46,44
			711	31,43
		7.3.	712	57,62
			715	26,83
			718	38,66
		7.4.	720	40,72
24	Mencilis Mağarası (Safranbolu – Karabük)		816	37,27
		817	49,34	
		8.5.	819	71,23
		8.6.	824	45,68
			825	53,94
25	Sipahiler Mağarası (Amasra – Bartın)	9.7.	910	61,81
26	Oylat Mağarası (İnegöl – Bursa)	10.1.	1002	40,51
27	Peynirkuyu Mağarası (Manyas – Balıkesir)	11.3	1106	31,08
			1109	29,58
		11.4.	1112	39,70

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
27	Peynirkuyu Mağarası (Manyas – Balıkesir)	11.5.	1115	38,63
			1117	38,37
		11.6.	1126	38,03
28	Mürüvvetler Mağarası (Manyas – Balıkesir)	12.1.	1202	37,80
		12.3.	1206	23,03
			1208	42,81
			1209	22,00
		12.4.	1210	71,96
			1211	51,13
		12.6.	1215	51,09
			1231	29,83
		12.8.	1220	28,38
			1221	58,82
		13.2.	1306	41,66
		13.4.	1314	53,53
			1315	43,40
29	Ayvacık Düdeni (Ödemiş – İzmir)	14.1.	1403	30,49
		14.2.	1431	24,79
			1446	28,09
		14.5.	1470	33,16
			1473	46,90

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)	
29	Ayvacık Düdeni (Ödemiş – İzmir)	14.6.	1482	41,11	
		14.7.	1496	45,28	
30	Hacı Hüsrev Mağarası (İnönü – Eskişehir)	15.2.	1504	30,31	
		15.4.	1509	61,83	
31	Demirözü Mağarası (Haymana – Ankara)	16.1.	1601	45,81	
		16.3.	1606	20,09	
		16.6.	1613	42,38	
		16.7.	1615	25,75	
32	Bahçecik Mağarası (Merkez – Bilecik)	17.3.	1707	42,04	
		17.4.	1708	28,11	
33	Ayvaini Mağarası (Mustafa Kemal Paşa – Bursa)	18.5.	1812	51,54	
			1814	61,56	
34	Balatini Mağarası (Beyşehir – Konya)	19.2.	1907	58,83	
			19.3.	1908	48,22
				1910	30,56

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
34	Balatini Mağarası (Beysşehir – Konya)	19.4.	1913	61,82
			1917	70,81
			1918	74,38
		19.7.	1923	32,96
		19.10.	1932	38,07
		19.11.	1934	33,64
35 ^c	Morca Düdeni (Gazipaşa-Antalya)	1	101i	66,13
			102i	27,87
			103i	41,03
			104i	44,23
			105i	30,96
			106i	64,22
			107i	36,86
			108i	34,28
			151i	37,17
		2	201i	23,69
			202i	52,62
			203i	32,67
			205i	50,85
			206i	55,77

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
35	Morca Düdeni (Gazipaşa-Antalya)	2	207i	23,96
			208i	45,44
			209i	51,78
			210i	21,31
			212i	40,31
			213i	41,93
			214i	43,82
			215i	47,46
			250i	23,82
			251i	63,23
			252i	44,20
		254i	34,28	
		3	402i	51,95
			403i	66,26
404i	90,23			
451i	49,71			
36	Aspendos (Serik-Antalya)	1	1101	24,96
			1102	45,24
			1103	40,12
			1404	29,87

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
36	Aspendos (Serik-Antalya)	1	1405	64,31
			1701	77,81
			1702	25,17
			1703	57,30
			1901	48,79
		2	2901	60,76
			2904	23,51
		3	3100	51,33
			3103	36,39
			3104	47,37
			3107	58,48
			3109	70,38
			3110	71,47
			3111	33,43
			3112	65,01
			3114	61,65
			3115	52,03
			3402	43,66
			3901	48,11
			3902	60,36
3903	56,70			
3906	35,66			

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
36	Aspendos (Serik-Antalya)	4	4103	70,49
			4104	23,04
			4105	34,93
			4401	32,38
			4403	42,83
			4404	42,75
			4702	45,87
			4901	55,28
			4902	31,42
			4903	26,20
		5	5100	49,46
			5400	37,56
			5701	55,86
			5901	28,73
			5902	27,11
			5903	21,03
		6	6102	39,14
			6103	33,64

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
36	Aspendos (Serik-Antalya)	7	7101	61,96
			7400	33,02
			7701	43,83
			7702	56,39
			7703	44,69
			7704	60,40
			7902	29,60
			7905	58,71
			7906	39,80
			7907	39,12
		7908	39,59	
		8	8101	73,24
			8400	53,35
			8700	39,90
			8701	43,08
			8903	32,16
		9	9101	33,38
			9104	66,16
			9105	26,05
			9902	43,96
			9903	73,92

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
36	Aspendos (Serik-Antalya)	10	10100	23,17
			10400	2,57
			10701	42,78
			10903	56,34
		11	11100	28,63
			11104	50,70
			11105	24,76
			11106	45,95
			11403	45,82
			11701	46,75
			11901	36,79
			11904	46,49
			11906	48,21
			11907	59,63
11908	31,12			

Çizelge 4.4 Aktinomiset izolatlarının DPPH süpürücü radikal aktivitesi (%) (devam)

Sıra No	İlçe - İl	Kod ve Kaynak	İzolat Kodu	DPPH Süpürücü Aktivite (%)
36	Aspendos (Serik-Antalya)	12	12103	59,74
			12106	42,91
			12700	46,28
			12701	44,79
			12702	45,20
			12906	47,89

a: 1-8 nolu lokalitelerden farklı araştırma kurumlarında görev alan araştırmacılar tarafından izole edilen ve bu çalışmada kullanılmak üzere sunulan izolatlar

b: 9-34 nolu lokalitelerden laboratuvar ekibinde yer alan farklı araştırmacılar tarafından önceki çalışmalar kapsamında izole edilerek Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fungikültür Laboratuvarında korunan izolatlar

c: 35 ve 36 nolu lokalitelerden bu çalışma kapsamında izole edilen izolatlar

Pozitif kontrollere ait DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları Çizelge 4.5’de sunulmuştur. Negatif kontrol olan YEME besiyerinin ortalama % aktivitesi 15,86 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5 Pozitif kontrollerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri (%)

Konsantrasyon (mg/ml)	Askorbik Asit	BHT
0,1	12,69	14,49
0,2	34,74	17,14
0,3	59,48	55,08
0,7	TE	77,62
0,8	96,43	79,39
0,9	TE	94,23
1,0	96,10	92,42

TE: Tayin edilmedi.

İzolatlara ait % aktiviteler ile pozitif kontrollere ait aktiviteleri kültür sıvısındaki aktif madde konsantrasyonunu bilmediğimiz için karşılaştırmak doğru olmamakla birlikte; pozitif kontrollerden elde edilen aktiviteler deneyin çalıştığını göstermektedir. Yapılan diğer çalışmalarda da tarama amacıyla bu yöntemin tercih edildiğini görmekteyiz. Örneğin; Kekuda vd. (2015) izole ettikleri 182 izolat arasından seçtikleri *Streptomyces* türüne ait 17 izolatın antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. PO-12 ve PO-15 izolatu en yüksek ve en düşük süpürücü etkiyi göstermiş olup, ekstraktların tümünün süpürücü aktivitesinin pozitif kontrol olan askorbik asitten daha az olduğu gözlemlenmiştir.

Kültür sıvısı kullanılan *Nocardiopsis sp.* ile yapılan besiyeri optimizasyonunun % süpürücü aktiviteye olan etkisi Kim vd. (2014) tarafından araştırılmış ve uygun üreme ortamında aktivitenin en yüksek %88’e ulaştığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada da yüksek antioksidan kapasitesine sahip izolatların belirlenmesi amacıyla DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi tercih edilmiştir. DPPH yöntemi uygulanırken, bazı araştırmacıların kültür sıvısını doğrudan kullanmak yerine kültür sıvısı ekstraktı kullandığını görmekteyiz. Batı Ghat topraklarından izole edilen iki *Streptomyces* türünün antioksidan aktiviteleri ekstrakt kullanılarak incelenmiştir. Yapılan çalışmada 0,1 ve 0,5 mg/ml olacak

şekilde iki konsantrasyon kullanılmıştır. *Streptomyces* 1 nolu izolatin aktivitesi %51,63 ve %58,71 iken; *Streptomyces* 2 nolu izolatin % aktiviteyi sırasıyla %53,36 ve %59,97 olarak bulunmuştur (Kekuda vd., 2010).

Saraswathi vd. (2015) 2 farklı sediment örneğinde yaptıkları izolasyon sonucunda toplam 16 izolat tanımlamışlardır. Bu izolatlar ile yapılan DPPH tarama çalışması sonucunda kullanılan standart pozitif kontrolün 0,2 mg/ml'deki aktivitesi %84 iken, izolatlar arasındaki aynı konsantrasyondaki en yüksek aktivite gösteren ABTRI 3037 izolatinin % süpürücü aktivitesi %83 olarak bulunmuştur.

Ekstrakt miktarı bilinen ve az sayıda aktinomisetle yapılan antioksidan çalışmalarında çoğunlukla maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı olan IC₅₀ değeri hesaplanarak izolatların antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Karthik vd. (2012) izole ettikleri aktinobakterileri birçok antioksidan aktivite yöntemi ile taramışlardır. DPPH yöntemi ile yaptıkları çalışma sonucunda en yüksek IC₅₀ değerini 41,09 µg/ml bulmuşlardır. Bu değeri veren aktinobakteriyi *Streptomyces* LK-3 olarak tanımlamışlardır. Rajan vd. (2012) izole ettikleri sucul üç aktinomisetin sekonder metabolitlerinin antioksidan ve sitotoksik aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda 2 nolu izolatin IC₅₀ değerini 21,50 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Bu sonuçlardan yola çıkarak taraması yapılan 319 aktinomiset izolatin 101 tanesi %50 ve üzeri inhibisyon gösterdikleri için yüksek aktivite göstermiş olarak kabul görmektedir. Bu da bu çalışma kapsamında DPPH radikal süpürücü aktivite taraması yapılan tüm izolatların yüksek aktivite başarısının %33,33 olduğunu ifade etmektedir.

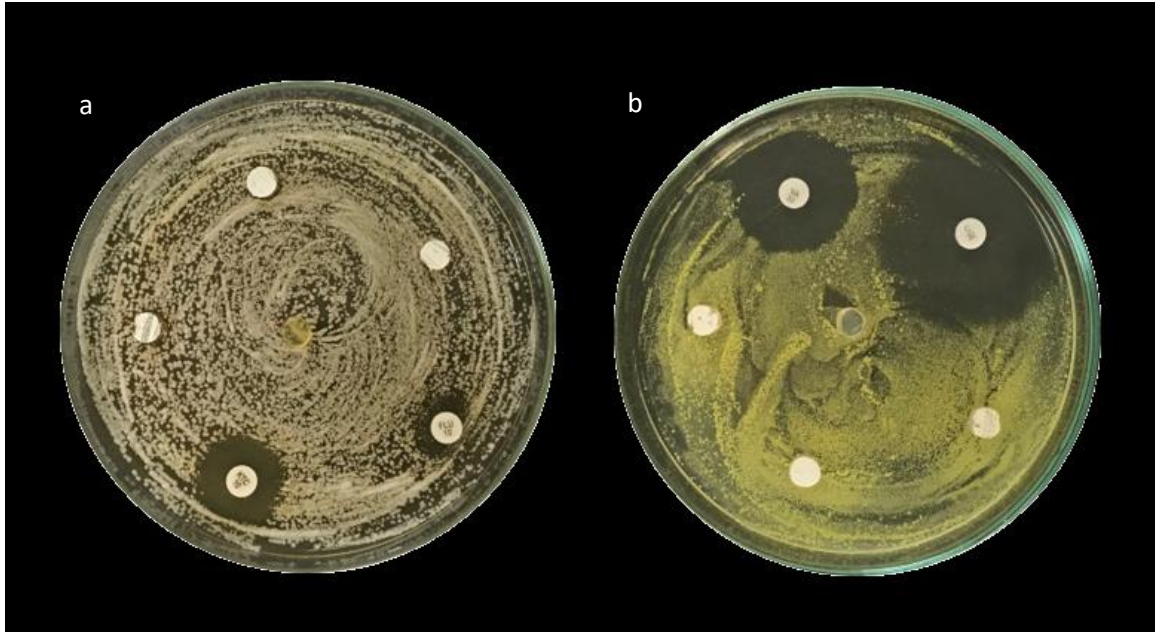
Literatürdeki çalışmalar göstermektedir ki, yapılacak olan sitotoksikite çalışmalarında antioksidan aktivitesi taranan izolatlardan, yüksek aktiviteye sahip izolatlar seçilmektedir. Bu da antioksidan aktivitenin sitotoksik aktiviteyle anlamlı bir ilişkisi olduğunu göstermektedir (Arumugam vd., 2010; Saurav ve Kannabiran, 2012; Shanmugasundaram vd., 2013; Lee vd., 2014; Ramya vd., 2015). Düşük antioksidan aktivite değerine sahip izolatların sonraki çalışmalara taşınmadığı literatürde açıkça görülmektedir. Bu çalışma kapsamında, bilimin doğası gereği olarak bilinenin de sorgunması istenmiştir.

Çizelge 4.6 Kontrol ve deney grubunun antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm) (devam)

Gruplar	Gram Pozitif Bakteriler			Gram Negatif Bakteriler			Mayalar		
	ATCC 25923 <i>S. aureus</i>	NRRL B-744 <i>B. subtilis</i>	NRRL 1018 <i>M. luteus</i>	ATCC 25922 <i>E. coli</i>	NRLL B-4420 <i>S. typhimurium</i>	NRLL B 2544 <i>S. marcescens</i>	ATCC 13803 <i>C. tropicalis</i>	ATCC 60193 <i>C. albicans</i>	NRRL Y-12632 <i>S. cerevisiae</i>
a	208	7,50	10,61	10,89					
	603			17,84					
	202	11,74	14,6	18,45					
	C6-14		20,52						
	C5-11	15,67	23,11	23,51					
	C6-9	17,35	23,73	24,33					
	C6-6								
	C6-10								
	8101			15,13					
	3110		9,84						
	4103		16,18	24,76					
	11105	8,50	9,57	8,46					
	NTSP31								
	YC114								
	C2-4								
	9903								
	2904								
5903		8,17							
b	NRLL ISP 5230								
	NRLL ISP 5260		9,15						
	NRLL ISP 5438		9,06						
c	Chloramphenicol (30 µg)	19,04	24,38	36,52	8,12	15,80	12,67		
	Vancomycin (30 µg)	14,16	25,83	23,81	6,62	7,68			
d	Ketoconazole (10 µg)						12,72	15,99	16,2
	Fluconazole (10 µg)						11,64	12,24	9,18
e	NKM (ISP-4)								

a: İzolatlar, b: Tip türler, c: Antibakteriyel diskler, d: Antifungal diskler, e: Negatif kontrol

Deneyde negatif kontrol olarak kullanılan NKM besiyeri hiçbir test mikroorganizmasına karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır. Buna karşın standart antibakteriyal ve antifungal disklerin beklenen zon çaplarını verdiğini görmekteyiz. Tip türlerde ise beklenen zon oluşmamıştır. Pozitif ve negatif kontrol gruplarına ilişkin zon oluşumu Şekil 4.6’da verilmiştir.

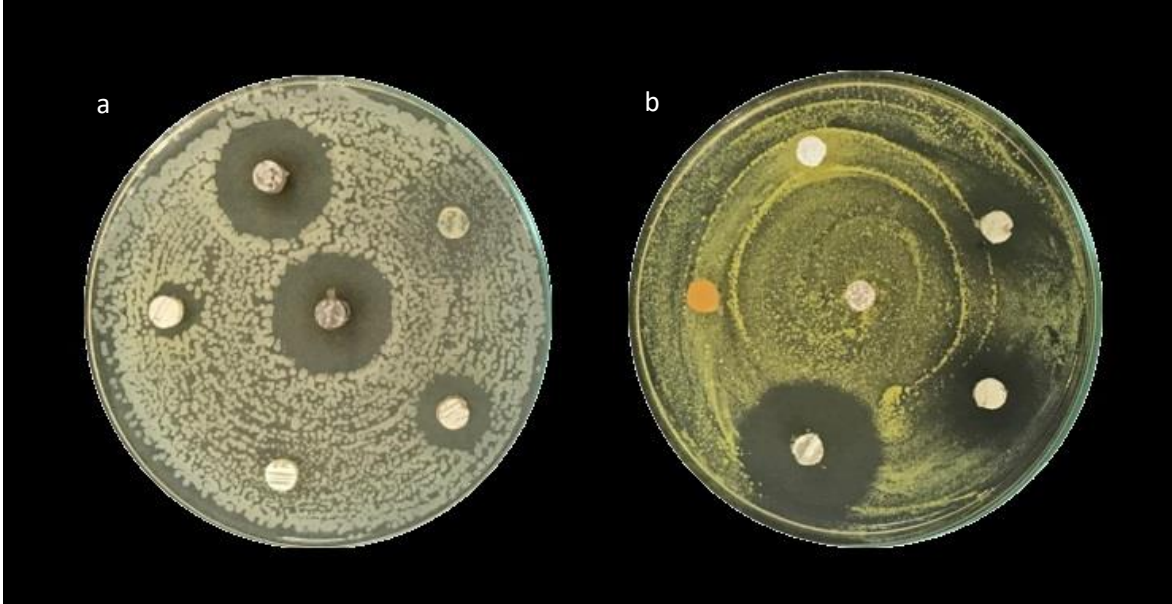


Şekil 4.6 Pozitif ve negatif kontrol gruplarının *S. marcescens* (a) ve *M. luteus* (b) test mikroorganizmalarına karşı inhibisyonları

C3-3, 404i ve C6-14 izolatları kullanılan toplam 9 test mikroorganizmasının sadece 1 tanesine düşük miktarda hassasiyet göstermiş olması ve DPPH aktivitelerinde göz önünde bulundurulması ile C2-4, 717, C6-6, C6-10 ve MA-1 izolatları ile beraber bu tarama çalışmasından sonraki tarama aşaması olan sitotoksik etkinin araştırılmasında kullanılmasına karar verilmiştir. C3-3, 404i ve C6-14 izolatlarının zon görüntüleri Şekil 4.7’de sunulmuştur.

Petride Agar Diskleri yöntemi sayıca fazla aktinomiseti bir arada taramaya imkân tanıyan basit bir yöntem olmasından dolayı birçok araştırmaya da çalışma konusu olmuştur. Endofitik aktinomisetlerle yapılan bir çalışmada, 53 aktinomiset izolatının antimikrobiyal aktivitesi taranmış ve %56,6’sında bir aktiviteye rastlanmamıştır (Araújo vd., 2000). Farklı bir çalışmada 110 aktinomiset izolatı ile antifungal aktivitenin varlığı araştırılmış ve 56

izolatta kullanılan test mikroorganizmalarına karşı bir aktivite görülmemiştir (Lemriss vd., 2003).



Şekil 4.7 İzolatların *B. subtilis* (a) ve *M. luteus* (b) test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite zonları

Nedialkova ve Naidenova (2005) tarafından Antartika'dan izole edilen 40 aktinomiset izolatının, Agar Block Method ve Well Diffusion Method kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri taranmıştır. Bu tarama sonucunda izolatların %40 kadarının herhangi bir test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür.

Sharma vd. (2011) izole ettikleri 134 farklı aktinomiset izolatının çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini Kirby Bauer antibiyotik duyarlılık testinin (Bauer vd., 1966) modifikasyonu ile araştırmışlardır. Araştırılan izolatların %38'inin en az bir test mikroorganizmasına karşı bir aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Ramesh ve Mathivanan (2009) Cross Streak yöntemi ile yaptıkları tarama çalışmasında, 208 deniz aktinomseti arasında 111 izolatın insan patojenlerine karşı ve 151 izolatın ise iki bitki patojenine karşı antifungal aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Yaban arısı ve kırlangıç yuvalarının topraklarından izole edilen 109 aktinomiset izolatının, Agar Plug yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin taranması sonucunda %46,78'i antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Kumar vd., 2012).

Birçok çalışmada görüldüğü gibi aktinomisetler yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip mikroorganizmalardır. Tüm bu çalışmalarda aynı veya benzer yöntemlerin kullanılmasıyla antimikrobiyal aktivitenin varlığının araştırılmasında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Toplam 30 izolat ile yapılan çalışmamızda, test mikroorganizmalarına karşı olan aktivite %60 olarak bulunmuştur. Bir ya da daha fazla test mikroorganizmasına karşı aktivite gösteren izolat yüzdesi 30'dur. Diğer yapılan çalışmalar ile % aktivite sonuçları karşılaştırıldığında her 100 izolattan yaklaşık 40'ı hiçbir aktivite göstermemektedir.

Aktinomisetler ile yapılacak olan farklı çalışmalar için antimikrobiyal aktivite testlerinin bir ön tarama basamağı olarak kullanıldığını görmekteyiz. Bu durum antioksidan aktivitenin (Anzai vd., 2008; Tian vd., 2013; Kiruthika ve Nisshanthini, 2013; Lei vd., 2016) ve sitotoksik aktivitenin araştırıldığı çalışmalarda (Kurosawa vd., 2001; Gorajana vd., 2007; Nah vd., 2012; Chen vd., 2017; Hussain vd., 2018) açıkça görülmektedir. Bunun yanı sıra antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivitenin bir arada çalışıldığı araştırmalar da mevcuttur (Arumugam vd., 2010; Kekuda vd., 2015; Srinivasan vd., 2017; Parmar ve Singh, 2018).

Aladağlar'dan elde edilen bakteri izolatlarından C5-3, C5-13, C5-17, C6-7 ve C6-11 kodlu izolatlar, Şen vd. (2011) tarafında antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile 'Petride Agar Diskleri Yöntemi' yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çalışmamızda, Aladağlar Düz kır mağarasından izole edilen C3-3, C6-14, C5-11, C6-9, C6-6, C6-10 ve C2-4 olmak üzere toplam yedi izolatın antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. İzolatlardan C6-6, C6-10 ve C2-4 izolatları hiçbir test mikroorganizmasında inhibisyon zonu oluşturmamış olup, C3-3 ve C6-14 izolatları sadece bir test mikroorganizmasına karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur. Diğer iki izolat ise çalışılan gram pozitif bakterilerin tümünde inhibisyon zonu oluşturmuştur. Yedi izolat içinde Gram negatif bakterilere karşı veya maya suşlarına karşı bir aktivite gözlemlenmemiştir. Şen vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise izolatların tümünde Gram pozitif bakterilerin bir ya da daha

fazlasında bir aktivite gözlemlenirken; 2 izolatta Gram negatif bakterilere, 1 izolatta ise mayalara karşı aktivite görülmüştür. Bu aşamada elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda tarama amacı ile gerçekleştirilecek sitotoksik aktivite çalışmalarında 404i, C6-14, C2-4, 717, 1918, C6-6, 1606, C6-10, MA-1 ve C3-3 izolatlarının araştırılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.7 Test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonları (mm) (Şen vd., 2011)

İzolatlar ve Kontrol	Gram Pozitif Bakteriler					Gram Negatif Bakteriler	Mayalar	
	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
C5-3	18,27	19,57	-	19,41	25,49	22,23	-	13,74
C5-13	9,64	18,26	-	-	-	-	-	-
C5-17	9,63	13,16	-	-	-	-	-	-
C6-11	-	13,66	-	-	-	-	-	-
C6-7	10,4	17,78	-	8,87	-	15,76	-	-
Kontrol	22,18	14,84	-	30,23	20,9	25,81	-	-

4.3.3. Sitotoksik aktivite

Üç farklı hücre hattında yapılan çalışmada 10 aktinomiset izolatının sitotoksik aktiviteleri taranmıştır. Yapılan çalışma sonucunda K562, THP-1 ve HL-60 hücre hatlarında en yüksek antioksidan aktivite gösteren 404i izolatı ile en düşük antioksidan aktivite gösteren C3-3 izolatının diğer izolatlar arasında sitotoksik etkisinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Negatif kontrol olan YEME besiyeri üç hücre hattında da sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. En yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatlardan C6-14, C2-4 ve 717 izolatlarında ve en düşük antioksidan aktivite gösteren C6-6, 1606, C6-10 ve MA1 izolatlarında 500 µg/ml konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda %50 sitotoksik etki görülmüştür. En yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatlardan biri olan

1918 nolu izolat ise 125-250 µg/ml konsantrasyonda K562 hücre hattında, %50 sitotoksik etki göstermiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 K562 hücre hattında izolatlara ait canlılık (%)

İzolat No	Konsantrasyon (µg/ml)				
	500	250	125	62,50	31,25
404i	40,61	42,49	45,36	54,25	87,45
C6-14	55,81	68,65	72,62	114,94	118,84
C2-4	55,00	69,07	80,69	86,13	91,57
717	55,24	58,07	60,20	71,74	74,50
1918	32,22	55,31	60,62	67,56	79,96
C6-6	88,39	90,37	91,86	95,40	96,03
1606	70,96	76,84	81,23	82,29	94,76
C6-10	78,26	80,02	83,31	89,16	95,18
MA-1	73,94	78,47	93,98	117,49	184,35
C3-3	37,25	44,07	49,36	69,62	80,31
YEME	82,25	91,64	92,63	101,70	120,18

En yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatlardan C6-14, C2-4, 717 ve 1918 izolatlarında ve en düşük antioksidan aktivite gösteren C6-6, 1606, C6-10 ve MA1 izolatlarında 250 µg/ml konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda HL-60 hücre hattında %50 sitotoksik etki göstermiştir. (Çizelge 4.9).

En yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatlardan C6-14 izolatı THP-1 hücre hattında, 62,5-125 µg/ml konsantrasyon aralığında %50 sitotoksik aktivite gösterirken; C2-4 ve 1918 izolatları 125-250 µg/ml'de, 717 izolatı ise 250-500 µg/ml'de %50 ve üzeri sitotoksik aktivite göstermiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.9 HL-60 hücre hattında izolatlara ait canlılık (%)

İzolat No	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)				
	500	250	125	62,50	31,25
404i	26,10	37,56	54,42	72,09	78,22
C6-14	48,83	52,23	54,83	59,45	53,47
C2-4	44,20	54,39	66,96	73,88	76,35
717	54,75	5193	55,86	57,07	59,80
1918	42,03	52,09	67,63	78,10	92,01
C6-6	51,97	64,76	67,09	78,54	77,61
1606	45,10	65,02	78,24	86,75	90,88
C6-10	63,15	67,49	73,40	77,65	86,78
MA-1	45,48	82,12	87,10	94,34	98,45
C3-3	14,45	36,26	44,77	50,18	61,64
YEME	53,59	66,42	80,87	72,57	84,45

Çizelge 4.10 THP-1 hücre hattında izolatlara ait canlılık (%)

İzolat No	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)				
	500	250	125	62,50	31,25
404i	25,10	39,38	49,59	65,37	68,90
C6-14	12,77	35,09	49,57	57,12	64,48
C2-4	37,46	46,71	60,41	63,70	64,63
717	43,64	56,11	72,98	79,72	85,37
1918	43,46	49,00	72,01	77,54	87,96
C6-6	42,36	53,09	66,45	73,01	85,16
1606	46,94	69,79	82,23	82,43	90,04
C6-10	42,85	52,12	62,61	79,24	83,04
MA-1	20,17	39,53	72,19	73,93	85,52
C3-3	23,85	38,71	48,24	54,37	64,81
YEME	48,44	49,77	52,09	54,43	56,08

Pozitif kontrol olan bortezomib 2,50-1,25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda %50 sitotoksik aktivite göstermiştir. Pozitif kontrol antikanser özellikle tedavide kullanılan bir ilacın etken maddesi olduğu için, daha düşük konsantrasyonlarda izolatların elde ettiği % sitotoksik etkiden daha yüksek bir sitotoksik aktivite göstermiştir.

Streptomyces sp. SY-103 izolatına ait aktif metabolitlerle yapılan bir çalışmada K562, HL-60, U937 ve THP-1 hücre hatlarında zamana bağlı olarak % canlılığa MTS yöntemi ile bakılmıştır. 48 saatlik sürenin sonunda hücrelere 30-40 ng/ml konsantrasyonda verilen metabolitlerin, herhangi bir metabolit verilmeyen hücre hatlarına göre, canlılığı %20 oranında inhibe ettiği ortaya konmuştur (Jeong vd., 2010). Yapılan çalışmalarda genellikle sitotoksik aktivitenin IC₅₀ veya LC₅₀ değerleri ile değerlendirildiğini görmekteyiz. *Streptomyces* MITKK-103 izolatından izole edilen aktinomisin Xoβ, aktinomisin D ve aktinomisin X2 maddelerinin HL-60 hücre hattındaki MTT yöntemiyle belirlenen sitotoksitesi, aktinomisin Xoβ'nin LC₅₀ 100nM'dan büyük, aktinomisin D'nin LC₅₀ 45 nM ve aktinomisin X2'nin LC₅₀ değeri ise 8 nM olarak bulunmuştur (Kurosawa vd., 2006). *Streptomyces albogriseolus* tarafından üretilen ekinosporinlerin K562 hücre hattındaki sitotoksiteleri araştırılmış ve IC₅₀ değeri 25,1 ± 1,80 µM olarak bulunmuştur (Cui vd., 2007).

Streptomyces nodosus türünden izole edilen asukaensis maddesinin antikanser aktivitesini THP-1 hücre hattında MTT yöntemini çalışan araştırmacılar, 50 µM asukaensisin 24 saat sonunda hücre canlılığının %30'a düşmesine neden olduğunu göstermişlerdir (Shipley vd., 2009). Aynı hücre hattında 404i ve C3-3 izolatları 62,5-125 µg/ml konsantrasyon aralığında %50'den fazla inhibisyon göstermiştir. *Streptomyces* sp. 060524 suşunun ürettiği izoflavonların K562 hücre hattı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada 50 µg/ml konsantrasyonda %50'den fazla büyüme inhibisyonu gerçekleşmiştir (Hu vd., 2009). Yaptığımız çalışma neticesinde aynı hücre hattında 404i izolatının 31,25-62,50 µg/ml konsantrasyon aralığında, C3-3 izolatının ise 125-250 µg/ml konsantrasyon aralığında benzer sitotoksik aktivite göstermektedir.

Kırkbir endofitik *Streptomyces* türünün metabolitleri ile yapılan çalışmada A549 hücrelerinde %30, HL-60 hücrelerinde %29 ve BEL-7404 hücrelerinde %85 ve P388D1 hücrelerinde %90 sitotoksik aktivite görülmüştür (Li vd., 2008). Çalışmada HL-60 hücre hattında taranan 10 aktinomiset izolatından 3 tanesi 500 µg/ml konsantrasyondan daha yüksek seviyelerde %50 inhibisyona ulaşmıştır.

Yapılan bu çalışmalarda farklı formazan tuzlarını içeren boyaların kullanılmasıyla benzer hücre hatlarında sitotoksik etkinin belirlendiğini görmekteyiz. Literatürde bulunan çalışmalarda MTS yönteminin kültür sıvısı kullanılarak tarama çalışması amacıyla kullanılmadığı başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda görülmektedir. Yapılan bu tarama çalışması sonucunda her üç hücre hattında da başarılı olan 404i ve C3-3 izolatlarının, detaylı biçimde gerçekleştirilmesi planlanan sonraki antioksidan ve antikanser aktivite çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir. Negatif kontrol olan YEME besiyerinin yapılan çalışma sonucunda sitotoksik bir etkisi görülmediği için ‘Antikanser aktivite çalışmaları’ başlığı altında yer alan diğer deneylere dahil edilmemesine karar verilmiştir.

4.4. Biyoaktif Metabolit Eldesi

4.4.1. Sıvı – sıvı ekstraksiyonu

Yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatların seçimi amacıyla yapılan DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları ile ekstraksiyon aşaması ve sonrasındaki sonuçlar Çizelge 4.11’de verilmiştir.

404i izolatu tarama çalışmasında %90,23’lük bir aktivite gösterirken ilk tekrarda %31,07 ikinci tekrarda ise %34,69’e düşmüştür. Bu belirgin aktivite düşüşü tüm izolatlarda açıkça görülmektedir. Ekstraksiyon işleminin başarısını anlamak amacıyla birinci tekrarda kullanılan kültür sıvısı ve kültür sıvısının ekstraksiyon işlemine tabi tutulduktan sonraki kültür sıvısında yapılan DPPH radikal süpürücü aktivite verileri bir arada değerlendirilmiştir. 404i izolatının birinci tekrardaki % aktivitesi 31,07’den etil asetatla muamelesi sonucunda 30,19; aynı şekilde 1918 izolatının % aktivitesi 22,32’den 21,60’a nispeten düşmüştür. Bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, etil asetatla kültür sıvısına yapılan muamele sonucunda, kültür sıvısında bulunan biyoaktif metabolitlerin etil asetat fazına alınmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.11 Sıvı – sıvı ekstraksiyon yönteminde DPPH radikal süpürücü aktivite değerleri (%)

İzolot No	DPPH Radikal Süpürücü Aktivite (%)			
	Tarama aşaması	Ekstraksiyon öncesi kültür sıvısı (1. Tekrar)	Ekstraksiyon sonrası kültür sıvısı (1. Tekrar)	Ekstraksiyon öncesi kültür sıvısı (2. Tekrar)
404i	90,23	31,07	30,19	34,69
1918	74,38	22,32	21,60	52,68
717	76,13	TE	TE	28,21
C6-14	81,17	TE	TE	19,23
C2-4	78,56	TE	TE	19,95

TE: tayin edilmedi.

Literatürde, aktinomisetlerle yapılan DPPH radikal süpürücü aktivite çalışmalarında metabolit ekstrakte etmek için sıvı – sıvı ekstraksiyon yönteminin sıkça kullanıldığını görmekteyiz. Anzai vd. (2008) *Streptomyces* türlerinin biyoaktif metabolit içeriğini belirlemek amacıyla çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Aseton ile ekstrakte edilmiş kültür sıvılarından elde edilen ekstraktlar DPPH radikal süpürücü aktivite yönteminde kullanılmıştır. *Streptomyces* türlerinin *in vitro* çalışmalarda süpürücü radikallerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan kültür sıvıları etil asetat ile ekstrakte edilmiştir (Sowndhararajan ve Kang, 2013). Bu iki çalışmada görüldüğü gibi sıvı – sıvı ekstraksiyonu için etil asetat kullanımı veya farklı çözücülerin kullanımıyla ekstraksiyon işlemi tercih edildiği gibi birden fazla çözücü bir arada tercih eden araştırmacılar da vardır. Örneğin, Kekuda vd. (2015) *Streptomyces* türleri ile yaptıkları antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmalarında kültür sıvısını sırasıyla hekzan, etil asetat ve bütanol ile muamele etmişlerdir.

Kawahara vd. (2012) aktinomisetlerin fermentasyon sıvısını etil asetat ile ekstrakte ederek elde ettikleri fenolik bileşiklerin DPPH aktivitelerini incelemiştir. *Streptomyces cavouresis* KU-V39 suşu ile yapılan başka bir çalışmada ise 100 ml kültür sıvısı içine 100 ml etil asetat eklenerek 2 saat çalkalanmıştır (Narendhran vd., 2014). Bu çalışmalarda kullanılan ekstraktlar etil asetat ile muamele edilmiştir ve herhangi bir ekstraksiyon öncesi veya sonrasına ait ekstraksiyon başarısıyla ilgili veri bulunmamaktadır. Bu nedenle literatürde karşılaştırma yapabileceğimiz veriler kısıtlıdır. Fakat açıkça görülmektedir ki bizim çalışmamızda kültür sıvılarında bulunan aktif maddeler suda çözülmekte ise de etil asetat içinde çözülmemektedir. Bu sorun nedeniyle çalışmanın diğer aşamalarında kullanılacak olan ekstrakt eldesi amacıyla, bu yöntemin kullanılmamasına karar verilmiştir.

4.4.2. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon ile elde edilen kültür sıvısı kuru maddeleri (Çizelge 4.12) iki farklı solvent (su ve metanol) kullanılarak DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemiyle test edilmiş olup, önceki denemelerle karşılaştırılmıştır. 404i izolatının su ile çözülmüş ekstraktında %33,56 olan aktivite metanol içinde çözülmüş ekstrakta %32,41'e düşmüştür. 1918 izolatında ise 19,66'dan 34,79'a % aktivitenin yükseldiği görülmektedir. MA1 izolatu ve YEME besiyerindeyse aynı şekilde düşüğe olsa bir artış olmuştur.

Sıvı – sıvı ekstraksiyon % inhibisyon sonuçları ile liyofilize kuru maddelerin aktiviteleri karşılaştırıldığı zaman liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilen örneklerde aktif metabolit yüzdesinin arttığı görülmektedir. Fakat bu artış 404i izolatu için suda çözülerek konsantrasyonu ayarlanmış ekstrakta gerçekleşirken; 1918 izolatında metanol içinde çözülen ekstrakta görülmektedir.

Antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite çalışmalarında, liyofilize kültür sıvılarının kullanıldığını başka çalışmalarda da görmekteyiz. Kurakhamsang vd. (2019) aktinomisetler ile yaptıkları toplam fenolik madde içeriği tayini ve antioksidan kapasite belirleme çalışmasında; Shivale vd. (2018) Hindistan'ın kuzey batı kıyı bölgesinden elde ettikleri deniz bakterileriyle yaptıkları antioksidan belirleme çalışmasında kültür sıvısının liyofilize edilmiş halini kullanmışlardır. Başka bir çalışmada endofitik aktinomisetlere ait kültür sıvıları liyofilize edilerek metabolitlerin antimikrobiyal, antioksidan ve antitümör

aktiviteleri incelenmiştir (Savi vd., 2015). Abd-Elnaby vd. (2016) ise *Streptomyces parvus*'un liyofilize edilmiş kültür sıvısı ile antikanser aktiviteyi araştırmıştır.

Çizelge 4.12 Liyofilize kültür sıvılarının ve etil asetat ekstraksiyonu sonucunda elde edilen DPPH radikal süpürücü aktivite (%) aktiviteleri

İzolot No	Tarama aşaması	Ekstraksiyon öncesi kültür sıvısı (1. Tekrar)	Ekstraksiyon sonrası kültür sıvısı (1. Tekrar)	Ekstraksiyon öncesi kültür sıvısı (2. Tekrar)	Liyofilize örnek (Çözücü su)	Liyofilize Örnek (Çözücü metanol)
404i	90,23	31,07	30,19	34,69	33,56	32,41
1918	74,38	22,32	21,60	52,68	19,66	34,79
MA1	17,66	TE	TE	TE	10,37	13,06
YEME	15,86	TE	TE	TE	9,65	16,98

TE: Tayin Edilmedi

Kültür sıvısının liyofilize edilerek kullanıldığı çalışmalar sadece aktinomiset türleriyle de sınırlı kalmadığı; *Coprinus comatus* makrofungusu ile antioksidan içeriğin araştırıldığı (Tsai vd., 2009) ve *Pleurotus eryngii* kullanılarak antioksidan ve antigenotoksisitenin araştırıldığı çalışmalarda da (Hu vd., 2009) benzer yöntemin uygulandığı görülmektedir.

Tüm bu çalışmalarda görüldüğü üzere, liyofilizasyon yöntemi birçok araştırmacı tarafından da sıvı – sıvı ekstraksiyona bir alternatif oluşturacak kadar tercih edilmiştir. Sıvı – sıvı ekstraksiyonu ile liyofilize kültür sıvısı sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, etil asetat kullanılarak yapılan ekstraksiyonun başarılı olmamasından dolayı aktif metabolitlerin kültür sıvısının liyofilize edilerek elde edilmesine karar verilmiştir. Liyofilize edilen kültür sıvılarının metanol içinde çözülmesiyle, ilerideki çalışmalarda kullanılmak üzere ayarlanacak olan konsantrasyonlarda olabilecek deney hatalarını olabildiğince minimize etmek, olası toksisiteden kaçınmak ve ekstraktın metanolde çözülmesinin uzun zaman aldığını göz önünde bulundurarak liyofilize örneklerin sonraki çalışmalarda suda çözülmesine karar verilmiştir.

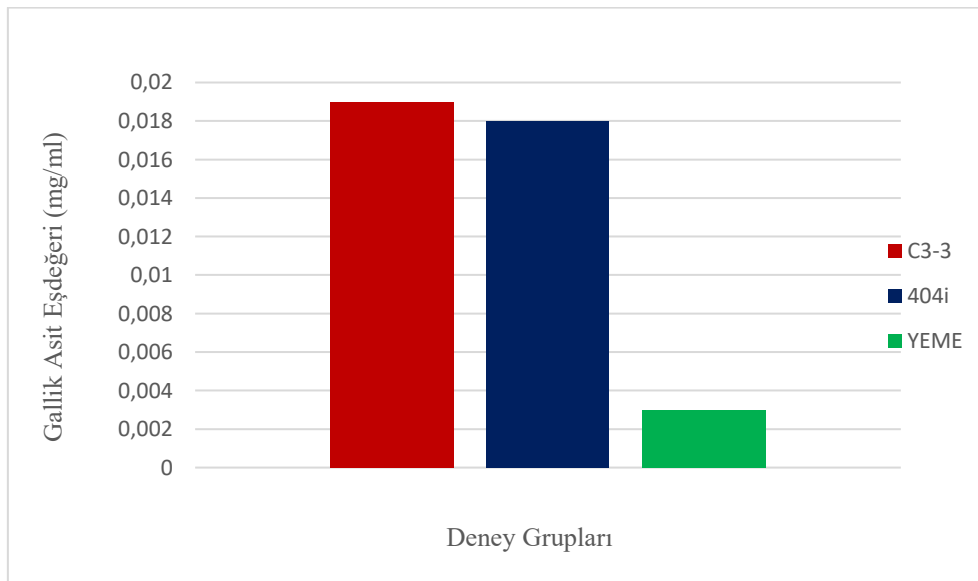
4.5. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

404i ve C3-3 izolatlarına ait liyofilize kültür sıvıları, farklı antioksidan aktivite yöntemlerinde denenmiş olup, elde edilen veriler bu başlığın altında ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir

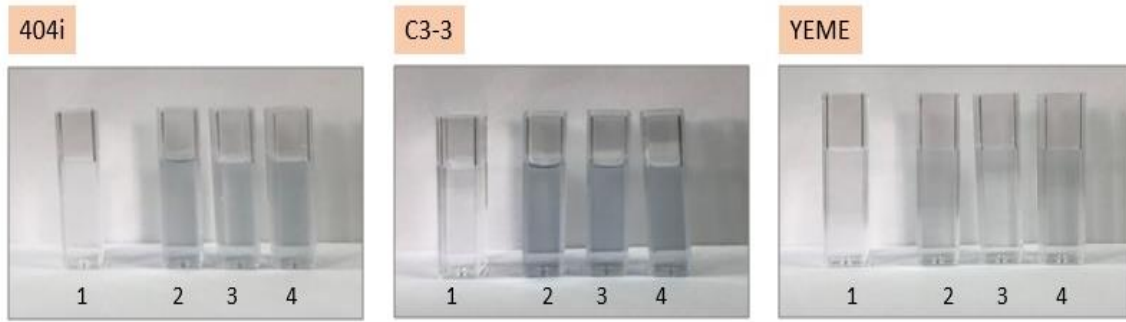
4.5.1. Toplam fenolik madde tayini

Her izolata ait toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Buna göre; gallik asitin standart eğri grafiğinden elde edilen formüle ait denkleme, her izolatın absorban değeri ile izolatların gallik asit eş değerleri olarak toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir (Singleton ve Rossi 1999).

İzolatların ve negatif kontrolün gallik asit eşdeğeri olarak belirlenen toplam fenolik madde miktarları Şekil 4.8’de, renk değişimi ise Şekil 4.9’da sunulmuştur.



Şekil 4.8 İzolatların ve negatif kontrolün toplam fenolik madde değerleri



Şekil 4.9 404i, C3-3 ve YEME besiyerine ait renk değişimi (1: Kör, 2,3,4: örneğe ait paralel çalışmalar)

Çalışmanın sonucunda 404i izolatı 0,018 mg/g, C3-3 izolatı 0,019 mg/g gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol ise 0,003 mg/g gallik asit eşdeğeri olarak oldukça düşük bir değer vermiştir. 404i ve C3-3 izolatı fenolik madde miktarı açısından oldukça düşük bir sonuç göstermiştir. Bu da Ikawa vd. (2003) toplam fenolik madde miktarı deneylerinin, toplam indirgeme kapasitesini ölçtüğüne dair öne sürdükleri fikir ile ileriki antioksidan aktivite belirleme çalışmalarından (spesifik olmayan) elde edilen sonuçların fenolik bileşiklerden kaynaklı olmayabileceğini ifade etmektedir.

Folin Ciocalteu reaktifinin toplam fenolik madde miktarının tayininde kullanıldığını başka çalışmalarda da görmekteyiz. Örneğin; Manasa vd. (2012) Hindistan Karnataka'dan izole ettikleri RAMPP065 *Streptomyces* sp. antimikrobiyal ve antioksidan kapasitesini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada toplam fenolik madde miktarını 'Folin-Ciocalteu method' ile gerçekleştirmişlerdir. Yöntemde, ekstrakt ve Folin reaktifini 1:1 oranında karıştırmışlardır ve üzerine 4 M kalsiyum karbonat ekleyip 15 dakika inkübe ettikten sonra 765 nm'de ölçüm yapmışlardır. Ekstraktın fenolik madde miktarını $59 \pm 0,88$ mg/g gallik asit eşdeğeri olarak bulmuşlardır.

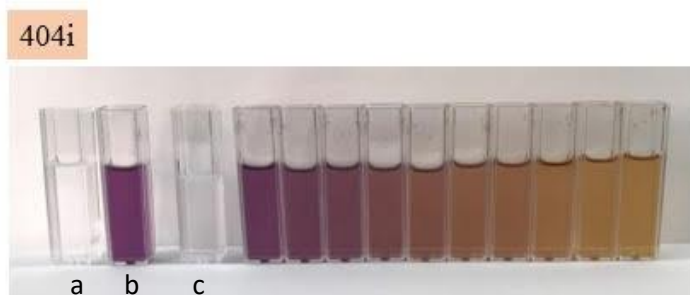
Başka bir çalışmada, *Streptomyces fradiae* GOS1 suşundan elde edilen metabolitlerin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Folin Ciocalteu reaktifi ile gerçekleştirilen yöntem gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Bütanol ile ekstraksiyon sonucunda elde edilen metabolitlerin fenolik madde miktarı 1,23 mg kuru metabolit/g gallik asit eşdeğeri olarak bulunmuştur (Gautham ve Onkarappa, 2013).

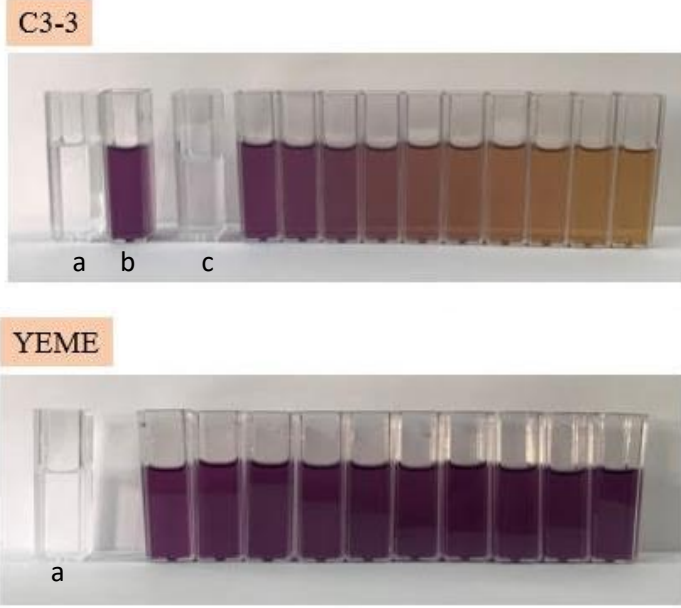
Sunulan çalışma sonuçları aktinomisetlerin farklı miktarlarda fenolik madde içerdiklerini ifade etmektedir. Fenolik madde miktarının, fenolik bir bileşik olduğu bilinen flavonoidlere göre daha fazla araştırıldığı görülmektedir. Narendhran vd. (2014) *Streptomyces cavouresis*'in antioksidan ve sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada toplam fenolik madde miktarının yanı sıra flavonoid madde miktarı da belirlenmiştir. Folin Ciocalteu reaktifi ile gerçekleştirilen yöntemin sonucunda ekstraktın fenolik madde içeriği 20,24 mg/g, flavonoid madde miktarı ise 26,60 mg/g metabolit olarak bulunmuştur. Bu çalışmada açıkça görülmektedir ki aktinomisetler yüksek miktarda flavonoid bileşikleri de üretebilmektedirler. Tüm bu çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre; 404i izolatı için 0,018 mg/ml ve C3-3 izolatı için 0,019 mg/ml gallik asit eşdeğeri sonuçları oldukça düşük fenolik madde miktarına işaret etmektedir.

4.5.2. DPPH radikal giderici aktivite

DPPH radikal giderici aktivite, antioksidanların radikal süpürücü aktivitesini değerlendirmek için geçerli, kolay ve ekonomik bir yöntem olarak kabul edilir. DPPH yöntemi temelde süpürme işleminin ölçülmesine dayanmaktadır (Kedare ve Singh, 2011). DPPH içindeki nitrojen atomuna ait elektron, antioksidanlardan gelen hidrojen atomu veya elektron ile diyamanyetik bir molekül haline gelmek için indirgenir (Contreras-Guzmán ve Strong, 1982; Blois, 1958). Bu nedenle DPPH radikal giderici aktivite, antioksidan belirleme çalışmalarında sıklıkla substrat olarak kullanılmaktadır (Duh vd., 1999).

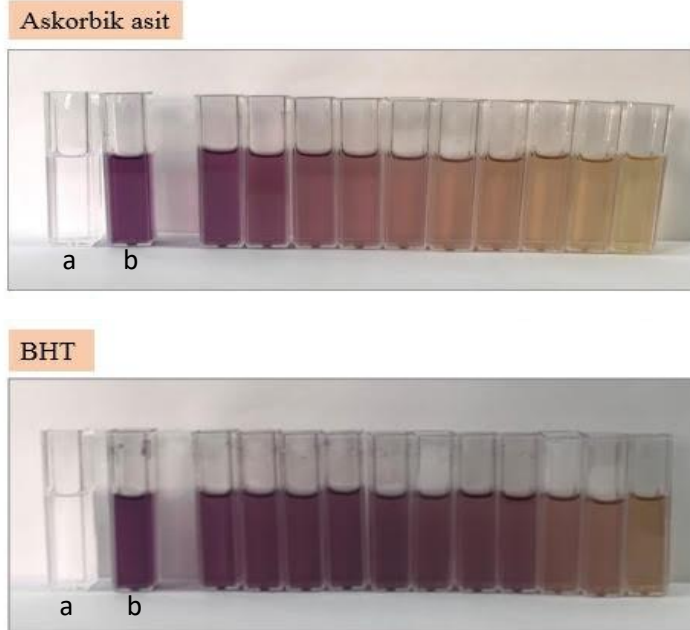
Yapılan DPPH radikal süpürücü aktivite deneyinde 404i ve C3-3 izolatlarının ve negatif kontrolün farklı konsantrasyonlardaki renk değişimleri Şekil 4.10'da verilmiştir. İzolatlara ait absorbanslardan EC_{50} değeri, 404i izolatında 16,59 mg/ml ve C3-3 izolatında 13,20 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan YEME besiyerinde ise aktivite görülmemiştir.





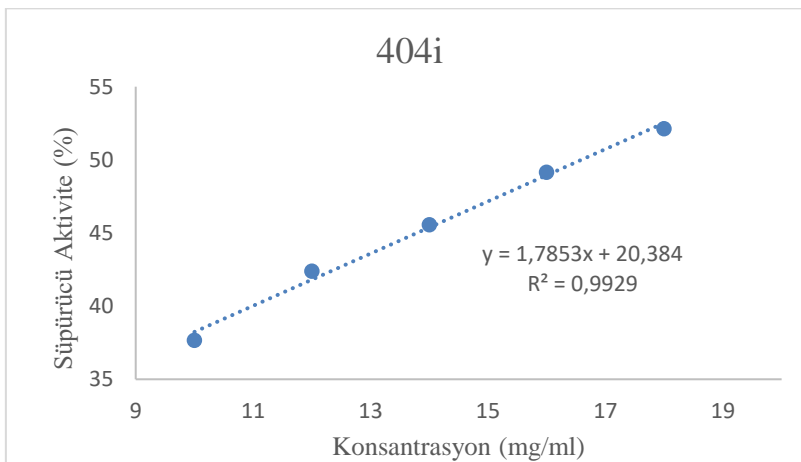
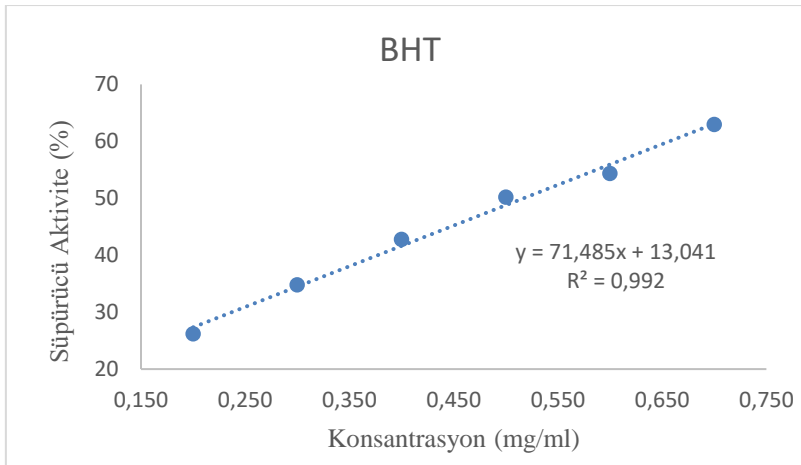
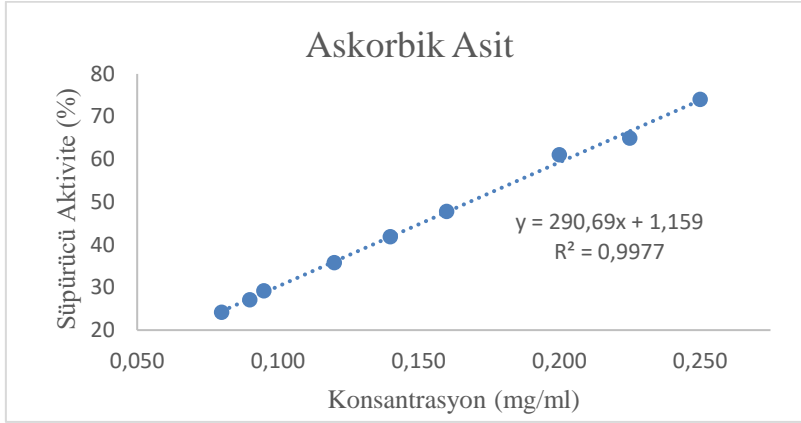
Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlardaki 404i, C3-3 izolatına ve YEME besiyerinin DPPH radikal süpürücü aktivitesine ilişkin renk değişimi (a: DPPH_{Kör}, b: DPPH, c: Deneyin körü)

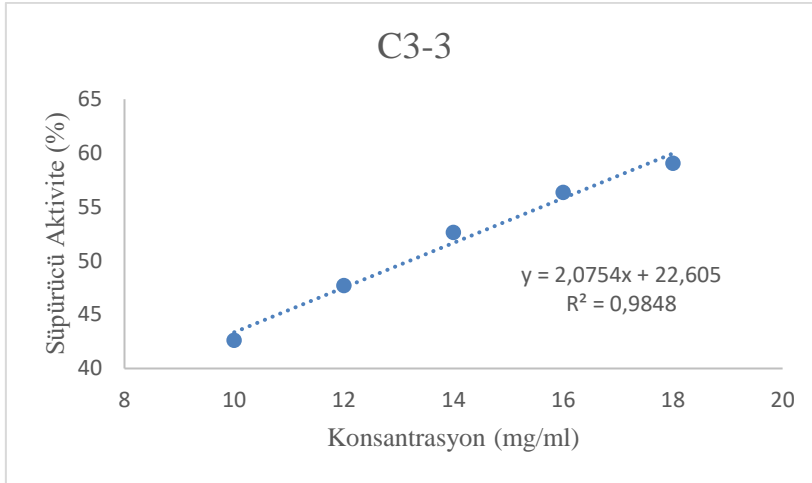
Pozitif kontrollerin renk değişimi Şekil 4.11’de verilmiştir. Askorbik asitin ve BHT’nin EC₅₀ değerleri ise sırasıyla 0,16 mg/ml ve 0,51 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11 Askorbik asit ve BHT’nin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesine ilişkin renk değişimi (a DPPH_{Kör}, b: DPPH)

İzolatların ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlardaki absorban değerlerinden elde edilen eğri grafikleri ve R^2 değerleri ve doğru denklemleri Şekil 4.12’de verilmiştir.





Şekil 4.12 Pozitif kontrollerin ve izolatların DPPH radikal süpürücü aktiviteleri

DPPH yöntemi aktinomisetlerin antioksidan kapasitesinin araştırılmasında birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar % inhibisyon değeri verirken, bazılarının EC₅₀ değerleri ile sonuçlar verdiğini görmekteyiz.

Streptomyces sp. PA9 suşundan elde edilen aktif metabolitlerin elde edilmesi, üretilmesi, karakterizasyonu, antimikrobiyal, antioksidan ve sivrisinek larvasına karşı larvasidal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada; PA9 suşundan elde edilen ekstraktın DPPH süpürücü aktivitesi %72 olarak bulunmuştur (Sivarajan vd., 2019). Kim vd. (2008) *Streptomyces lincolnensis* M-20 ile yapılan antioksidan aktivite çalışmasında 0.1-0.5 mM konsantrasyon serisinde 0,5 mM konsantrasyonda aktiviteyi yaklaşık %80 olarak bulmuşlardır. Kannabiran'ın (2012) Hindistandan izole ettiği *Streptomyces* sp. VITTK suşunun hücre dışı metabolitlerinin % DPPH radikal süpürücü aktivitesi 5 mg/ml'de %96, hücre içi metabolitlerinin ise aynı konsantrasyonda %22 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asitin 5 mg/ml'deki konsantrasyonunun aktivitesi ise %97'dir. Saurav ve Kannabiran, (2012) *Streptomyces* VITSKVK5 spp. ile yaptıkları çalışmada antioksidan aktiviteyi % 50,1 olarak bulmuşlardır. Tian vd. (2013) halofilik bir aktinomiset olan *Nocardiopsis gilva* YIM 90087 suşundan elde ettikleri p-terfenil antioksidan aktivitesini birçok yöntem kullanarak araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda p-terfenil 2mg/ml'de %54,90 ± 2,00 aktivite gösterirken, askorbik asit 0,8 mg/ml'de %43,9 ± 0,8 aktivite göstermiştir. Subathra vd. (2013) AC23 izolatının etil asetat ekstraksiyonu ile elde ettikleri ekstraktı ile yaptıkları çalışmada 20 mg/ml'de %60 inhibisyon değerine

ulaşmışlardır. Rao ve Rao (2013) *Streptomyces coelicoflavus* BC 01, BC 02, BC 03 ve BC 04 izolatlarının antioksidan aktivitesini incelemiştir. 20 µg/ml’de izolatların % aktiviteleri sırasıyla %68,91, %65,12, %46,41 ve %53,12; askorbik asitin ise %70,64 olarak bulunmuştur. Lee vd. (2014) MJM 10778 kodlu *Streptomyces* sp. izolatının DPPH radikal giderici aktivitesini araştırmışlardır. MJM 10778 izolatına ait ekstraktın IC₅₀ değerini ise 0,02 µg/ml olarak bulmuşlardır. *Streptomyces gancidius* VITSD1 izolatında yapılan antioksidan çalışması sonucunda en yüksek aktivite 5 mg/ml konsantrasyonda %65,00 ± 1,94 olarak bulunmuştur (Duraikannu vd., 2014). *Nocardiosis* sp. NCS1 izolatının antioksidan aktivitesi yapılan DPPH çalışması ile 20 µg/ml’de %83,20 ± 0,16 olarak bulunmuştur. 60 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda aktivite %100 olarak belirlenmiştir (Kamala vd., 2015). Sanjivkumar vd. (2016) *Sptreptomyces olivaceus* (MSU3) izolatı ile elde ettikleri sekonder metabolitlerin farmakolojik aktivitelerini incelemiştir. Araştırma kapsamında antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacı ile DPPH yöntemini kullanmışlardır ve sonuç olarak aktiviteyi %62.06 olarak belirlemişlerdir. El Sayed vd. (2016) *Streptomyces badius*’un antioksidan ve sitotoksik aktivitesini incelemiştir. Çalışmada maksimum antioksidan aktiviteyi 3 mg/ml’de %78,80 olarak 90. dakikada elde ederken; 1,50 mg/ml’de 60. dakikada IC₅₀ değerini elde etmişlerdir.

Manivasagan vd. (2013) *Streptomyces violaceus* MM72 izolatından elde ettikleri hücre dışı polisakaritlerin içeriğini araştırmış ve karakterize etmişlerdir. Farklı konsantrasyon serileri ile yaptıkları çalışma sonucunda IC₅₀ değerini 76,38 mg/ml olarak bulmuşlardır. Çalışmada kullandığımız 404i ve C3-3 izolatlarının EC₅₀ değerleri ise, sırası ile, 16,59 mg/ml ve 13,20 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki sonuç ile kıyaslandığı zaman bulduğumuz değer oldukça başarılı iken farklı çalışmalarda ise elde ettiğimiz sonuçlar diğer çalışmalara kıyasla oldukça yüksek kalmaktadır. Örneğin; sucül bir aktinomisetten izole edilen 2-aliloksifenolün izolasyonu ile yapılan DPPH çalışmasında IC₅₀ değeri 22,00 ± 0,12 µg/ml olarak bulunmuştur (Arumugam vd., 2010). Başka bir çalışmada Hindistan’ın Coromandel sahil bölgesinden izole edilen *Streptomyces* sp. B1244 izolatının IC₅₀ değeri 3,5 mg/ml olarak bulunmuştur (Kiruthika ve Nisshanthini, 2013). Yine bir başka çalışmada ise *Streptomyces* sp. R56-07 izolatının fermentasyon besiyerinden elde edilen JBIR-94 ve JBIR-125 adlı fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemi ile belirlenmiştir. JBIR-94 bileşiğinin EC₅₀ değeri 11.4 µM olarak hesaplanırken, JBIR-125 adlı fenolik bileşiğin EC₅₀ değeri 35,1 µM’dır (Kawahara vd., 2012).

Yukardaki çalışmaların tümü göstermektedir ki aktinomisetlere ait izolatların aktiviteleri izolasyon ortamına, tür ve suş farklılıklarına bağlı olarak değiştiği gibi deneylerde kullanılan farklı konsantrasyonlar, ekstraksiyon yöntemindeki solvent maddelerin değişimi ve aktif olan metabolitlerin farklılığı nedeniyle de değişmektedir. Tüm bu farklılıklara ve çalışmalara bakıldığı zaman elde ettiğimiz sonuçlar için kesin olarak yüksek veya düşüktür gibi bir çıkarım yapmak mümkün değildir. Fakat yüksek antioksidan gösteren izolatların seçimi yapılırken en yüksek aktiviteyi gösteren 404i izolatı ile en düşük aktiviteyi gösteren C3-3 izolatları karşılaştırıldığı zaman 404i izolatı daha yüksek bir değerde EC₅₀ değerine ulaşmıştır. Bu da kültür sıvısı ile yapılan çalışmalar ile liyofilize kültür sıvısı ile yapılan çalışmaların sonuçlarında farklılık olabileceğini göstermektedir. Aynı şekilde kültür sıvısı ile yaptığımız çalışmada negatif kontrol olan YEME besiyerinin % aktivitesi 15.86 iken liyofilize edilmiş besiyerinin aktivitesi çıkmamıştır. Bu sonuç 404i ve C3-3 izolatının gösterdiği aktivitenin tamamen izolatlara ait aktif metabolitlerden kaynaklandığını ifade etmektedir.

Sadece DPPH radikal süpürücü aktivite için değil çalışma kapsamında kullanılan tüm yöntemler için vurgulanması gereken bir nokta olarak, izolatlara ait biyoaktif metabolitlerin saf olarak değil, bir ham ekstrakt olarak araştırılması da elde edilen sonuçlarda birinci derecede etkindir.

4.5.3. Redükleyici güç tayini

İndirgeyici maddelerin tümü antioksidan olmamasına rağmen antioksidanların tümü indirgeyici maddelerdir (Prior ve Cao, 1999). Bir bileşiğin indirgeme gücü, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olabilir (Jung vd., 2008). Yapılan bu deneyde 404i ve C3-3 izolatlarına ait liyofilize kültür sıvıları ile antioksidan olduğu bilinen askorbik asit ve BHT'nin ferrik demiri (Fe³⁺) ferro demire (Fe²⁺) indirgeme kapasiteleri ölçülmüştür.

Yapılan çalışmanın sonucunda 404i izolatının aktif metabolitlerinin, ferrik demiri ferro demire indirgeme yeteneği göstermediği bulunmuştur. İzolatlara ve kontrol gruplarına ilişkin renk değişimleri Şekil 4.13'te sunulmuştur.

404i



C3-3



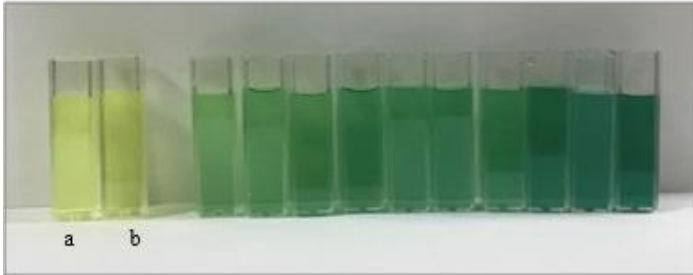
YEME



Askorbik asit



BHT



Şekil 4.13 Farklı konsantrasyonlarda izolat ekstaktların ve kontrollerin redükleyici güç aktivitesine ilişkin renk değişimi (a, b: deney gruplarına ait kör)

Hesaplanan EC_{50} değerleri C3-3 izolatında 9,64 mg/ml, YEME besiyerinde 18,45 mg/ml, askorbik asitte 0,05 mg/ml ve BHT’de 0,71 mg/ml olarak bulunmuştur. Negatif kontrolün EC_{50} değeri C3-3 izolatının neredeyse iki katı kadarken; pozitif kontrollerle arasında oldukça yüksek fark oluşmuştur. 404i izolatında hiçbir aktivitenin olmaması negatif kontrolde gözükken bu aktivitenin diğer izolatların aktivitesine herhangi bir etkisinin olmadığını kanıtlamaktadır. C3-3 izolatından elde edilen EC_{50} değeri pozitif kontrollere ait EC_{50} değerlerine yakın olmamasına rağmen bir aktivite göstermiştir.

Aktinobakterilerin sentezlediği gümüş nanoparçacıkların (AgNPs) antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada Shanmugasundaram vd. (2013) izole edilen parçacıkların 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda aktivitesinin askorbik asitin aktivitesinden yüksek olduğunu bulmuşlardır. Sowndhararajan ve Kang (2013) *Streptomyces* sp. AM-S1 izolatının etil asetat ekstraktı ile yaptıkları redükleyici güç deneyi sonucunda ekstraktın aktivitesini 1123,4 $\mu\text{mol Fe (II)/mg}$, BHT’nin aktivitesini ise 814,4 $\mu\text{mol Fe (II)/mg}$ olarak bulmuşlardır. Sucul bir tür olan *Streptomyces* LK3 suşu ile yapılan bir çalışma da ise yapılan redükleyici güç çalışmasında 200 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta %11,60 bir aktivite görülmüştür (Karthik vd., 2013). *Streptomyces violaceus* MM72 kodlu izolatın hücre dışı polisakkaritleri ile yapılan redükleyici güç çalışmasında Manivasagan vd. (2013) yaklaşık 0,5 mg/ml’de 0,5 absorbans değerini elde etmişlerdir. Rao ve Rao (2013) mangrove toprağından izole ettikleri *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 izolatının redükleyici güç kapasitesini çalışmışlardır. BO1 izolatının redükleyici güç kapasitesini 5, 10, 15 ve 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda sırasıyla 64,00 $\mu\text{g/ml}$, 68,67 $\mu\text{g/ml}$, 72,00 $\mu\text{g/ml}$ ve 78,00 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulmuşlardır.

Nocardioopsis sp. NCS1 izolatında yapılan bir çalışmada Kamala vd. (2015) ekstraktın farklı konsantrasyonlarının (20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml) etkisini askorbik asit eşdeğeri olarak hesaplamışlardır. Buna göre en yüksek konsantrasyonda aktiviteyi 30 µg/ml askorbik asit eşdeğeri olarak bulmuşlardır. *Streptomyces olivaceus* (MSU3) izolatından elde edilen sekonder metabolitlerin farmakolojik çalışmalarının yapıldığı bir araştırmada redükleyici güç yöntemi antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Deney sonucunda redükleyici güç etkisi %32,51 olarak bulunmuştur (Sanjivkumar vd., 2016). *Streptomyces thermovulgaris* TISTR 1948 izolatının redükleyici güç aktivitesi 1097.87 µM troloks/L eş değeri olarak belirlenmiştir (Seesuriyachan vd., 2017).

Başka araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen bu çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda yüksek aktiviteler elde edilmiştir. Neredeyse tüm çalışmalarda mikrogram cinsinden elde edilen sonuçlar C3-3 izolatının gösterdiği miligram cinsi sonuca göre oldukça başarılıdır.

Lee vd. (2014) *Streptomyces* sp. MJM 10778 suşu ile antioksidan aktiviteyi araştırmışlardır. Etil asetat ile ekstrakte edilen izolatın redükleyici güç tayinini çalışmada 500 µg/ml'de yaklaşık %80 aktivite elde etmişlerdir. Yine Lee vd. (2014) aynı türün MJM 8637 kodlu farklı şusu ile farklı araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada ise yine aynı yöntem ile gerçekleştirdikleri redükleyici güç çalışmasında ekstraktın IC₅₀ değerini 1000 µg/ml'de 1271,5 µg/ml olarak bulmuşlardır. Bu iki çalışmada redükleyici güç tayininde benzer yöntemleri kullanmamıza rağmen; C3-3 izolatında elde ettiğimiz EC₅₀ değeri (9,64 mg/ml) bu çalışmalardan elde edilen değerlere göre oldukça yüksek kalmaktadır.

Literatürdeki araştırmalara bakılarak bu yöntemin sıklıkla tercih edildiği ve aktinomisetlerden elde edilen metabolitlerin bu yöntemde oldukça başarılı olduğu görülmektedir. Fakat yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatların belirlendiği çalışmada başarı gösteren 404i izolatının redükleyici güç yönteminde hiçbir aktivite göstermediği; en düşük aktiviteyi gösteren C3-3 izolatının ise bu yöntemde oransal olarak başarılı olduğunu söyleyebiliriz.

4.5.4. Beta karoten – linoleik asit antioksidan aktivite tayini

Yöntem, emülsiyonda linoleik asidin oksidasyonu sonucu oluşan serbest radikallerin beta karotenin turuncu renginin kaybolmasına dayanmaktadır. Eğer ortamda antioksidan maddeler varsa beta karotenin renginin ağarma oranı yavaşlatılabilir (Lu vd., 2014).

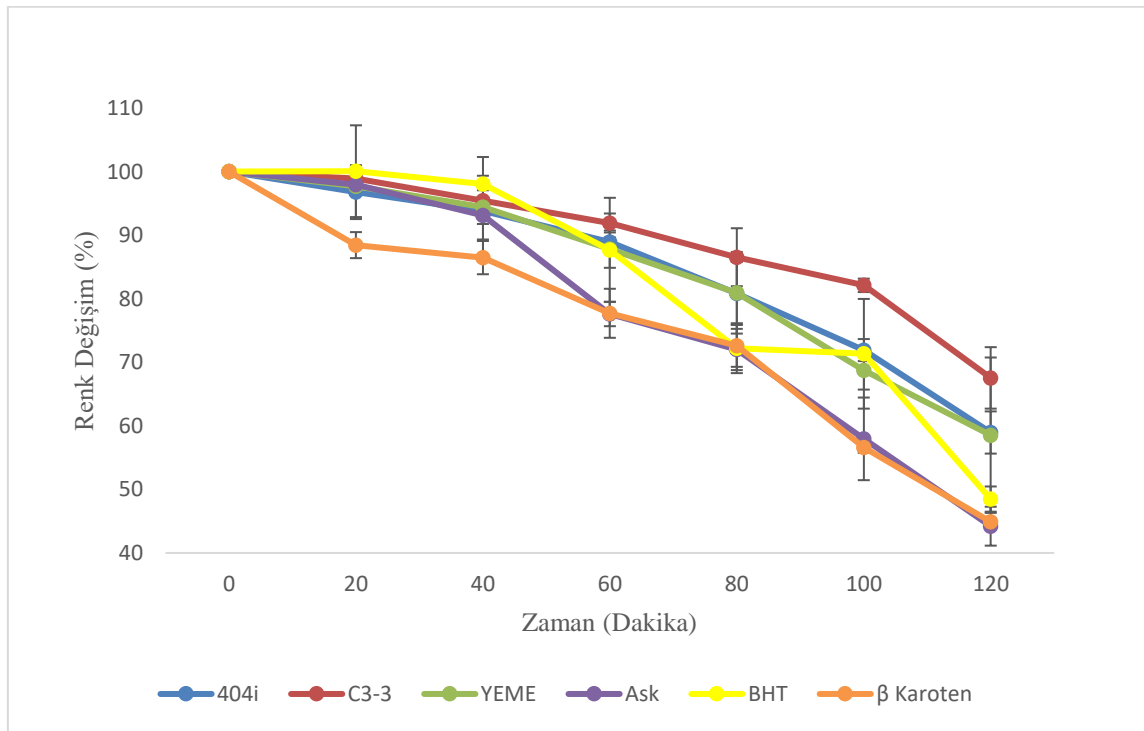
404i izolatu 120. dakikanın sonunda beta karotenin rengini %59 korurken, C3-3 izolatu 120. dakikanın sonunda %68 korumuştur. Pozitif kontrol gruplarında ise 120. dakikadaki beta karotenin renk değişimi %50'nin altına düşmüştür. BHT'nin negatif kontrolü olan metanolde herhangi bir aktivite olmamıştır. Hiçbir madde eklenmeden sadece beta karotenin zamana bağlı oluşan renk değişimi ise 100. dakikada %58'e kadar düşmüştür. YEME besiyerinin ise tek başına neredeyse 404i izolatu kadar bir koruma sağladığı görülmektedir. Tüm bu veriler bir arada değerlendirildiği zaman her iki izolatta askorbik asit ve BHT'ye göre beta karotenin renk değişimini önemli ölçüde azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Fakat izolatların ve kontrol gruplarının içinde, zamana bağlı beta karotenin rengindeki ağarmayı en aza indiren örnek C3-3 izolatıdır. Ölçüm aralıklarına göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13'te % renk değişimlerine ait grafik ise Şekil 4.14'te sunulmuştur.

Literatürde beta karoten ağartma testleri, agar difüzyon yöntemi ve spektrofotometrik yöntem olarak iki farklı şekilde kullanılmaktadır (Dapkevicius vd., 1998). Karthik vd. (2013) tarafından *Streptomyces* LK-3 suşu ile yapılan bir çalışmada agar difüzyon yöntemi kullanılarak, beta karotenin renk değişimi araştırılmıştır. Yöntem antioksidan varlığında beta karotenin renginin açılması ile oluşan petrideki zonların ölçülmesine dayanmaktadır. Araştırmanın sonucunda ekstraktın oluşturduğu zon 12 mm olarak hesaplanmıştır.

Aktinomisetlerle yapılan beta karoten – linoleik asit antioksidan aktivite deneylerinde sıklıkla spektrofotometrik yöntemin kullanıldığını görmekteyiz. Savi vd. (2015) tarafından endofitik aktinomisetlerin ikincil metabolitleri ile yapılan bir çalışmada spektrofotometrik yöntem kullanılarak beta karotenin renk değişimi araştırılmıştır. Yöntemin uygulanması aşamasında, 120 dakika ölçüm yapılarak 470 nm'de absorbanslar okunmuştur. Çalışmanın sonucunda, LGMB255 izolatının EC₅₀ değerini 163,90 µg/ml olarak bulmuşlardır ve Chen vd. (2011) tarafından bildirilen sonuçlara bu değeri eş değer olarak bildirmişlerdir.

Yine spektrofotometrik bir yöntem kullanarak beta karotenin renk değişimini araştıran Saini ve Gangwar (2017), *Syzygium cumini*'den izole edilen endofitik aktinomisetlerin etil asetat ekstraktlarının beta karoten renk değişimini %50 inhibisyon değeri olarak vermişlerdir. Bu sonuca göre 120. dakikada etil asetat ekstraktının IC₅₀ değerini $236,39 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ olarak bulurken, askorbik asitin IC₅₀ değerini $1030,27 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ olarak bulmuşlardır.

Streptomyces sp. Loyola AR1 izolatının antioksidan özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada Kumar vd. (2014) tarafından beta karoten – linoleik asit yöntemi spektrofotometrik yöntem kullanılarak çalışılmıştır. Etil asetat ekstraktının IC₅₀ değerini 120. dakikada $580,20 \pm 1,43 \mu\text{g/ml}$ olarak, BHA'nın ise 120. dakikadaki IC₅₀ değerini $230,12 \pm 1,48 \mu\text{g/ml}$ olarak bulmuşlardır



Şekil 4.14 Zamana bağlı izolatların (404i, C3-3), YEME besiyerinin ve pozitif kontrollerin beta karotene ilişkin renk değişimi (%)

Çizelge 4.13 Zamana bağlı izolatlarnın (404i, C3-3), YEME besiyerinin ve pozitif kontrollerin beta karotene ilişkin renk değişimi (%)

Dakika	404i		C3-3		YEME		Askorbik Asit		BHT		β Karoten	
	%	SS	%	SS	%	SS	%	SS	%	SS	%	SS
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
20	96,77	4,24	98,91	1,20	97,70	1,17	97,96	1,09	100,06	7,22	88,43	2,05
40	93,80	4,49	95,45	0,51	94,41	2,65	93,13	6,22	98,02	4,28	86,47	2,62
60	88,93	0,72	91,9	1,50	87,80	2,93	77,61	1,93	87,68	8,20	77,71	3,86
80	80,8	4,95	86,530	4,56	80,94	6,42	72,01	3,25	72,22	3,92	72,60	3,31
100	71,92	1,74	82,10	1,06	68,7	3,03	57,95	6,50	71,34	8,63	56,60	0,84
120	58,95	3,32	67,54	4,83	58,53	12,23	44,21	3,06	48,48	1,99	44,89	0,59

SS: Standart sapma değeri

Saini vd. (2015) tarafından endofititik bir aktinomiset olan A12 izolatı ile yapılan çalışmada spektrofotometrik yöntem kullanılarak beta karotenin renk değişimi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda 120. dakikadan sonra %50 inhibisyon (IC_{50}) gösteren değeri $420,12 \pm 1,50 \mu\text{g/ml}$ olarak bulmuşlardır.

Streptomyces carpaticus MK-01 suşunun etil asetat ekstraktı ile yapılan deneyde beta karoten renk değişimi spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyde pozitif kontrol olarak BHT kullanılmıştır ve sonuçlar %50 sitotoksik konsantrasyon (CC_{50}) değeri olarak verilmiştir. Araştırmanın sonucunda MK-1 suşunun CC_{50} değeri $84,50 \mu\text{g/ml}$, BHT'nin ise $64,75 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (Subramanian vd., 2017).

Streptomyces sp. Loyola UGC suşu ile beta karoten renk değişimi spektrofotometrik yöntem olarak çalışılmıştır. Elde edilen IC_{50} değerleri *Streptomyces* sp. izolatı için $420,12 \pm 1,50 \mu\text{g/ml}$ iken BHA için $220,30 \pm 1,48 \mu\text{g/ml}$ 'dir (Christhudas vd., 2013).

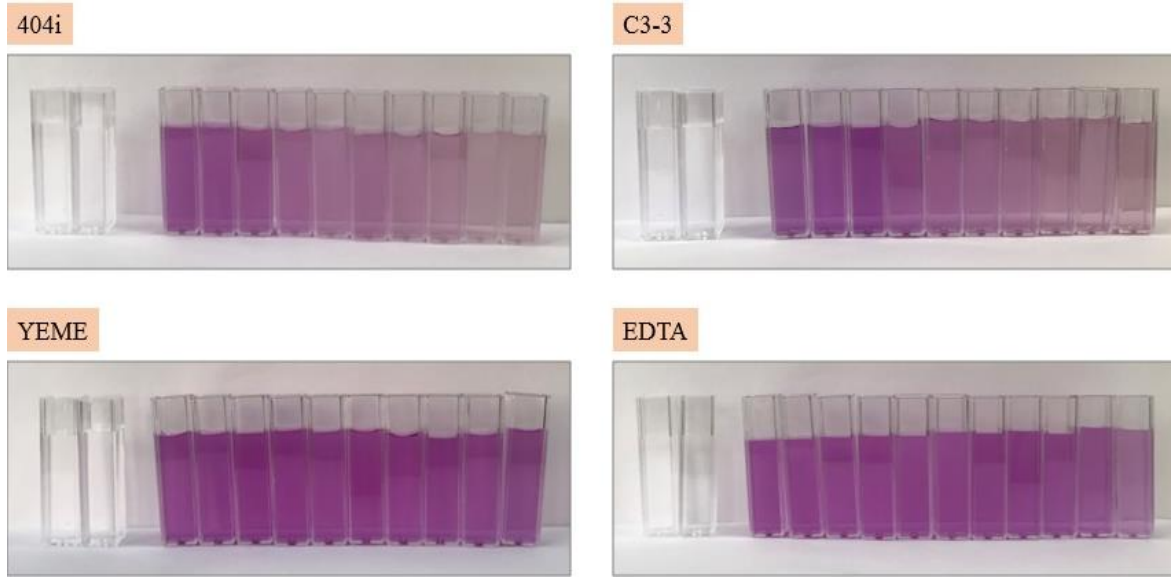
Streptomyces pylosus'tan izole edilen deferoksaminin (DFO) antioksidan içeriğinin araştırıldığı çalışmada, beta karotenin renk değişimi 450 nm 'de ölçülmüştür. Elde edilen sonuca göre $15 \mu\text{M}$ defoeroksamin ile $1,7 \text{ mM}$ BHA hemen hemen aynı absorbans sonuçlarını vermiştir (Shimoni vd., 1994).

Endofititik bir aktinomiset olan NAF-1 izolatına ait ekstrakt ile yapılan beta karoten renk değişimi çalışmasında elde edilen IC_{50} sonuçları NAF-1 ekstraktında $5,15 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$, BHT'de $4,30 \pm 0,33 \mu\text{g/ml}$ ve kersetin için $0,95 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır (Nafis vd., 2018).

Literatürdeki çalışmaların çoğunda %50 inhibisyon değerleri verilerek sonuçlar ifade edilmiştir. Bu çalışmalarda açıkça aktinomisetlerin pozitif kontrollere karşı daha başarılı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda 120. dakikada 404i ve C3-3 izolatının her ikisinde de pozitif kontrollere karşı daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç farklı araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir.

4.5.5. Metal şelatlayıcı aktivite tayini

İzolatlara ait metabolitlerin şelatlama gücünün ferrozine göre yüksek olduğunu, demire ferrozinden önce bağlanmaları nedeniyle oluşan kırmızı rengin açılması sonucunda görmekteyiz. İzolatlara ve kontrol gruplarına ait renk değişimi Şekil 4.15’te sunulmuştur.



Şekil 4.15 Metal şelatlama aktivitesinde izolatlara ve kontrol gruplarına ait renk değişimi

İzolatların ve YEME besiyerinin şelatlayıcı aktiviteleri Çizelge 4.14’te ve Şekil 4.16’da sunulmuştur. Elde edilen absorbans sonuçlarına bakılarak YEME besiyeri şelatlayıcı aktivite göstermemiştir. 404i izolatı 0,4 mg/ml konsantrasyondan, C3-3 izolatı ise 0,5 mg/ml konsantrasyondan sonra %100 şelatlayıcı aktiviteye ulaşmışlardır.

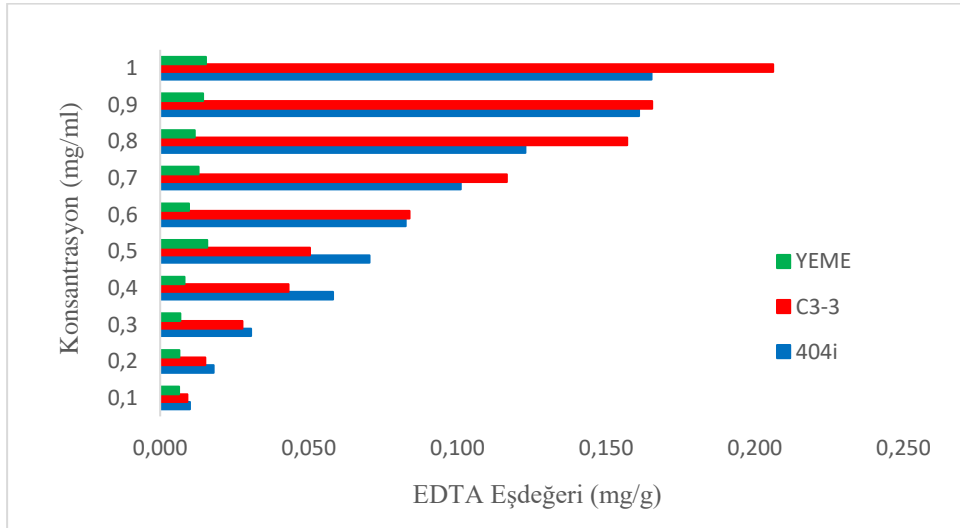
EDTA’nın EC_{50} değeri 0,029 mg/ml iken 404i izolatının EC_{50} değeri 0,302 mg/ml, C3-3 izolatının EC_{50} değeri 0,291 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakılarak pozitif kontrolün şelatlama aktivitesi izolatların yaklaşık on katı kadardır. C3-3 izolatı ise 404i izolatına göre daha yüksek bir şelatlama aktivitesine sahiptir.

Karthik vd. (2013) tarafından *Streptomyces* cinsi bir bakteriye ait ekstraktı kullanarak yaptıkları metal şelatlayıcı aktivite deneyinde IC_{50} değerini 70,71 $\mu\text{g/ml}$, % metal şelatlayıcı aktiviteyi ise çalıştıkları 25, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ ’de yaklaşık olarak sırasıyla %30, %40, %70 ve %80 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen IC_{50} değeri bizim elde ettiğimiz

EC₅₀ değerine (C3-3 izolatında 0,29 mg/ml ve 404i değeri 0,30 mg/ml) göre daha başarılı olmuştur.

Çizelge 4.14 İzolatların ve YEME besiyerinin şelatlayıcı aktivite sonuçları

Konsantrasyon (mg/ml)	Şelatlayıcı Aktivite (%)			EDTA eşdeğeri (mg/g)		
	404i	C3-3	YEME	404i	C3-3	YEME
0,1	12,40	10,81	5,28	0,010	0,009	0,006
0,2	28,23	22,66	5,49	0,018	0,015	0,006
0,3	53,33	47,47	5,98	0,031	0,028	0,007
0,4	108,05	78,33	8,76	0,058	0,043	0,008
0,5	191,08	92,62	24,03	0,070	0,050	0,016
0,6	156,47	159,11	11,80	0,083	0,084	0,010
0,7	193,14	224,09	18,25	0,10	0,12	0,013
0,8	236,30	304,36	15,65	0,12	0,16	0,012
0,9	320,47	321,03	21,20	0,16	0,17	0,014
1	312,23	401,66	23,06	0,17	0,21	0,015



Şekil 4.16 İzolatların ve YEME besiyerinin EDTA eşdeğeri sonuçları (mg/g)

Streptomyces violaceus MM72 izolatının hücre dışı polisakkaritlerinin metal şelatlayıcı aktivitesini inceleyen Manivasagan vd. (2013) çalışmada 0,0-1,2 mg/ml seri

konsantrasyonlar ile çalışmışlardır. Deneyde pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanmışlar ve elde ettikleri sonuçları % şelatlayıcı aktivite olarak sunmuşlardır. Sonuçlara göre askorbik asit 1 mg/ml'de %100 aktivite gösterirken, MM72 izolatından elde edilen hücre dışı polisakkaritler aynı konsantrasyonda %70 şelatlayıcı aktivite göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız pozitif kontrol olan EDTA, askorbik asite göre daha başarı iken, 404i ve C3-3 ekstraktları MM72 izolatının çalışıldığı 1 mg/ml konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonlarda daha başarılı olmuştur.

Sucul bir *Streptomyces* sp. olan VITSTK7 izolatının, araştırılan metal şelatlayıcı aktivitesinde pozitif kontrol olarak EDTA kullanılmış ve sonuçlar % inhibisyon değerleri olarak sunulmuştur. Bu çalışmaya göre etil asetat ekstraktının çalışılan 10-50 mg/ml seri konsantrasyonlarında yaklaşık olarak %50-60 aktivite gösterdiği pozitif kontrolüne aktivitesi %60-90 aralığında olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Thenmozhi ve Kannabiran, 2012). Çalışmada kullandığımız her iki izolatta bu çalışmada kullanılan konsantrasyonlardan oldukça düşük konsantrasyonlarda daha yüksek aktivitelere ulaşmıştır (Çizelge 4.7).

Streptomyces fradiae cinsine ait GOS1 izolatının n-bütenol ekstraksiyonu ile elde edilen metabolitleri ile yapılan metal şelatlayıcı aktivite deneyinde 200 µg/ml'de EDTA'nın şelatlayıcı aktivitesi %70,48 n-bütenol ekstraktının ise %39,54 olarak bulunmuştur (Gautham ve Onkarappa, 2013). Çalışmamızda kullandığımız 404i ve C3-3 izolatı, GOS1 izolatı ile aynı konsantrasyonlarda %28,24 ve %22,66 metal şelatlayıcı aktivite göstermiştir.

Tan vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, *Streptomyces* sp. MUM212 izolatına ait ekstraktın metal şelatlayıcı aktivitesi 0,25 mg/ml'de $9,17 \pm 1,16$ iken 0,5 mg/ml'de $16,79 \pm 1,75$ ve 1 mg/ml'de $25,01 \pm 1,54$ olarak bulunmuştur. MUSC136 kodlu yeni bir tür olan *Streptomyces malaysiense* sp. izolatı $10,22 \pm 1,58$ şelatlayıcı aktiviteyi 0,25 mg/ml'de, $17,00 \pm 3,73$ şelatlayıcı aktiviteyi 0,5 mg/ml'de ve $22,97 \pm 1,51$ şelatlayıcı aktiviteyi 1 mg/ml'de göstermiştir. EDTA 0,025 mg/ml'de $43,25 \pm 2,70$ şelatlayıcı aktivite göstermiştir (Ser vd., 2016). *Streptomyces gilvigriseus* MUSC 26 izolatı ile Ser vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada izolata ait ekstraktın metal şelatlayıcı aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml ve 1 mg/ml konsantrasyonlarda elde edilen sonuçlar sırasıyla $16,07 \pm 1,27$, $32,79 \pm 2,29$ ve $49,71 \pm 2,66$ olarak bulunmuştur. Bu üç çalışmada da ortak olarak kullanılan 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml ve 1 mg/ml konsantrasyonlarda

elde edilen sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre oldukça düşük kalmaktadır (Bkz. Çizelge 4.7).

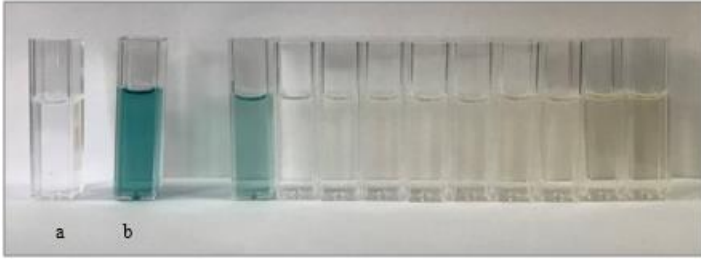
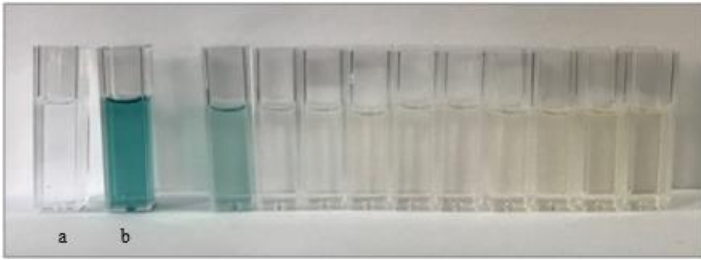
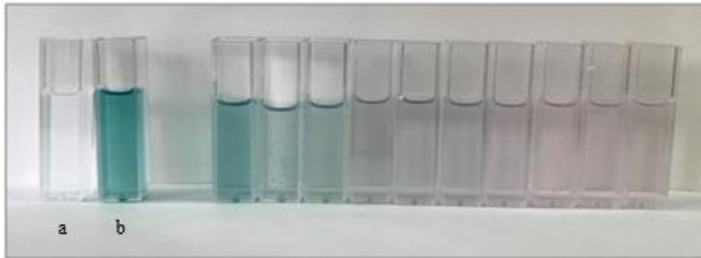
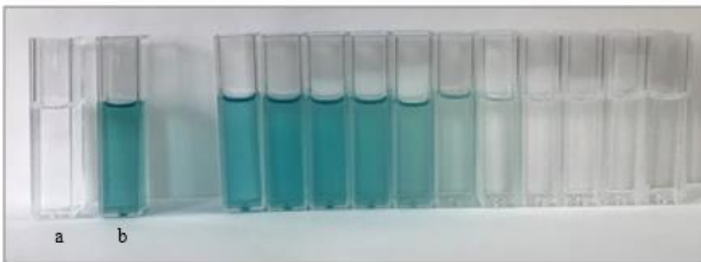
Manivasagan vd. (2013) *Streptomyces* sp. MAB18 suşu tarafından üretilen proteazın, metal şelatlayıcı aktivitesi araştırılmışlardır. Çalışmada üretilen proteazın 0,0- 3,5 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarını çalışarak EDTA ile karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre EDTA 3 mg/ml'de %100 şelatlayıcı aktiviteye ulaşırken proteaz 3,5 mg/ml'de %100 şelatlayıcı aktiviteye ulaşmıştır. 404i ve C3-3 izolatları aynı aktiviteyi sırası ile 0,4 mg/ml'de ve yaklaşık olarak 0,5 mg/ml'de göstermiştir.

404i ve C3-3 izolatının % metal şelatlayıcı aktivitesi literatürdeki çalışmalara göre başarılı olduğu açıkça görülmektedir. Bu da bize izolatlara ait aktif metabolitlerin, ferrozine göre şelatlama gücünün daha fazla olduğunu göstermektedir. Demir iyonları Fenton reaksiyonu ile peroksitlerden serbest radikaller üretebilir ve bu nedenle lipit peroksidasyonun da önemli rol oynamaktadırlar (Chang vd., 2002). Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, demirin şelatlanması ile Fenton reaksiyonunun oluşmasının engellendiğini ve 'Lipit Peroksidasyonu' başlığı altında ayrıntılı bir şekilde araştırılan lipitlerin peroksidasyonu için olumlu sonuçlar elde edilebileceğine işaret etmektedir.

4.5.6. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi

Çalışmada kullanılan izolatların, pozitif ve negatif kontrollerin renk değişimleri Şekil 4.17'de sunulmuş olup; elde edilen absorbans değerleri ile sonuçlar % radikal inhibisyonu (Şekil 4.18) ve EC₅₀ değeri olarak hesaplanmıştır. EC₅₀ değeri 404i izolatında 0,082 mg/ml, C3-3 izolatında 0,073 mg/ml, YEME besiyerinde 0,356 mg/ml, askorbik asitte 0,004 mg/ml ve BHT'de 0,020 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol olan YEME besiyerinin, ABTS radikalinin renk gideriminde etkisinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu da 404i ve C3-3 izolatlarına ait aktivitenin metabolitlerden kaynaklı olduğunu ifade etmektedir. İzolatlara ait aktivitenin, askorbik asitin aktivitesine göre BHT'nin aktivitesine daha yakın olduğu görülmektedir. İzolatlar arasındaki EC₅₀ değerlerine bakıldığında zaman yaklaşık 0,010 mg/ml farkla C3-3 izolatının 404i izolatına göre nispeten daha başarılı olduğunu söyleyebiliriz.

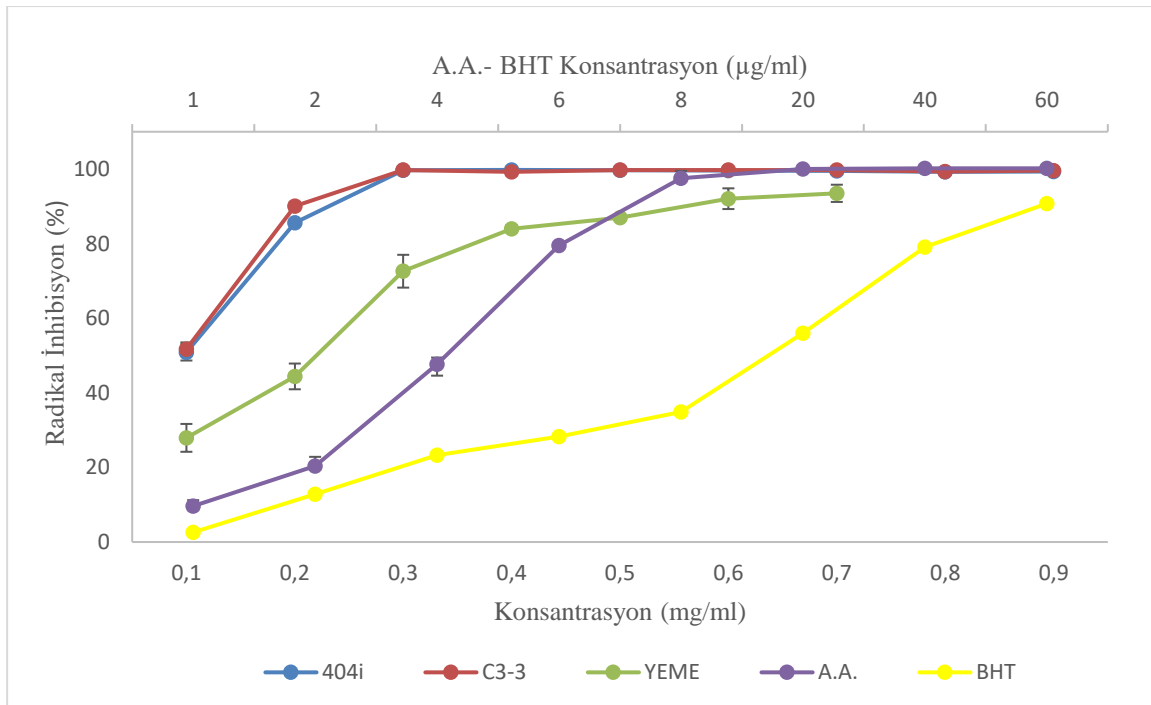
404i ve C3-3 izolatlarının % radikal inhibisyonları yaklaşık olarak 0,3 mg/ml'de %100 aktiviteye ulaşırken, YEME besiyeri yaklaşık %90 aktiviteye 1 mg/ml'de ulaşmıştır. Pozitif kontrol olan askorbik asit 10 µg/ml'de %100 aktivite gösterirken, BHT 100 µg/ml'de yaklaşık %93 aktivite göstermiştir.

404i**C3-3****YEME****Askorbik asit**

BHT



Şekil 4.17 ABTS radikal kasyon renksizleştirme yönteminde renk değişimi (a: Kör, b: ABTS)



Şekil 4.18 ABTS radikal kasyon renksizleştirme yönteminde % radikal inhibisyon (A.A.: Askorbik asit)

Tan vd. (2019) tarafından *Streptomyces* MUM265 izolatı ile yapılan çalışmada, izolata ait ekstraktın % radikal inhibisyon değeri 0,125 mg/ml'de $40 \pm 3,17$ ve 4 mg/ml konsantrasyonda $88,50 \pm 0,07$ olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan konsantrasyonlardan daha düşük konsantrasyon aralığında (0,1-1,0 mg/ml) 404i ve C3-3 izolatının her ikisi de daha yüksek aktiviteler göstermiştir.

Streptomyces malaysiense sp. ile yapılan antioksidan aktivite çalışmasında, ekstraktın 2 mg/ml'deki ABTS katyon renksizleştirme inhibisyonu $27,87 \pm 2,19$ olarak bulunmuştur (Ser vd., 2016). Halofilik bir aktinomiset olan *Nocardiopsis gilva* YIM 90087 izolatının 15 farklı metaboliti ile yapılan çalışmada 1 numaralı metabolit 1 mg/ml'de $68,60 \pm 1,00$, 3 numaralı metabolit 2 mg/ml'de $28,40 \pm 2,07$, 4 numaralı metabolit 0,5 mg/ml'de $78,20 \pm 3,70$ ve 8 numaralı metabolit 2 mg/ml'de $54,60 \pm 0,6$ ABTS radikal inhibisyonu göstermişlerdir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit ise 0,16 mg/ml'de $79,1 \pm 4,3$ inhibisyon göstermiştir (Tian vd., 2013).

Yapılan bu iki araştırmada sonuçlar % radikal inhibisyonu olarak verilmiştir. Verilen bu sonuçlara göre 404i ve C3-3 izolatının her ikisi de bu çalışmalardaki izolatlarla göre daha başarılı sonuçlar göstermiştir.

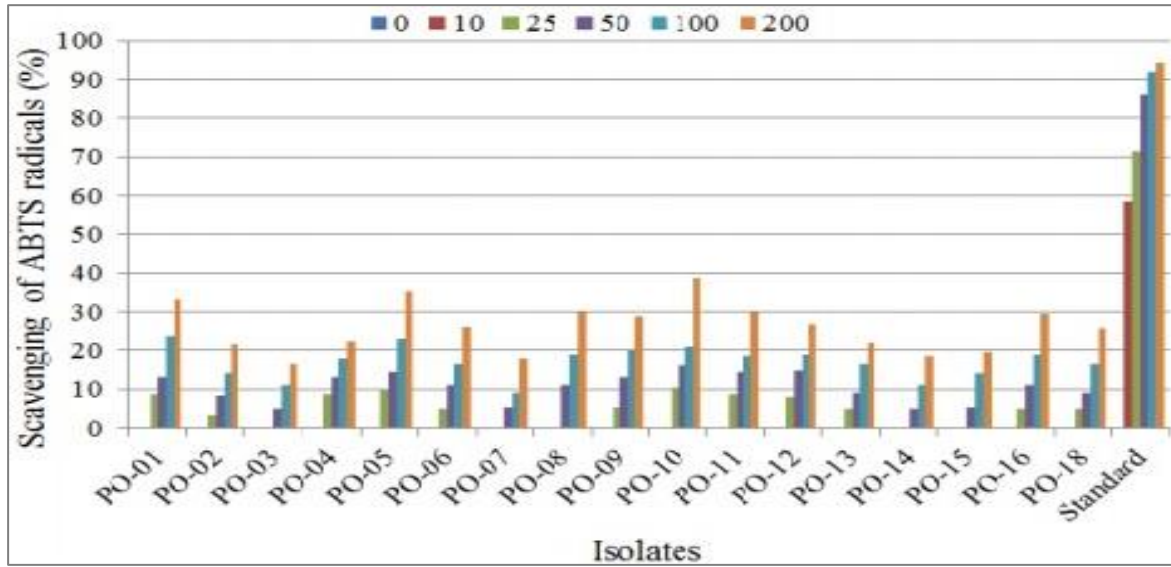
Streptomyces Eri12 izolatının etil asetat ekstraktı kullanılarak Zhong vd. (2011) tarafından gerçekleştirilen ABTS radikal katyon renksizleştirme çalışmasında IC_{50} değeri 172,43 μ g/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz EC_{50} değerleri ise 404i izolatında 0,082 mg/ml, C3-3 izolatında 0,073 mg/ml olarak, bu çalışmada kullanılan Eri12 izolatına göre oldukça başarılıdır.

Streptomyces glaucescens NEAE-H izolatından elde edilen melanin pigmentinin antioksidan aktivitesini araştıran El-Naggar ve El-Ewasy (2017) ABTS katyon renksizleştirme yönteminde 0,1 mg/ml konsantrasyonda melanin pigmentinin aktivitesini %57,20 bulurken aynı konsantrasyonda askorbik asitin aktivitesini %89,60 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda 404i ve C3-3 izolatının % radikal inhibisyonları 0,1 mg/ml'de sırası ile %50,86 ve %51,74 olarak bulunmuştur. Antioksidan aktivitesi araştırılan NEAE-H izolatından elde edilen melanin pigmentinin, % radikal inhibisyon sonucu nispeten 404i ve C3-3 izolatından yüksektir.

Kekuda vd. (2015) tarafından 18 farklı *Streptomyces* sp. suşu ile yapılan çalışmada ABTS radikal katyon renksizleştirme deneyi sonuçları % ABTS radikali (Şekil 4.19) ve IC_{50} değeri (Çizelge 4.15) olarak sunulmuştur.

Kekuda vd. (2015) tarafından 18 farklı *Streptomyces* suşu ile gerçekleştirilen çalışmanın sonucunda elde edilen veriler 404i ve C3-3 izolatı ile yapılan aynı çalışmaya göre

oldukça düşük kalmaktadır. En yüksek % ABTS radikali PO-10 suşunda 200 µg/ml'de yaklaşık %40 iken IC₅₀ değeri 275,08 µg/ml olarak bulunmuştur. Aynı konsantrasyonda 404i ve C3-3 izolatlarının radikal inhibisyonları ise %85,64 ve %90,08 olarak bulunmuştur. 18 izolat içindeki en yüksek aktivite sonuçlarını gösteren PO-10 suşu 404i ve C3-3 izolatından oldukça düşük aktivite göstermektedir.



Şekil 4.19 Farklı *Streptomyces* sp. suşlarına ait % ABTS radikali (Kekuda vd., 2015)

Çizelge 4.15 ABTS radikal katyon renksizleştirme yönteminde farklı *Streptomyces* sp. suşuna ait IC₅₀ değerleri (Kekuda vd., 2015)

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)	Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)
PO-1	311,44	PO-10	275,08
PO-2	478,77	PO-11	375,03
PO-3	645,54	PO-12	432,09
PO-4	571,10	PO-13	482,26
PO-5	297,90	PO-14	553,64
PO-6	403,31	PO-15	537,16
PO-7	595,24	PO-16	344,89
PO-8	361,30	PO-18	403,88
PO-9	360,57	Standart	6.88

Literatürde aktinomisetlere ait liyofilize kültür sıvısı kullanılarak da ABTS radikal katyon renksizleştirme yönteminin çalışıldığını görmekteyiz. Örneğin; Antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla *Actinomyces* sp. SR3.97 izolatının kültür sıvısı liyofilize edilerek çalışmada kullanılmıştır. Liyofilize kültür sıvısı kullanılarak gerçekleştirilen ABTS radikal katyon renksizleştirme çalışması sonucunda IC₅₀ değeri 35,88 ± 0,84 µg/ml olarak bulunmuştur (Kurakhamsang vd., 2019). Bu çalışmada elde edilen IC₅₀ değeri çalışmada kullandığımız 404i ve C3-3 izolatına ait EC₅₀ değerine göre daha başarılıdır. Farklı bir çalışmada ise *Streptomyces* sp. AM-S1 izolatının kültür filtratı, liyofilize kültür filtratı ve etil asetat ekstraktı ile ABTS katyon renksizleştirme aktivitesi Sowndhararajan ve Kang (2013) tarafından araştırılmıştır. Çalışmada fermentasyon besiyeri olarak kullanılan maltoz yeast ekstrakt broth (MYEB) besiyerinin % radikal inhibisyonu 25 µg/ml konsantrasyonda 20,5 iken izolata ait kültür filtratının aynı konsantrasyonda % radikal inhibisyonu 92,70 olarak bulunmuştur. Yine aynı konsantrasyonlarda izolata ait etil asetat ekstraktının % radikal inhibisyonu %94,20 olarak, liyofilize kültür filtratının ise %78,40 olarak bulunmuştur. İzolatın etil asetat ekstraktının IC₅₀ değeri 12.0 µg/ml iken liyofilize kültür filtratının ise IC₅₀ değeri 16.10 µg/ml bulunmuştur. Bu çalışmada MYEB besiyerinin 25 µg/ml'deki radikal inhibisyonu %20,50 iken bizim çalışmada kullandığımız YEME besiyerinin 100 µg/ml'de konsantrasyonda radikal inhibisyonu %27,92 olarak bulunmuştur. Bu da bize farklı besiyeri içeriklerinin farklı sonuçlara yol açtığını göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan liyofilize kültür filtratının IC₅₀ değeri 16,1 µg/ml ile 404i ve C3-3 izolatından yüksektir.

Aktinomisetlerin antioksidan kapasitelerini belirlemek isteyen araştırmacılar tarafından, ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi sıklıkla kullanılmakta olup, bu çalışmalara bakılarak, 404i ve C3-3 izolatlarının ABTS radikalinin gideriminde başarılı olduğu açıkça görülmektedir.

4.5.7. Lipit peroksidasyonu

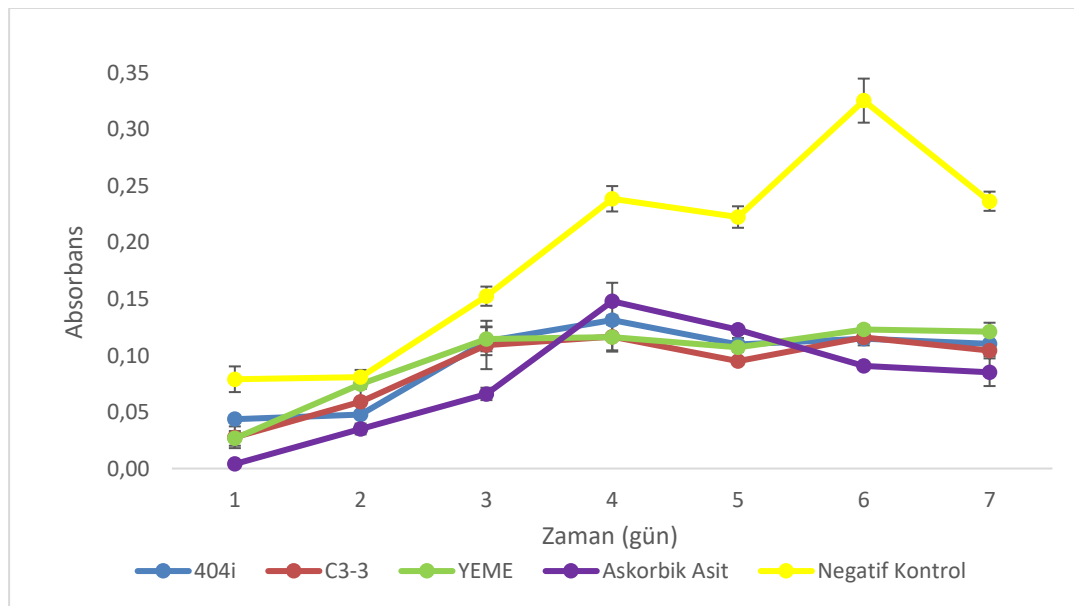
404i ve C3-3 izolatlarının lipit peroksidasyon aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile çalışıldığı, Ferrik Tiyosiyanat (FTC) yöntemi ve Tiyobarbiturik Asit (TBA) yöntemi sonuçları bu başlık altında ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur.

Ferrik Tiyosiyanat (FTC) yöntemi ile lipit peroksidasyonu

İzolatların, YEME besiyerinin ve sentetik bir antioksidan olan askorbik asitin lipit peroksidasyonunu belirlemek amacıyla yöntemde peroksit miktarı 168 saat boyunca 24 saat aralıklar ile ölçülmüştür. Örneklerin güne bağlı absorbans değişimi ise Şekil 4.20’de ve zamana bağlı % inhibisyonları Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Yapılan 168 saatlik ölçümlerin sonunda izolatlar ve kontroller maksimum peroksit miktarına ulaşmışlardır. 404i ve C3-3 izolatı sırası ile 168 saatin sonunda 0,110 ve 0,104 absorbans gösterirken askorbik asit 0,085 absorbans vermiştir. Bu değerlere bakarak metabolitlerin lipit peroksidasyonunu ve peroksitleri farklı ölçülerde indirgedikleri görülmektedir. Kontrolün 168 saatlik ölçüm sonundaki absorbansı 0,237 olarak ölçülmüştür. Kontrole göre bakıldığında 168 saatlik ölçüm sonucunda, 404i ve C3-3 izolatının aktif metabolitlerinin görevlerini yaparak, lipit peroksidasyonunu yaklaşık sırasıyla %53,35 ve %55,88 oranında azaltmıştır. İki izolatta benzer aktiviteler gösterirken, askorbik asit kontrole göre %67,16 oranında peroksitleri indirgemıştır.

İzolatların, YEME besiyerinin ve askorbik asitin Ferrik Tiyosiyanat yöntemindeki güne bağlı renk değişimleri Şekil 4.21’de verilmiştir.

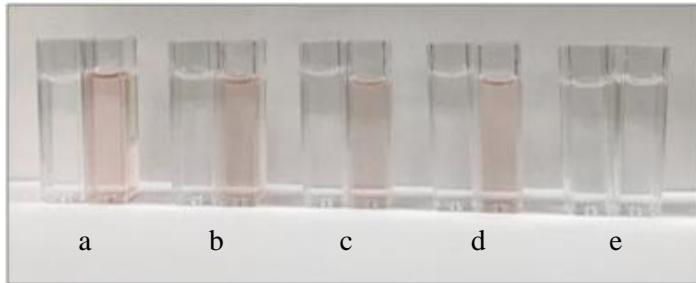


Şekil 4.20 Ferrik Tiyosiyanat yönteminde örneklerin zamana bağlı absorbansı

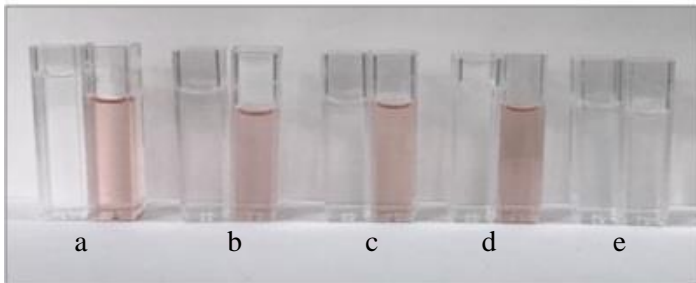
Çizelge 4.16 Ferrik Tiyosiyanat yönteminde örneklerin zamana bağlı inhibisyonları (%)

Deney Grupları	Zaman (gün)					
	1	2	3	4	5	6
404i	44,73	41,15	26,12	44,97	50,71	64,67
C3-3	64,98	27,16	28,31	51,12	57,30	64,36
Besiyeri	66,24	7,82	24,81	51,26	51,76	62,21
Askorbik Asit	94,51	58,44	59,13	36,45	45,32	72,15

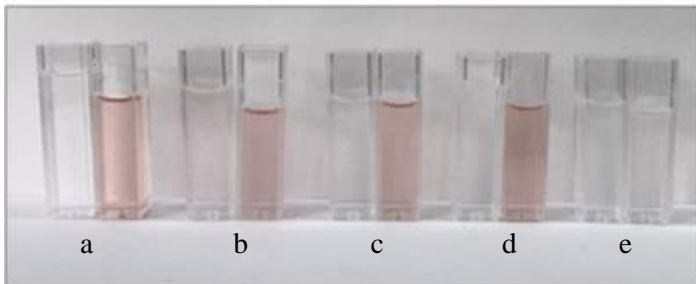
1. Gün



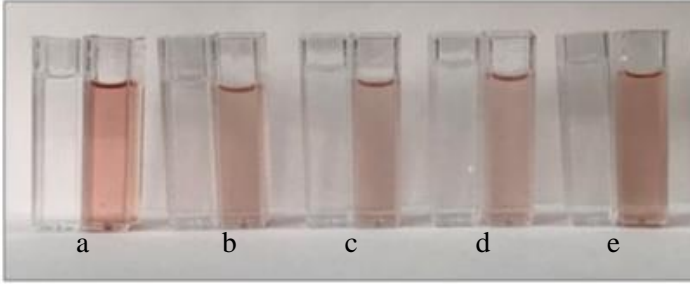
2. Gün



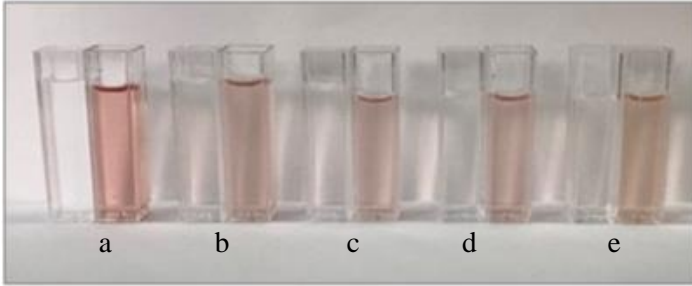
3. Gün



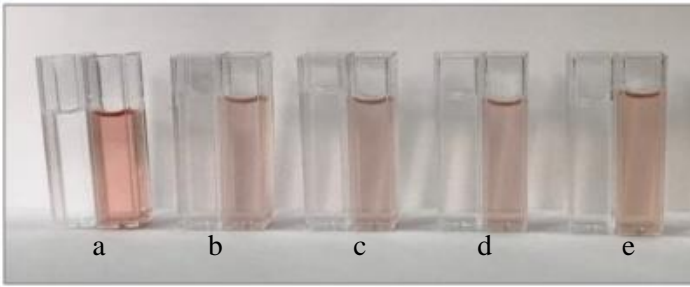
4. Gün



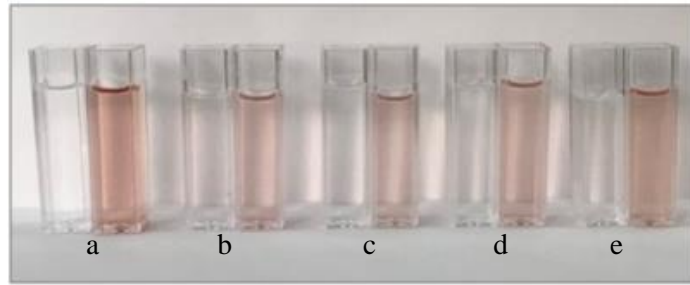
5. Gün



6. Gün



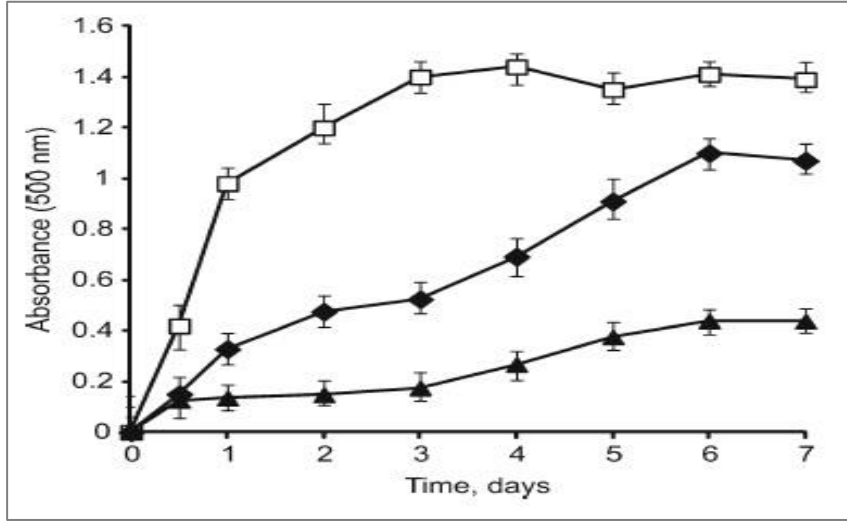
7. Gün



Şekil 4.21 Ferrik Tiyosiyanat yönteminde zamana bağlı renk değişimi (a: Kör-Kontrol, b: Kör-404i, c: Kör-C3-3, d: Kör-YEME, e: Kör-Askorbik asit)

Stankovic vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, *Streptomyces* sp. JS520 izolatının saflaştırılmış pigmentleri ile lipit peroksidasyonunu belirlemek amacıyla FTC

yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak α -tokoferol kullanılmış olup, linoleik asit stok çözeltisi 45°C'da 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen absorban değerleri Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22 FTC yönteminde elde edilen absorban sonuçları (Negatif kontrol: □, Saflaştırılmış pigment: ◆, α -tokoferol: ▲) (Stankovic vd., 2012)

Yedi günün sonunda negatif kontrol, α -tokoferol ve saflaştırılmış pigment için elde edilen absorban değerleri yaklaşık olarak 1,4-1,0 ve 0,4 olarak bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada 7. günün sonundaki absorban değerleri ise negatif kontrolde 0,237, askorbik asitte 0,085, 404i ve C3-3 izolatlarında ise 0,110 ve 0,104 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığı zaman 404i ve C3-3 izolatlarına ait absorbanlar, bu çalışmada kullanılan pozitif kontrol ve saflaştırılmış pigment ekstresine göre oldukça yüksek seviyede peroksidleri indirgedikleri görülmektedir.

Literatür taramalarında aktinomisetlerin lipit peroksidasyonu aktivitelerini inceleyen bilim insanlarının FTC yöntemini çok kullanmadıklarını görmekteyiz. Fakat yapılan bu çalışma, aktinomisetlerin ürettiği sekonder metabolitlerin lipit peroksidasyonunun ilk aşamalarında üretilen peroksidleri indirgemede başarılı olduğunu göstermektedir.

Tiyobarbiturik Asit (TBA) yöntemi ile lipid peroksidasyonu

Tiyobarbiturik asit yönteminde, lipid peroksidasyonu, birçok son ürün (aldehit, keton vb.) veren serbest radikal zincir mekanizması ile ilerler (Ghani vd., 2017). En çok çalışılan aldehitlerden biri olan malonaldehit (MDA), fizyolojik sistemlerde oksitativ hasarın belirteçidir (Fernández vd., 1997). Tiyobarbiturik Asit MDA ile reaksiyona girmesi sonucunda spektrofotometrik, kromatografik olarak veya görüntü işleme teknikleri ile belirlenebilen bir renk bileşiği oluşturur (Zeb ve Ullah, 2016). Bu renk değişimi de antioksidan maddelerin etkinliği hakkında bilgi verir.

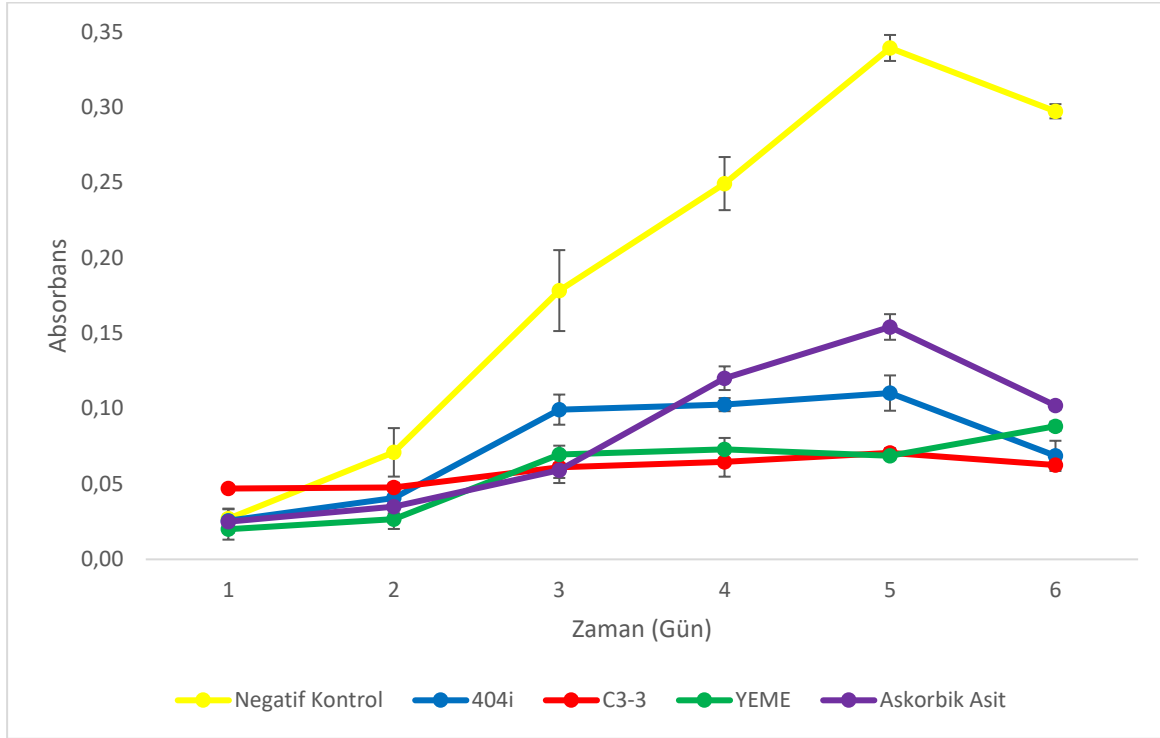
Çalışmada izolatların, YEME besiyerinin ve askorbik asitin 144 saat boyunca, 24 saat aralıklarla yapılan ölçümleri sonucunda Şekil 4.23'te verilen absorbans değerleri ve % inhibisyon değerleri Çizelge 4.17 sunulmuştur.

Çizelge 4.17 Tiyobarbiturik Asit yönteminde örneklerin zamana bağlı inhibisyonları (%)

Deney Grupları	Zaman (gün)					
	1	2	3	4	5	6
404i	4,94	42,72	44,30	58,82	67,49	76,91
C3-3	0,00	32,86	65,79	74,06	79,17	78,92
Besiyeri	25,93	62,44	60,93	70,72	79,76	70,29
Askorbik Asit	6,17	52,58	63,36	50,53	53,14	65,81

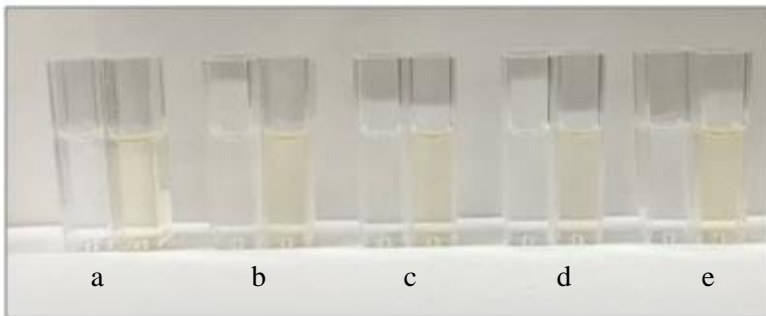
Kontrolün absorbansı (0,027) ile örneklerin absorbansları 1. günde birbirine yakın olduğu, reaksiyonun henüz başlamadığını açıkça göstermektedir. 144 saatin sonunda ise 404i ve C3-3 izolatlarının absorbansı askorbik asit ve YEME besiyerine göre daha düşük kalmıştır. Bu da izolatların tiyobarbiturik asit – malonaldehit kompleksi oluşturmasını pozitif ve negatif kontrole göre önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Kontrolün 144 saat sonundaki absorbansı ise malonaldehitin kararsız yapıda oluşu nedeniyle zamanla parçalanmasından dolayı 0.297 olarak ölçülmüştür. 144 saatin sonundaki absorbans değerleri 404i izolatında 0,069, C3-3 izolatında 0,063, YEME besiyerinde 0,088 ve askorbik asitte 0,102'dir. İzolatların renk oluşumunu askorbik asite göre önemli ölçüde azalttığını görmekteyiz. Fakat negatif kontrol, izolatlardan daha düşük aktivite göstermesine rağmen

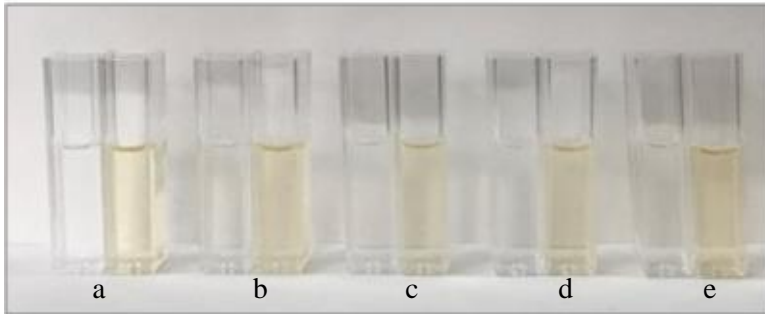
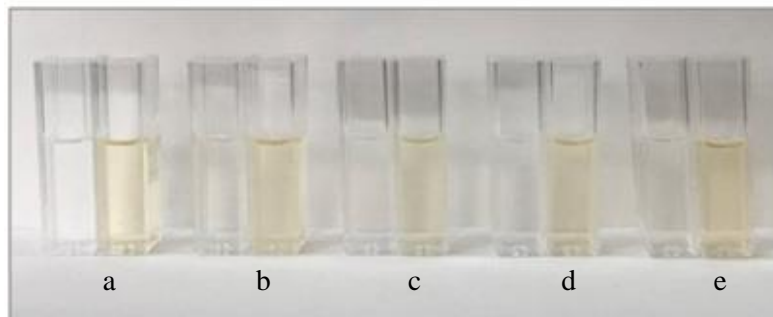
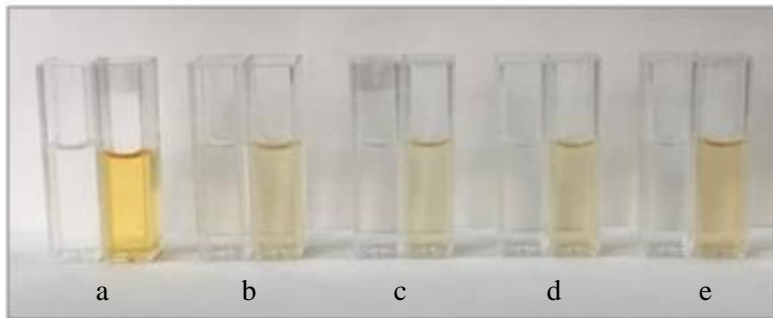
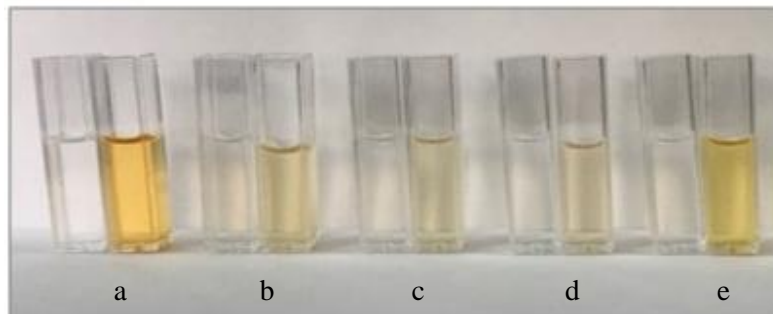
askorbik asitten daha yüksek aktivite göstermiştir. Örneklerin güne bağlı renk değişimleri Şekil 4.23'te verilmiştir.



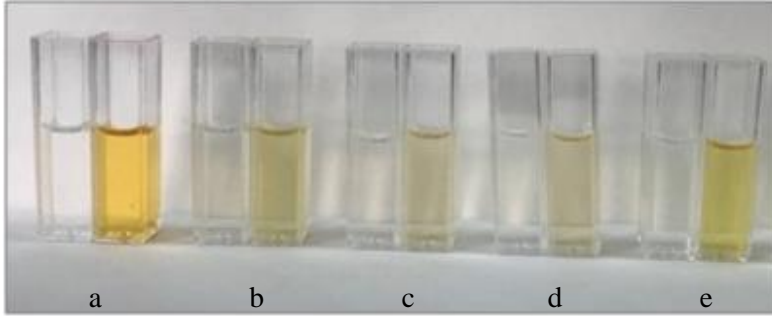
Şekil 4.23 Tiyobarbiturik Asit yönteminde örneklerin zamana bağlı absorbanları

1. Gün



2. Gün**3. Gün****4. Gün****5. Gün**

6. Gün



Şekil 4.24 Tiyobarbiturik Asit yönteminde zamana bağlı renk değişimi (a: Kör-Kontrol, b: Kör-404i, c: Kör-C3-3, d: Kör-YEME, e: Kör-Askorbik asit)

He vd. (2008) tarafından *Streptomyces virginia* H03 izolatından elde edilen polisakkaritlerin lipit peroksidasyonu, TBA yöntemi ile araştırılmıştır. Polisakkaritin ve askorbik asitin 0,4 mg/ml'deki inhibisyonları sırası ile yaklaşık olarak %80 ve %90 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda bu antioksidan etkinin 30, 50, 70, 90 ve 100°C gibi farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri çalışılmış ve 100°C'de buldukları lipit peroksidasyonu aktivitesi polisakkarit için $70,08 \pm 0,20$ iken askorbik asit için $9,20 \pm 0,50$ olarak hesaplanmıştır. Çalışma verileri göz önünde bulundurulduğu zaman polisakkaritlerin sıcaklıkla aktiviteleri nispeten düşerken pozitif kontrol olan askorbik asitte aktivite ciddi düzeyde düşmüştür. Bu da çalışmada kullandığımız 100°C inkübe süresinde askorbik asitin absorbans değerini sadece TBA-MDA kompleksinin oluşmasını engellemesinden kaynaklanmadığı aynı zamanda ısı ile de aktifliğini kaybettiği söylenebilir. Bu da aktif metabolitlerin ısıya sentetik antioksidan madde olan askorbik asitten daha dirençli olduğunu göstermektedir.

Birçok araştırmacının, lipit peroksidasyonunu belirlemek için yaptıkları TBA çalışmasında linoleik asit yerine farklı materyalleri tercih ederek, yöntemi uyguladıklarını görmekteyiz. Örneğin, sucul bir aktinobakteri olan *Streptomyces* LK-3 izolatının ekstraktı ile yapılan TBA yönteminde 0,20 mg/ml konsantrasyonda inhibisyon yaklaşık olarak %80 olarak bulunmuştur. Yöntem uygulanırken farklı konsantrasyonlarda ayarlanmış ekstrakt ve homojen hale getirilmiş %10'luk keçi karaciğeri karıştırılarak deney gerçekleştirilmiştir (Karthik vd., 2013). *Nocardioopsis* sp. NCS1 suşundan izole edilen alkaloidlerin lipit peroksidasyonu TBA yöntemi ile araştırılmıştır ve 0,02 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlardaki inhibisyonu $61,50 \pm 0,30$ ve $92,20 \pm 0,30$ olarak bulunmuştur

(Kamala vd., 2015). Bu iki çalışmada da düşük konsantrasyonlarda elde edilen sonuçlar bizim elde ettiğimiz % inhibisyon değerlerinden daha başarılı olmuştur.

Manivasagan vd. (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Streptomyces violaceus* MM72 izolatının lipit peroksidasyonunu belirlemek için yumurta sarısı ile izolatın hücre dışı polisakkaritleri karıştırılarak kullanılmıştır. Maksimum lipit peroksidasyonu 1 mg hücre dışı polisakkarit için %73,21 iken 1 mg askorbik asit için %92,76 olarak bulunmuştur. Aynı konsantrasyon (1 mg/ml) ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda elde ettiğimiz % inhibisyon değerleri 404i ve C3-3 izolatları için sırasıyla 76,91 ve 78,92 olarak bulunmuş olup aynı konsantrasyonda askorbik asitin % inhibisyonu 65,81 olarak bulunmuştur. 404i ve C3-3 izolatlarına ait aktif metabolitlerin, *Streptomyces violaceus* MM72 izolatının hücre dışı polisakkaritlerinin göstermiş olduğu aktiviteden daha başarılı olduğu görülmektedir.

Bazı araştırmacıların linoleik asit yerine başka materyaller ile yaptıkları çalışmaların sonuçlarını IC₅₀ değeri olarak verdiğini görmekteyiz. *Streptomyces* sp. Loyola UGC izolatının metanol ekstraktı ile homojenize edilmiş karaciğer karışımında TBA yöntemi araştırılmıştır. Ektraktın IC₅₀ değeri 840,31 ± 2,18 µg/ml iken askorbik asitin IC₅₀ değeri 610,30 ± 2,3 µg/ml olarak bulunmuştur (Christudas vd., 2013). *Streptomyces* sp. Loyala AR1 izolatından izole edilen enzimin lipit peroksidasyon aktivitesi homojenize edilmiş karaciğer ekstresi ile çalışılmıştır. İzolata ait ekstraktın IC₅₀ değeri ise 670,50 ± 2,52 µg/ml olarak bulunmuştur (Kumar vd., 2014). *Streptomyces lavendulae* SCA5 izolatının etil asetat ekstraktının sekonder metabolitleri ile fare karaciğerini kullanarak lipit peroksidasyonu araştırmışlardır. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi amacı ile TBA yöntemini kullanan araştırmacılar, IC₅₀ değerini 838,83 ± 1,18 µg/ml olarak sunmuşlardır (Kumar vd., 2014).

Chang ve Kim (2007), *Streptomyces* cinsine ait bir izolattan izole edilen antibiyotiklerin TBA yöntemi kullanılarak lipit peroksidasyonu araştırmışlardır. Çalışmada linoleik asit yerine sıçan karaciğeri mikrozomu kullanılmıştır ve herbimycin A %61 inhibisyon gösterirken dihydroherbimycin A %72 inhibisyon göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız izolatların aktif metabolitlerinin, yapılan antimikrobiyal aktivite çalışması nedeniyle antibakteriyal kaynaklı maddeler olmadığını bilmekteyiz. Bu çalışma bazı antibakteriyal maddelerinde % inhibisyon değerlerinin yüksek olabileceğini göstermektedir; fakat çalışmamızda kullanılan metabolitlerin antimikrobiyal kaynaklı maddeler olmadığı

göz önünde bulundurulduğunda antimikrobiyal olmayan maddelerinde lipit peroksidasyonunu engellemede başarılı olduğu görülmektedir.

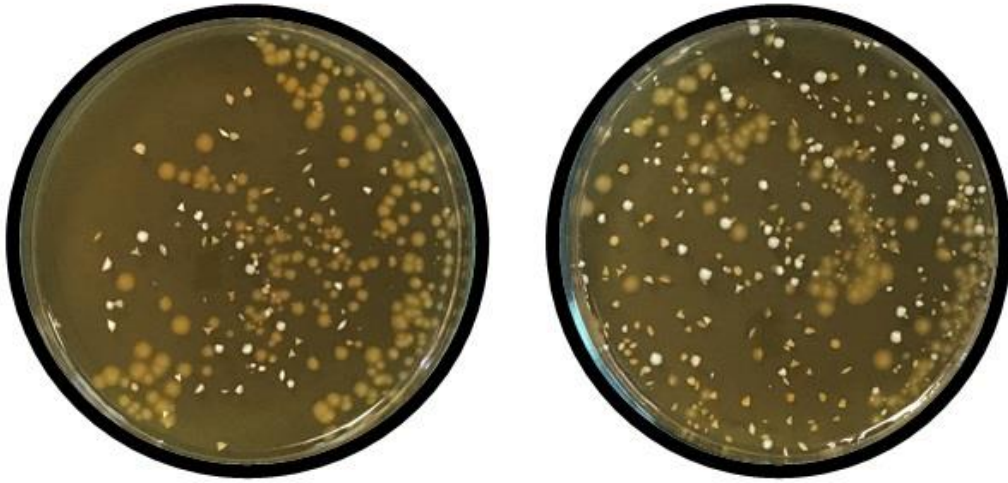
Yapılan bu çalışmalar aktinomiset izolatlarına ait metabolitlerin lipit peroksidasyonunu önlemede başarılı olduğunu göstermektedir. Çalışmamıza ait tüm veriler bir arada değerlendirildiği zaman ise izolatlara ait metabolitlerin % inhibisyonları pozitif kontrol olan askorbik asitten daha başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Tarama çalışmaları sonucunda en düşük antioksidan aktivite gösteren izolat olarak seçilen C3-3 izolatının, bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, en yüksek antioksidan aktivite gösteren izolat olarak seçilen 404i izolatından daha başarılı olduğu açıkça görülmektedir. Bu durum DPPH radikal süpürücü aktivitenin antioksidan aktivite belirteci olarak tek başına kullanılmasına şüphe ile yaklaşılması gereğini ifade etmektedir.

4.6. UV Koruyucu Aktivite Çalışması

Antioksidan aktivitesi olduğu bilinen 404i ve C3-3 izolatlarına ait metabolitlerin, reaktif oksijen türlerine ait hasarları önleyebilme gücü, UV koruyucu aktivite çalışması ile araştırılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda 404i, C3-3 izolatlarının ve YEME besiyerinin UV koruyucu aktivitesine rastlanmamıştır. UV ışığa maruz kalındığındaki ölüm oranı %27,19 olarak bulunurken; askorbik asitin % koruyuculuğu 32,63 olarak bulunmuştur. Negatif kontrolün UV ışığına maruz bırakılan ve bırakılmayan petriyelerdeki koloni görüntüleri Şekil 4.25'te verilmiştir. Bu şekil çalışma yönteminin başarılı biçimde çalıştığını ifade etmektedir.

Streptomyces sp. MUM273b suşu ile insan keratinositleri (HaCaT) hücre hattında UV radyasyona karşı koruma çalışması yapılmıştır, HaCaT hücreleri 96'lı plakelere ekilmeden önce hücre yoğunluğu 1×10^4 olarak ayarlanmıştır. Ekstraktların farklı konsantrasyonları hücrelere eklendikten 24 saat sonra sonra 290 ile 315 nm arasında ışınlanmaya tabi tutulan hücrelerin besiyeri değiştirilip MTT yöntemi ile % canlılık belirlenmiştir. MUM273b ekstraktının 1, 2 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda UVB'nin neden olduğu keratinosit hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir. Canlılık 1,2,4 mg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %60, %70 ve %80 olarak bulunmuştur (Tan vd., 2019).



Şekil 4.25 Negatif kontrole ait koloni görüntüleri (a: UV'ye maruz bırakılmış, b: UV'ye maruz bırakılmamış)

Streptomyces sp. JS520 suşundan izole edilen undesil prodigiozin (kırmızı) pigmentinin UV koruyucu aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada iki farklı deney grubu (pigment üreten hücreler ve izole edilen pigmentlerin pigment üretmeyen hücrelere eklenmesi) ve bir kontrol grubu (pigment içermeyen hücreler) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pigment içermeyen kontrol grubunda herhangi bir koruyuculuk olmazken; saf pigment eklenen hücreler ve pigmenti üreten hücrelerin UV koruyucu aktiviteleri sırasıyla %8 ve %22 olarak bulunmuştur (Stankovic vd., 2012).

Streptomyces'e ait bir suştan izole edilen hücre dışı melanin pigmentinin MA olarak tespit edilen bileşeni ile *Bacillus thuringiensis* hücrelerinin UV ışığına maruz kaldığında canlılıkları sorgulanmıştır. *Streptomyces* sp. suşundan izole edilen aktif metabolitlerin, kolon kurularak saflaştırılan MA bileşeni ile *Bacillus thuringiensis*'in UV ışık altındaki hayatta kalma becerisi sorgulanmıştır. MA bileşeni deney grubuna eklendiğinde veya eklenmediğinde UV ışınlama süresinin uzaması ile *B. thuringiensis*'in hayatta kalma oranı azalmıştır. Yirmi dakikanın sonunda ise canlı hücre kalmamıştır (Li vd., 2018).

Streptomyces sp. WMA-LM31 suşu ile yapılan bir başka UV koruyucu aktiviteyi belirleme çalışmasında, 2000 Jm-2 UV dozunda WMA-LM31 suşu maksimum canlılık göstermiş olup, elde edilen verilere göre *E.coli* aynı dozlarda aynı başarıları sonucu elde edememiştir (Sajjad vd., 2018).

Literatürde yapılan çalışmaların az olmasına rağmen, yapılan çalışmalarda aktinomiset grubu bakterilerin başarılı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız ökaryotik *S. cerevisiae* hücrelerini liyofilize kültür sıvılarından elde ettiğimiz metabolitler UV ışığına karşı koruyamamıştır. Çalışma konusunu oluşturan 404i ve C3-3 izolatları sırası ile Morca ve Düzkır mağaralarından izole edilmiştir. Karanlık ortamda bulunan bu izolatların doğal ortamlarında güneş ışığı ile karşılaşmadıkları için UV ışınlarına karşı koruyucu bir molekül üretmedikleri düşünülebilir. Bu yöntemin basit ve pratik olması bir avantajken, UV bekleme sürelerinin manuel olarak ayarlanması ve inokülasyon aşamasında besiyeri ve hücrenin homojen olarak dağıtılmasında gerleşebilecek sorunlar nedeniyle de yanlış sonuç alınması veya hücrelerin kolonilerinin sayılamayacak şekilde büyümesi büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır.

4.7. Antikanser Aktivite Çalışmaları

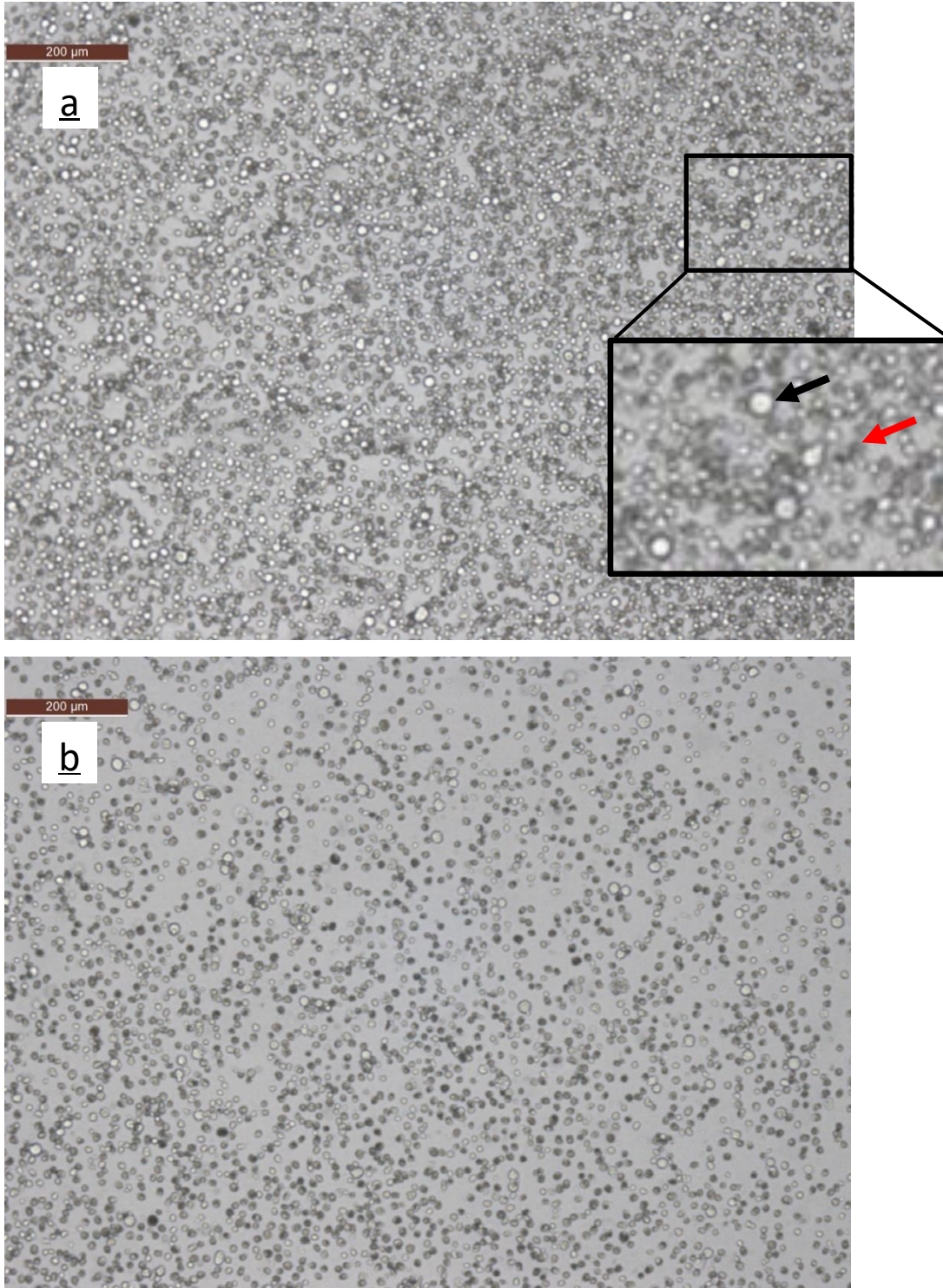
4.7.1. Hücre hatlarının aktiflenmesi ve sayılması

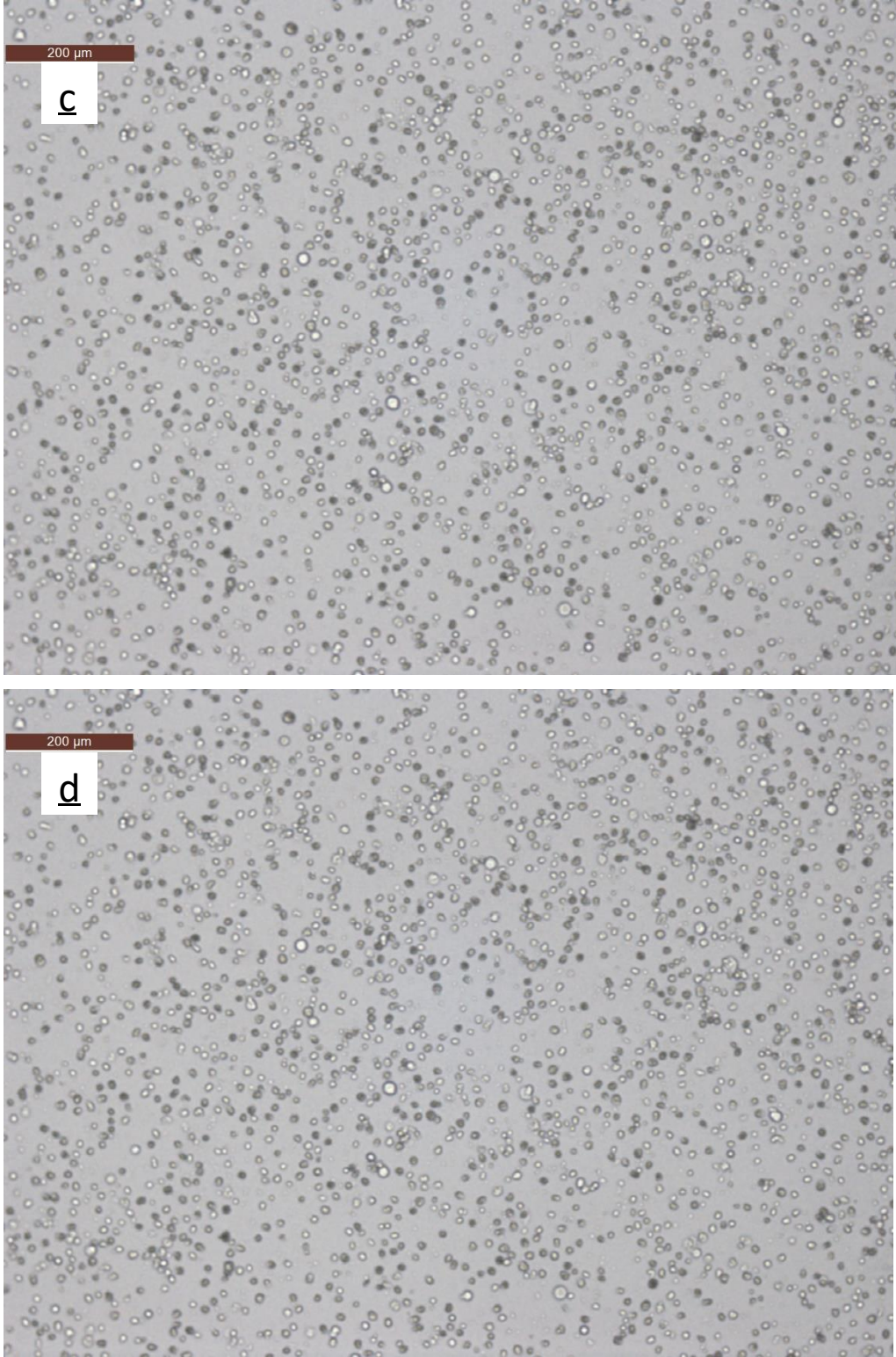
K562, HL-60 ve THP-1 hücreleri uygun ortam ve koşullarda çoğaltıldıktan sonra çalışmalarda kullanılmak üzere yapılan hücre sayımı neticesinde; MST yönteminde kullanılmak amacıyla 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa 100µl (5×10^4 hücre/1 ml besiyeri), izolatlara ait metabolitlerin apoptoz ile ilgili genler üzerindeki ifadesini belirlemek amacıyla ise 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 1 ml (1×10^6 /1ml besiyeri) ekim yapılmış ve 24 saat, %5'lik CO₂ etüvünde, 37°C'de hücreler inkübasyona bırakılmıştır.

4.7.2. MTS yöntemi ile sitotoksik aktivitenin belirlenmesi

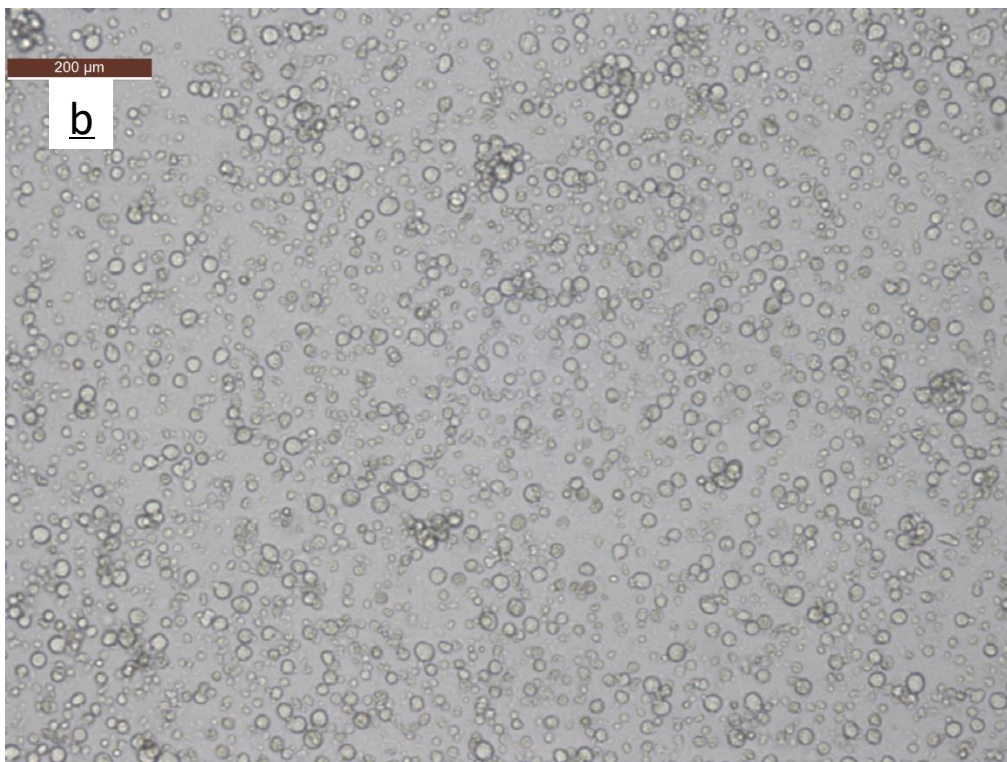
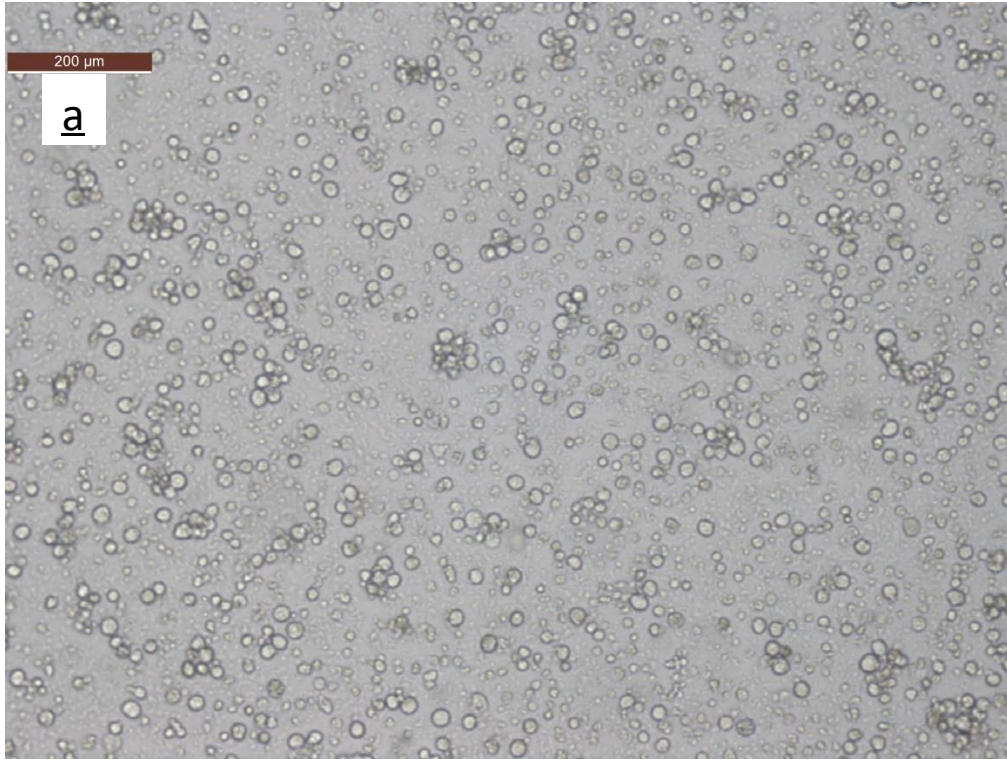
'2.3 Sitotoksik aktivite' başlığı altında yapılan tarama çalışması neticesinde seçilen 404i ve C3-3 izolatının antioksidan aktivite çalışmaları yapıldıktan sonra MTS yönteminde belirlenen sitotoksik aktiviteleri ile IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. 404i ve C3-3 izolatlarının

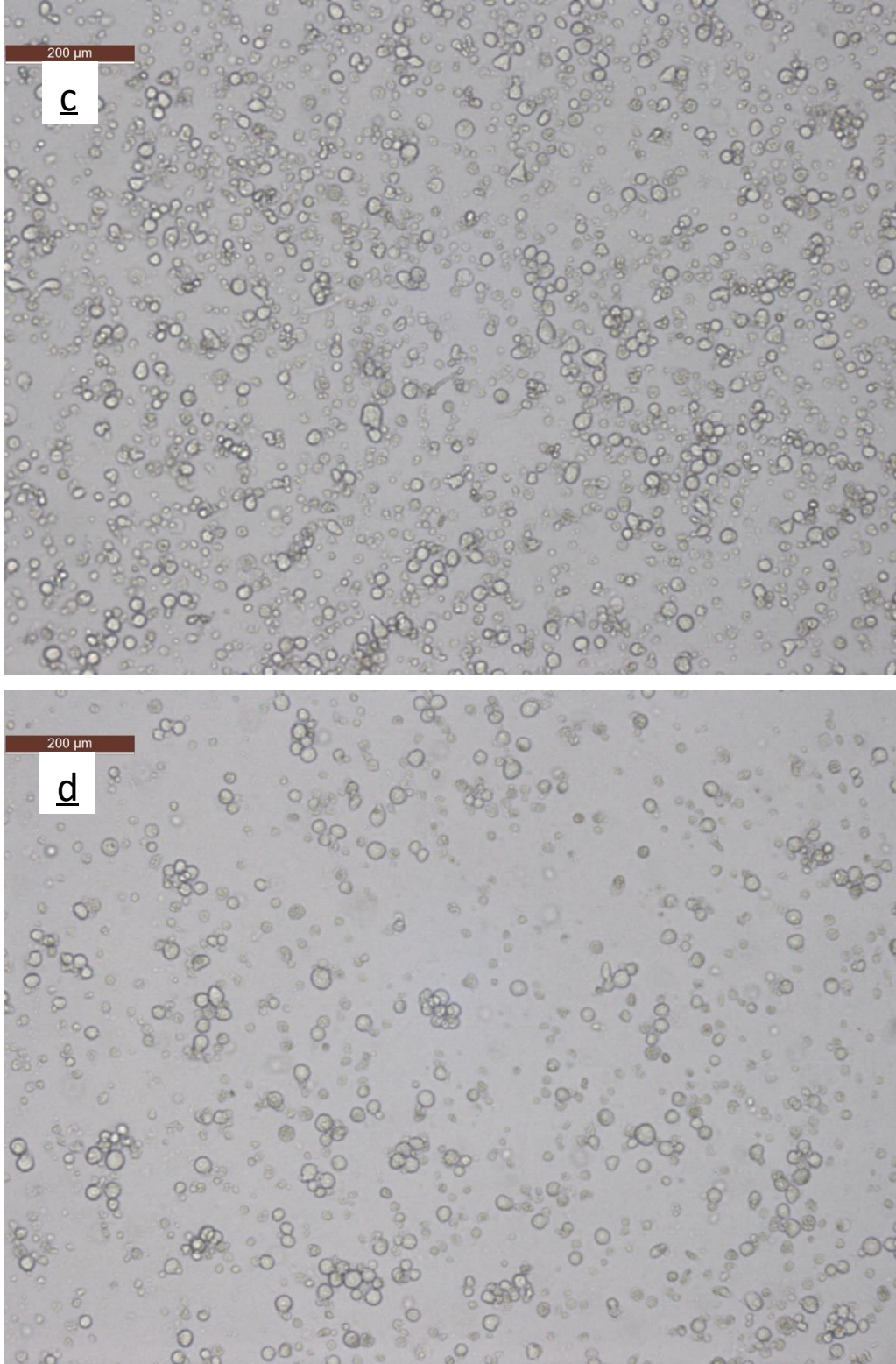
% canlılık verilerinden (Şekil 4.26 – 4.28) oluşturulan logaritmik eğriden elde edilen R^2 formülüne göre, IC_{50} değerleri sırasıyla K562 hücre hattı için 312,57 ve 266,66 $\mu\text{g/ml}$, HL-60 hücre hattı için 141,80 ve 75,85 $\mu\text{g/ml}$ ve THP-1 hücre hattı için 112,95 ve 90,42 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan bortezomibin IC_{50} değerleri ise HL-60, K562 ve THP-1 hücre hatlarına karşı 6,34, 2,31 ve 5,2 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.



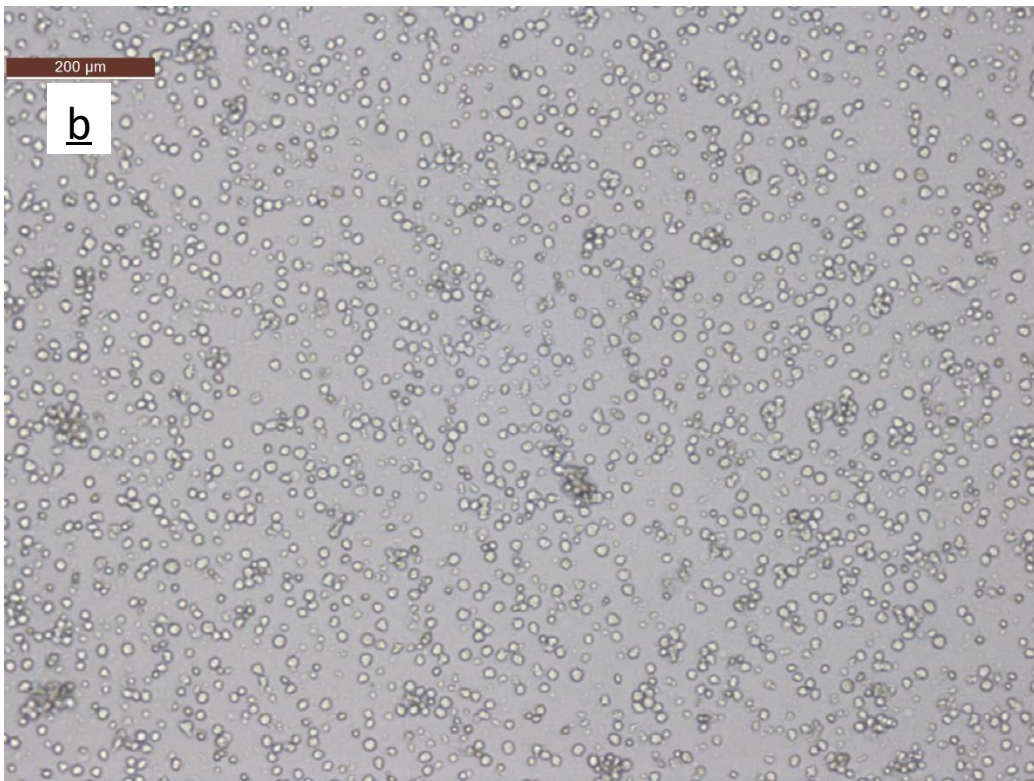
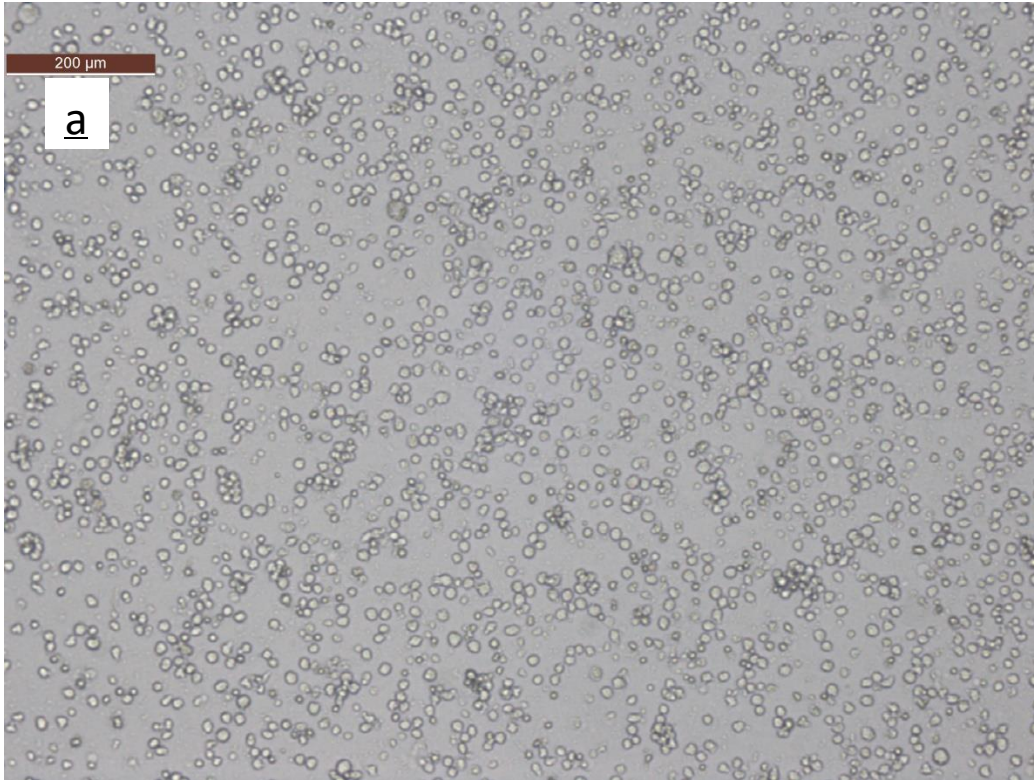


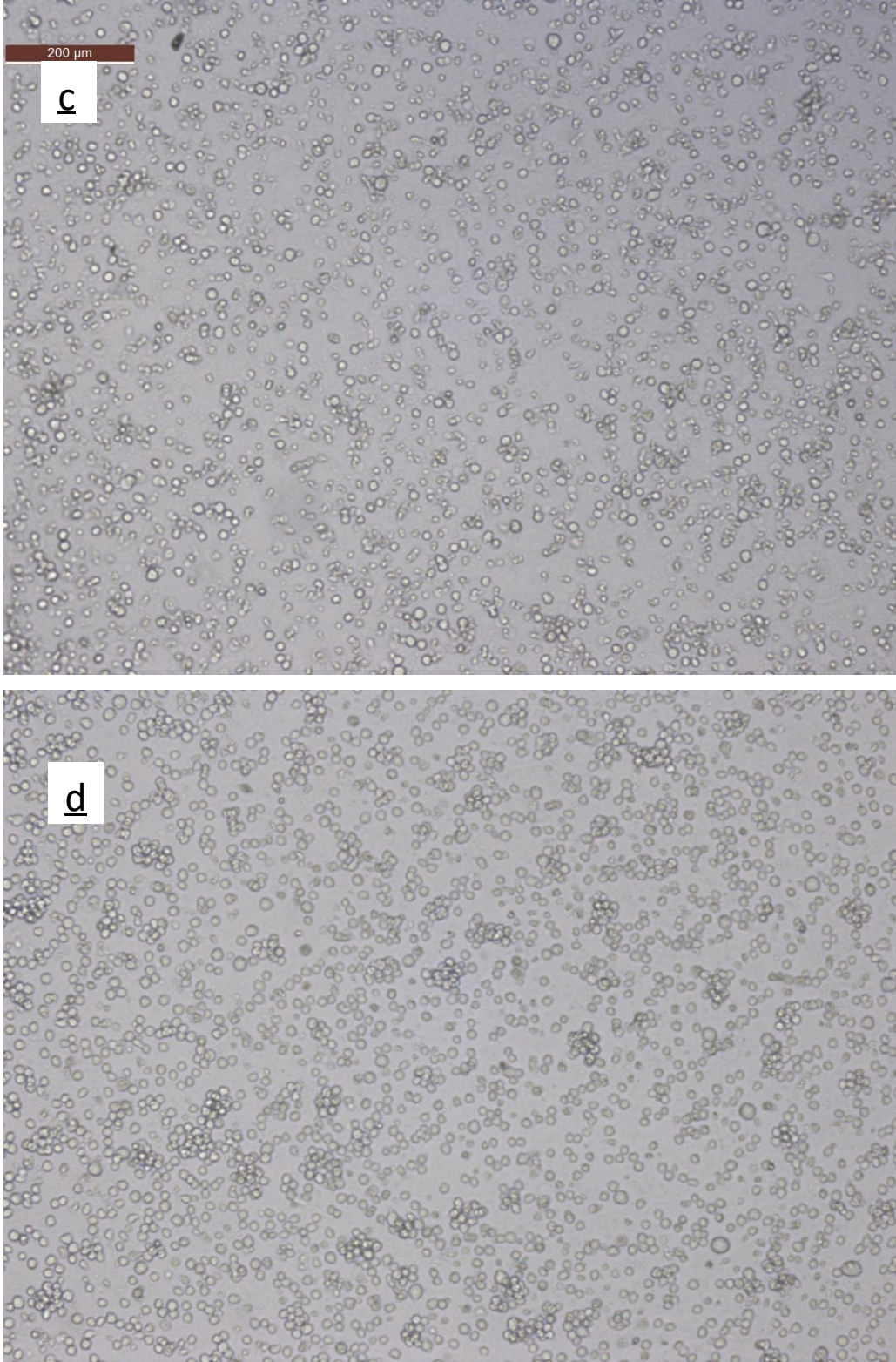
Şekil 4.26 IC₅₀ değerindeki 404i ve C3-3 izolatların ekstraktlarının K562 hücre hattına karşı etkisi (a:404i, b: C3-3, c: Bortezomib, d: Kontrol; Siyah ok: Sağlıklı hücre, Kırmızı ok: Apoptotik hücre)





Şekil 4.27 IC₅₀ değerindeki 404i ve C3-3 izolat ekstraktlarının HL-60 hücre hattına karşı etkisi (a:404i, b: C3-3, c: Bortezomib, d: Kontrol)

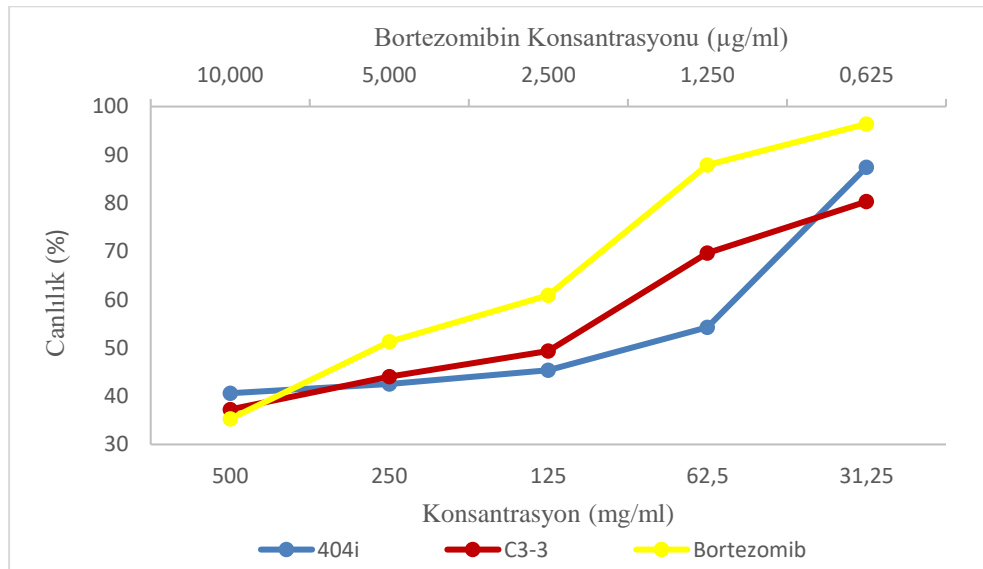




Şekil 4.28 IC₅₀ değerindeki 404i ve C3-3 izolat ekstraktlarının THP-1 hücre hattına karşı etkisi (a:404i, b: C3-3, c: Bortezomib, d: Kontrol)

MTS yöntemi ile sitotoksik aktivitesi belirlenen 404i, C3-3 izolatları ve bortezomibin K562, HL-60 ve THP-1 hücre hatları için canlılık yüzdesi grafikleri Şekil 4.29 – 4.31’ de sunulmuştur.

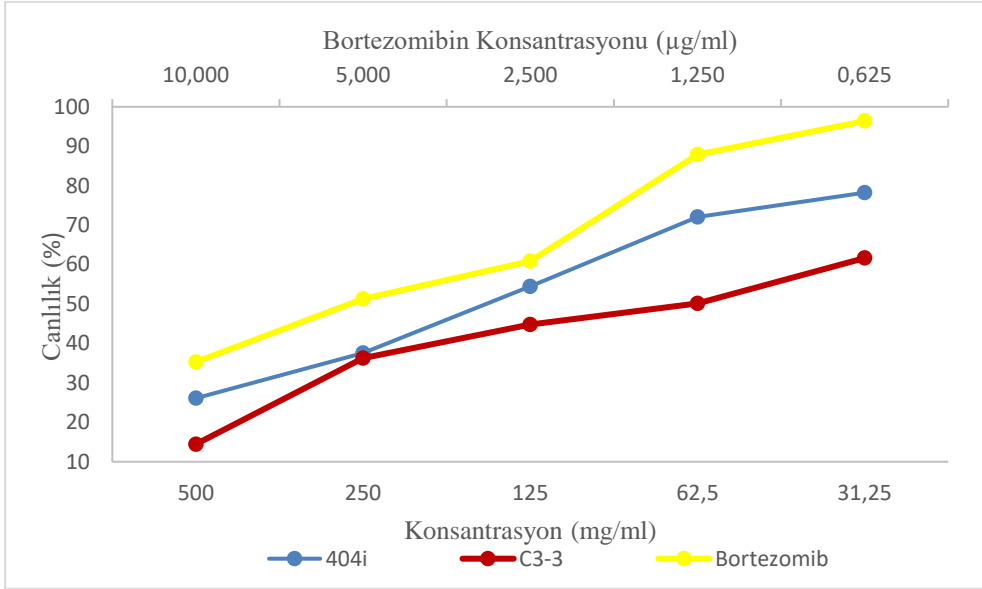
K562 hücre hattında, C3-3 izolatının liyofilize kültür sıvısının 500 µg/ml’deki konsantrasyonundaki % canlılığı ile bortezomibin 10 µg/ml ‘de konsantrasyondaki % canlılığı yaklaşık olarak eşit olmakla beraber; 404i izolatının 500 µg/ml’deki konsantrasyonunda canlılık %40,61’dir. Bu sonuca dayanarak K562 hücre hattında C3-3 izolatı 404i izolatına göre % sitotoksosite açısından oransal olarak daha başarılı olduğu aynı zamanda IC₅₀ değerinde daha düşük konsantrasyonda daha etkili olduğu görülmektedir.



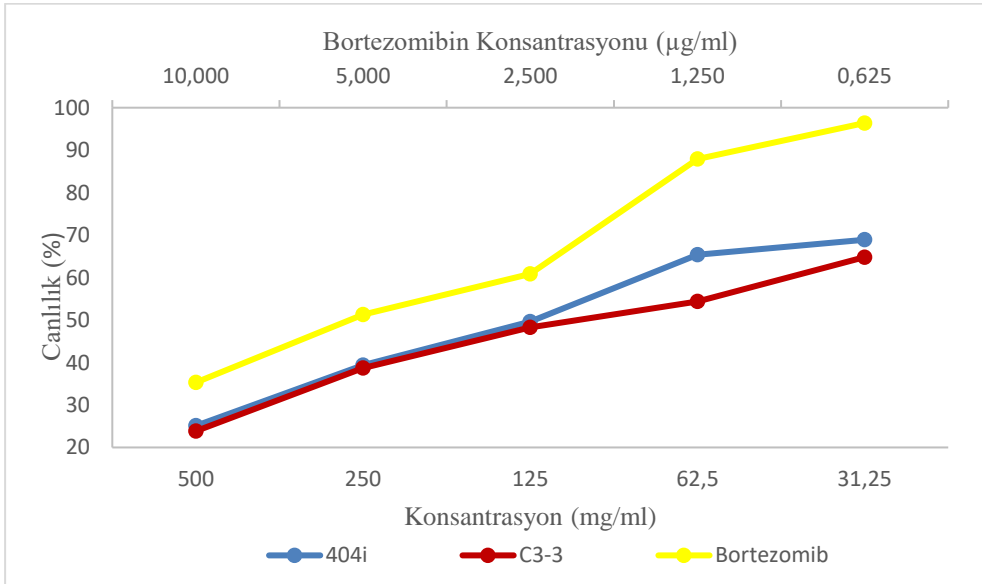
Şekil 4.29 404i ve C3-3 izolatlarının ve bortezomibin K562 hücre hattı için % canlılık grafiği

C3-3 izolatı 404i izolatına göre daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Bu sonuç C3-3 izolatının, HL-60 hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesinin 404i izolatına göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. İzolatlara ait IC₅₀ değeri 404i izolatı için 141,80 iken C3-3 izolatı için 75,85 µg/ml olarak hesaplanmış olup; pozitif kontrolün IC₅₀ değeri ise 6,34 µg/ml’dir.

THP-1 hücre hattında 404i ve C3-3 izolatlarının % sitotoksitesitesi 125 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar benzer aktivite gösterirken; C3-3 izolatı 125 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondan sonra daha başarılı aktivite göstermiştir.



Şekil 4.30 404i ve C3-3 izolatlarına ait ekstraktların ve bortezomibin HL-60 hücre hattı için % canlılık grafiği



Şekil 4.31 THP-1 hücre hattında 404i, C3-3 izolatlarının ve bortezomibin % canlılık grafiği
404i ve C3-3 izolatlarına ait ekstraktların ve bortezomibin THP-1 hücre hattı için % canlılık grafiği

Saccharopolyspora türüne ait bir izolattan elde edilen metasikloprodigosin undesylprodigosin maddeleri P388, HL60, A-549, BEL-7402 ve SPCA4 hücre hatlarında çalışılarak sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla metasikloprodigosin için 0,007, 0,022, 0,11, 0,028 ve 7,52 µM iken undesylprodigosin için 0,013, 0,033, 0,11, 0,026 ve 0,010 µM olarak bulunmuştur (Li vd., 2005).

Dokuz farklı aktinomiset türünün ekstrakte edilmiş kültür sıvıları ile yapılan çalışmada *Streptomyces albus* UL7B, *Streptomyces fulvissimus* ULS13, *Streptomyces bingcheggensis* ULS1 ve *Streptomyces albus* ULK2 nolu izolatların HL-60 hücre hattında sitotoksik etkisi belirlenmiştir. İzolatların metabolitlerine ait IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 0,083, 0,096, 0,640 ve 0,083 mg/ml; pozitif kontrol olarak kullanılan SAHA'nın IC₅₀ değeri ise 0,053 µg/ml olarak bulunmuştur (Davies-Bolorunduro vd., 2019). Çalışmamızda kullanılan 404i izolatu, bu çalışmada kullanılan izolatlar içinde yalnızca ULS1 izolatından yüksek aktivite göstermiştir. Aynı hücre hattında C3-3 izolatu ise bu çalışmada kullanılan tüm izolatlardan daha fazla sitotoksik aktivite göstermiştir.

Streptomyces türünden izole edilen Streptokarbazol A ve B'nin sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Streptokarbazol A maddesinin HL-60, A-549, P388 ve HeLa hücreleri üzerinde etkili olduğunu sonucuna ulaşılmıştır ve sırasıyla 1,4, 5,0, 18,9 ve 34,5 µM'da IC₅₀ değerlerinde etkili olduğu bulunmuştur. Streptokarbazol B maddesi P388 ve HeLa hücrelerindeki IC₅₀ değerleri 12,8 ve 22,5 µM iken HL-60 ve A-549 hücre hatlarında 50 µM'dan daha yüksek bir konsantrasyonda IC₅₀ değeri elde edilmiştir (Fu vd., 2012).

Streptomyces sporoverrucosus MTCC11715 antimikrobiyal süşundan krizomisin A, B ve yeni bir naftokumarin olan krizomisin C izole edilerek bir dizi kanser hücre hattına (A549, Colo205, PC-3, MIAPaCa-2 ve HL-60) karşı sitotoksitesini taranmıştır. En yüksek IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,9, 0,95 ve 11 µM olarak HL-60 hücrelerine karşı gözlemlenmiştir (Jain vd., 2013).

Streptomyces heliomycini WH1 izolatından izole edilen X0β, X2 ve D aktif bileşiklerinin sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla MCF-7, K562 ve A549 hücre hatları

kullanılmıştır. K562 hücre hattından elde edilen IC₅₀ değerleri Act X0β için 128,3 nM, Act X2 için 1,8 nM ve Act D içinse 3,3 nM olarak bulunmuştur (Wang vd., 2017).

Streptomyces hygroscopicus NRRL3602 suşundan izole edilen karbonhidrat-geldanamisinin sitotoksik aktivitesi farklı hücre hatlarında (SW620, HT29, MCF7 ve K562) araştırılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda SW620, HT29, MCF7 ve K562 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri 6,2, 24,5, 6,5 ve 22,1 nM olarak bulunmuştur (Cheng vd., 2005).

Streptomyces KFD18 izolatından izole edilen 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 nolu metabolitlerin sitotoksik aktiviteleri SGC-7901, K562, HeLa ve A549 hücre hatlarında sorgulanmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak imatinib ve adriamisin kullanılmıştır. K562 hücre hattında 5 ve 6 nolu izolatların IC₅₀ değerleri 50 µM'dan yüksek çıkmıştır. Aynı hücre hattında sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 nolu izolatlar 6,6, 9,0, 7,6 ve 16,3 µM konsantrasyonda IC₅₀ değeri göstermişlerdir. İmatinib ve adrimisin maddeleri ise 0,2 ve 10,7 µM konsantrasyonda IC₅₀ değeri göstermişlerdir (Zhou vd., 2019).

Bir aktinomiset türü olan *Amycolatopsis* sp. K16-0194 suşundan izole edilen dipirimisin A ve B'nin sitotoksik aktivitesi HeLa, HT29, A549, H1299, THP-1, Jurkat ve HL-60 hücre hatlarında araştırılmıştır. Çalışmanın sonunda dipirimisin A sırasıyla 51±0,5, 6,2±0,3, 4,3±0,2, 9,2±0,5, 9,4±3,5, 4,3±0,6, 4,4±0,5 ve 3,9±0,7 µM konsantrasyonda IC₅₀ değeri göstermiştir. Dipirimisin B ise HL-60, HT29 ve H1299 hücre hatlarında 24,6±13,9, 72,1±27,0 ve 6,8±3,3 µM konsnatrasyonda IC₅₀ değeri gösterirken; diğer hücre hatları IC₅₀ değerini 100 µM konsantrasyondan daha yüksek seviyelerde göstermiştir (Izuta vd., 2018).

Streptomyces tauricus SRP18 izolatının kültür sıvısından izole edilen aktinomisin D maddesinin sitotoksik aktivitesi HeLa, PC-3, THP-1 ve Caco2 hücre hatlarında araştırılmıştır. Elde edilen IC₅₀ değeri sırasıyla 4,91, 5,63, 7,0 ve 7,25 µM olarak bulunmuştur (Rather vd., 2017).

Yukarıda örnekleri verilen çalışmaların çoğunda aktinomisetlerden izole edilen özellikle antibakteriyal metabolitlerin, sitotoksik aktivitesinin çalışıldığı görülmektedir. Kullandığımız izolatlara ait aktif metabolitlerin tanımlanmamasına rağmen yapılan antimikrobiyal aktivite çalışması neticesinde antibakteriyal özellik göstermediği

bulunmuştur. K562 hücre hattında yapılan MTS testinin sonucunda 404i ve C3-3 izolatına ait aktif metabolitlerin IC₅₀ değerleri yüksek bulunduğu için bir sonraki aşama olan Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB, NF-KB1 genlerinin ifadesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmaya K562 hücre hattı dahil edilmemiştir.

4.7.3. 404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitlerinin Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB ve NF-KB1 genlerinin Real Time PZR ile etkisinin belirlenmesi

THP-1 ve HL-60 hücre hatlarına 24 saat süreyle uygulanan 404i ve C3-3 izolatının liyofilize kültür örneklerinin ve bortezomibin IC₅₀ değeri i konsantrasyonları apoptotik hücre ölümünde rol oynayan Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB ve NF-KB1 genlerinin mRNA ifade düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH geninin (Housekeeping gen) mRNA ifade düzeyine göre normalize edilmiştir.

THP-1 hücre hattındaki mRNA ekspresyon sonuçları Çizelge 4.18'da sunulmuştur. THP-1 hücre hattında uygulanan 404i, C3-3 ve bortezomibin IC₅₀ dozları Apaf-1 geninin mRNA ifade düzeyine göre kıyaslandığında 404i ve bortezomibin sırasıyla 1,1 ve 2 kat azalttığı, C3-3 izolatına ait metabolitlerinse 3,3 kat arttırdığı belirlenmiştir. Ask-1 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığı zaman 404i, C3-3 ve bortezomib sırasıyla 1,1, 1,25 ve 1,66 kat azalttığı görülmüştür. TNF- α ve NF-KB genleri kontrole göre kıyaslandığı zaman izolatların mRNA ifade düzeyinde artışa neden olduğu saptanmıştır. 404i, C3-3 ve bortezomib TNF- α alfa geninde 1,2, 1,3; NF-KB geninde 1,3, 1,1 kat arttırdığı, bortezomib ise TNF- α alfa geninde 1.42 ve NF-KB geninde 2 kat mRNA ifade düzeyinde azalmaya neden olmuştur. NF-KB1 geninde, mRNA ifade düzeyinde 404i ve bortezomibim kontrole göre kıyasla 2,5 ve 9 kat azalış, C3-3 izolatına ait metabolitlerinse 2,7 kat artış olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.18 THP-1 hücre hattındaki Real Time-PZR mRNA ekspresyon sonuçları

Deney Grupları	Gen Bölgeleri					
	Apaf-1	Ask-1	TNF- α	NF-KB	NF-KB1	GAPDH
THP-1 Kontrol	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	Referans gen
404i	0,9295	0,9787	1,278	1,362	0,4026	Referans gen
C3-3	3,374	0,8236	1,131	1,153	2,794	Referans gen
Bortezomib	0,5497	0,6197	0,7289	0,5523	0,1240	Referans gen

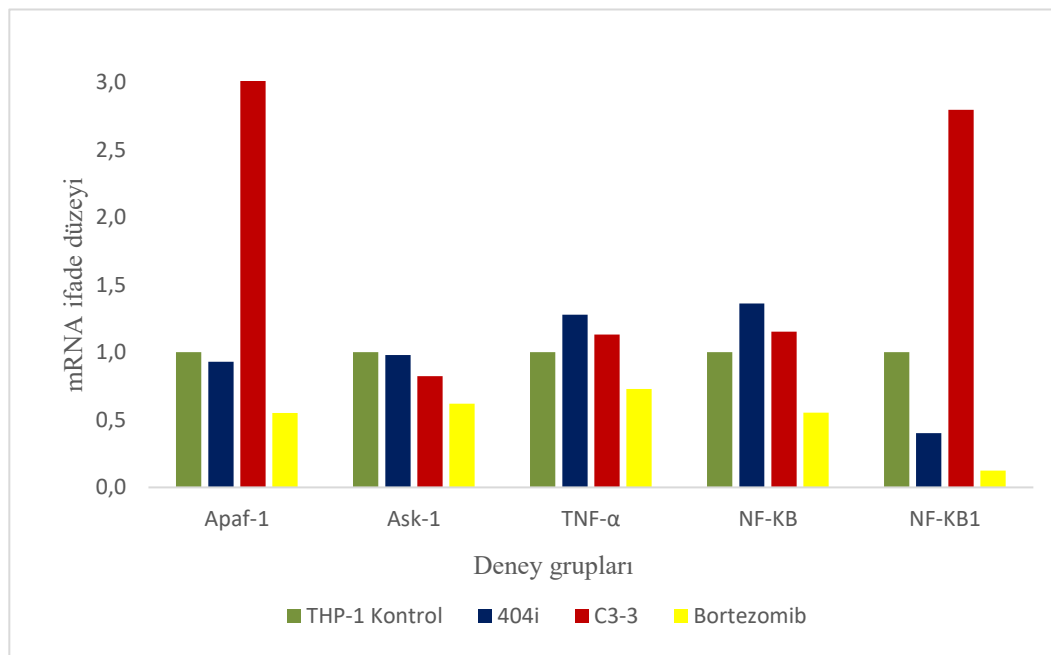
HL-60 hücre hattındaki mRNA ekspresyon sonuçları Çizelge 4.19'da sunulmuştur. HL-60 hücre hattında, tüm gen bölgelerinde izolatların ve bortezomibin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında artmış olduğu görülmektedir. 404i izolatına ait aktif metabolitlerin NF-KB1 geninde mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında anlamlı bir artış görülmemiştir. C3-3 izolatı ve bortezomib ise 2.5 ve 1.6 kat mRNA ifade düzeyini kontrole göre arttırmıştır. HL-60 hücre hattında uygulanan 404i, C3-3 ve bortezomibin IC₅₀ dozları Apaf-1 geninin mRNA ifade düzeyine göre kıyaslandığında 404i, C3-3 ve bortezomibin sırasıyla 27.8, 11.2 ve 54.6 kat arttırdığı belirlenmiştir. Ask-1 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığı zaman 404i, C3-3 ve bortezomib sırasıyla 6.8, 1.6 ve 1.9 kat arttırdığı görülmüştür. TNF- α geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığı zaman 404i, C3-3 ve bortezomib sırasıyla 8.0, 11.5 ve 4.2 kat arttırdığı saptanmıştır. HL-60 hücre hattında uygulanan 404i, C3-3 ve bortezomibin IC₅₀ dozları NF-KB geninin mRNA ifade düzeyine göre kıyaslandığında 404i, C3-3 ve bortezomibin sırasıyla 4.3, 3.0 ve 1.4 kat arttırdığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.19 HL-60 hücre hattındaki Real Time-PZR mRNA ekspresyon sonuçları

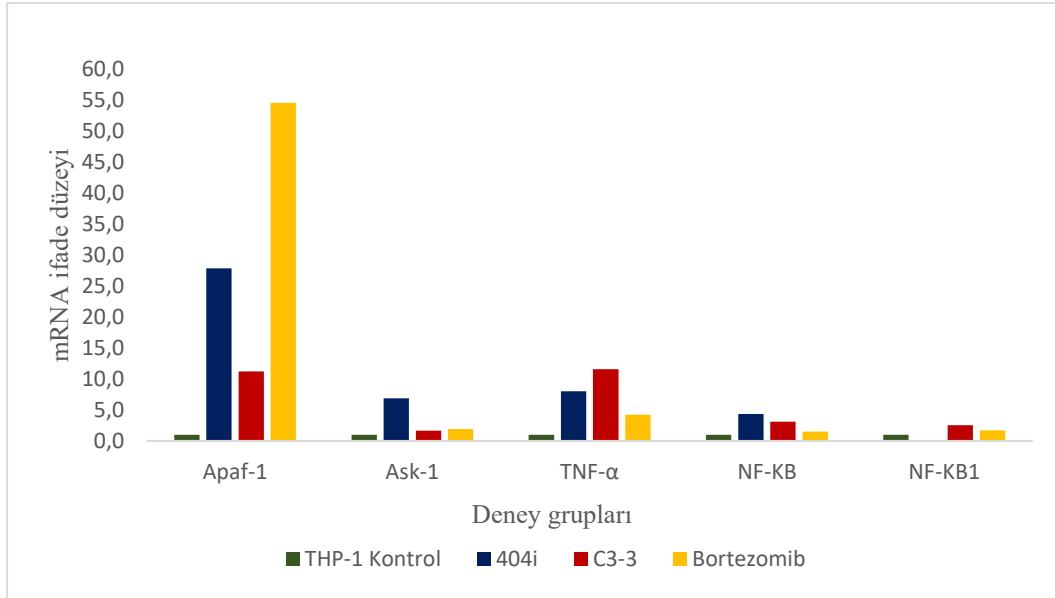
Deney Grupları	Gen Bölgeleri					
	Apaf-1	Ask-1	TNF- α	NF-KB	NF-KB1	GAPDH
HL-60 Kontrol	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	Referans gen
404i	27,87	6,892	8,010	4,361	466,0	Referans gen
C3-3	11,20	1,672	11,59	3,079	2,538	Referans gen
Bortezomib	54,61	1,916	4,267	1,480	1,694	Referans gen

404i izolatına ait aktif metabolitler, HL-60 hücre hattında mRNA ifade düzeyini kontrole göre kıyaslandığında (Şekil 4.32) Apaf-1, Ask-1 ve THP-1 hücre hattında uygulanan 404i, C3-3 ve bortezomibin IC₅₀ dozları Apaf-1 geninin mRNA ifade düzeyine göre kıyaslandığında 404i ve bortezomibin sırasıyla 1.1 ve 2 kat azalttığı, C3-3 izolatına ait metabolitlerinse 3.3 kat arttırdığı belirlenmiştir. Ask-1 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığı zaman 404i, C3-3 ve bortezomib sırasıyla 1,1, 1,25 ve 1,66 kat azalttığı görülmüştür. TNF- α ve NF-KB genleri kontrole göre kıyaslandığı zaman izolatların mRNA ifade düzeyinde artışa neden olduğu saptanmıştır. 404i, C3-3 ve bortezomib TNF- α alfa geninde 1,2, 1,3; NF-KB geninde 1,3, 1,1 kat arttırdığı, bortezomib ise TNF- α alfa geninde 1,42 ve NF-KB geninde 2 kat mRNA ifade düzeyinde azalmaya neden olmuştur. NF-KB1 geninde, mRNA ifade düzeyinde 404i ve bortezomibim kontrole göre kıyasla 2,5 ve 9 kat azalış, C3-3 izolatına ait metabolitlerinse 2,7 kat artış olduğu belirlenmiştir.

404i izolatına ait aktif metabolitler THP-1 hücre hattında mRNA ifade düzeyini kontrole göre kıyaslandığında (Şekil 4.33) Apaf-1 ve Ask-1 gen ekspresyonlarının azalma görülürken TNF- α ve NF-KB genlerinde arttırmış olup, NF-KB1 geninde anlamlı bir azalma görülmüştür. C3-3 izolatına ait aktif metabolitler ve bortezomib ise Ask-1 mRNA ifade düzeyi hariç tüm gen bölgelerinde artış olmuştur.



Şekil 4.32 HL-60 hücre hattında mRNA ifade düzeyindeki farklılıklar



Şekil 4.33 THP-1 hücre hattında mRNA ifade düzeyindeki farklılıklar

İki metaboliti kendi arasında karşılaştıracak olursak, 404i izolatına ait aktif metabolitler apoptotik etki gösterirken, C3-3 izolatına ait aktif metabolitler ise nekrotik etki göstermiştir. Literatür araştırmalarında aktinomisetlerden izole edilen metabolitlerin farklı genler ve farklı hücre hatlarında mRNA ifade düzeylerinin araştırıldığını görmekteyiz. Örneğin, *Streptomyces levis* ABRIINW11 suşunun kültür sıvısının etherle ekstraksiyonu ile elde edilen metabolitlerin akut lenfoblastik lösemi hücre hatlarında (Nalm-6, Molt-4) P53, Bax ve Bcl2 genleri üzerindeki mRNA ve protein ifade düzeyleri araştırılmıştır. Her iki hücre hattında, ekstrakte edilen metabolitler, hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe ederek, apoptozu arttırmıştır. P53, Bax mRNA ve protein ekspresyonları artmış olmasına rağmen, Bcl-2 ekspresyonu kontrol ile karşılaştırıldığında metabolit verilen hücrelerde azalmıştır (Valipour vd., 2018). Aktinomiset izolatı olan SY-103'ten izole edilen metabolitlerinin insan lösemi hücrelerindeki (HL60, K562, U937 ve THP-1) kaspaz-3'ün aktivasyonu ve Akt 'nin inaktivasyonu araştırılmıştır. Hücre hatlarına verilen metabolitlerin neden olduğu kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptoz, Bcl-2'yi aşırı ifade eden U937 hücrelerinde önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Metabolitlerin (30 ng/ml) HL60, K562, U937 ve THP-1 hücre hatlarında kontrole göre kaspaz-3 geninde mRNA ifade düzeyleri tüm hücre hatlarında artmıştır; fakat THP-1 hücre hattında diğer hücrelere kıyasla en yüksek artış (6,5 kat) gözlemlenmiştir (Jeong vd., 2010). *Streptomyces* MUM256 suşunun aktif metabolitleri ile HCT116 (İnsan kolon kanseri) hücre hattında apoptoz çalışmaları yapılmıştır. MUM256 metabolitleri, BCL-

2 ailesinin bir üyesi olan Bax'ın HCT116 hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Tan vd., 20019). *Streptomyces levis* ABRINW111 suşunun metabolitlerinin SW480 hücre hattındaki kapaz-3 gen bölgesinin ve Ki-67 proteininin (MKI67 geni tarafından kodlanan bir protein) mRNA ifade düzeyinin araştırıldığı çalışmada; metabolitlerin 100, 500 ve 1000 ng/ml konsantrasyonlarda kaspaz-3 geninde kontrole göre gen ifadesinin tüm konsantrasyonlarda arttığı, Ki-67 proteininde ise tüm konsantrasyonlarda azalttığı saptanmıştır (Maragheh vd., 2018). *Streptomyces* sp. ERINLG-4'ten izole edilen flavonoidlerin, insan akciğer kanseri (A549) hücre hattındaki apoptozu araştırılmıştır. Konsantrasyonu 123 ve 164 µM olarak çalışılan flavonoidlerin kaspaz-3, kaspaz-9 ve P53 gen bölgelerindeki mRNA ifade düzeyleri iki farklı konsantrasyonda da kontrole göre artarken, Bcl-2 gen bölgesinde ise azalmıştır (Balachandran vd., 2014). *Streptomyces conglobatus* izole edilen neoantimisin-F (NAT-F) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hattındaki apoptotik etkinin araştırıldığı çalışmada, NAT-F'nin pro-apoptotik protein Bax'ı yukarı düzenleyebileceğini ve anti-apoptotik protein Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-x L'yi aşağı regüle edebileceğini ortaya konmuştur (Liu vd., 2019). *Streptomyces violaceoniger*'den izole edilen neoantimisin türevleri JBIR-04 ve JBIR-05'in insan fibrosarkom (HT1080) hücrelerinde 2-deoksiglukoz tarafından indüklenen GRP78 ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Izumikawa vd., 2007). *Streptomyces* sp. AC 654'ten izole edilen trieriksin sırasıyla 14 ve 19 ng/ml konsantrasyonda HeLa hücrelerine verilmiştir. Çalışma sonucunda trieriksin indüklenen XBP1-lusiferaz aktivasyonunu inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Tashiro vd., 2007).

Apaf-1 gen inaktivasyonu lösemi hücre dizilerinde gözlenir ve beklenen demetilasyon, bu hücrelerde Apaf-1 ekspresyonunu geri yükler (Yoshida vd., 1998). Çalışmamızda kullandığımız HL-60 hücre hattında tüm örneklerinde Apaf-1 gen ekspresyonunu arttırdığı; fakat THP-1 hücre hattında 404i ve bortezomibin gen ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. APAF-1, kaspaz 9'u aktiveleştirerek apoptozom oluşmasına neden olan bir gen bölgesidir. Uyarıcı olmadığı zaman stoplazmada bulunur, sitokrom c ile başlayan uyarı sonucunda apoptozom oluşturur. Kaspaz 9, kaspaz 3 uyararak apoptozis kaskadlarının birbiri ardına aktifleşmesini sağlamaktadır (Shakeri vd., 2017).

Ask-1 aktivatörü olan TNF-α geninde yaptığımız çalışma doğrultusunda iki hücre hattında da izolatlara ait metabolitlerin mRNA ekspresyonunu arttırdığı buna bağlı olarakta

apoptoz sinyal düzenleyici kinaz birin aktive olmasına yol açmıştır. THP-1 hücre hattında izolatlara ait metabolitlerin Ask-1 geninin ekspresyonunu azaltmış olup, H1-60 hücre hattında ise indüklemiştir. NF-KB'nin etkinleştirilmesi, MAPK yollarının etkinleştirilmesi ve ölüm sinyalinin tetiklenmesi gibi TNF sinyal yolları vardır. TNF- α geninde izolatların gen ekspresyonunu arttırarak NF-KB'nin etkinleştirilmesinde rol oynaması mümkündür. NF-KB alt birimi olan, NF-KB1 proteinleri sitoplazmada inaktif tutulur. NF-KB geninde izolatlara ait metabolitlerin mRNA gen ifadelerinin artması ile NF-KB resöptör aktiviteörünü etkinleştirmiştir. NF-KB1 geninde HL-60 hücre hattında tüm örnekler mRNA gen ekspresyonunu arttırmıştır. THP-1 hücre hattındaysa sadece C3-3 izolatu kontrole göre mRNA ifade düzeyini arttırmıştır. NF-KB sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla NF-KB1 proteinleri fosforilasyonu ve degradasyonu, NF-KB dimerlerinin çekirdeğe translokasyonuna yol açar (Concetti ve Wilson, 2018). Apoptotik sürecin çalışmasında kritik rol oynayan Apaf-1, Ask-1, TNF- α , NF-KB ve NF-KB1 genlerinin mRNA ifadeleri üzerinde izolatlara ait metabolitlerin etkili olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Literatüre göre özellikle NFKB'nin aktivasyonunun hematopoetik hücrelerde rastlanabilir bir durum olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni ise; özellikle mikroorganizma kökenli uyarıcıların inflamasyona neden olarak lökosit infiltrasyonuna neden olması ve NFKB oluşumunu tetiklemesidir.

İnflamasyonun tetiklenmesi immün sistemdeki birçok sitokini aktifleştirir ve tümör oluşumunu inhibe etmek için harekete geçirmektedir (Dror vd., 2010; Souri vd., 2019). Bortezomibin özellikle monosit, makrofaj gibi hücrelerde LPS stimülasyonu ile IL-8 sitokin düzeyini arttırdığı ve buna bağlı olarak da NF-KB gen ekspresyonunu arttırdığı beklenenin tersi bir bulgu olarak literatürde sunulmuştur. Diğer bir hipotezde şöyledir, bortezomibe dirençli olan hücre hatlarında apoptotik gen düzeylerinde artış olabilmektedir (Sanacora vd., 2015). Kullandığımız hücreler dirençli hatlar değildir fakat, uzun yıllardan beri kullanılıyor olması ve pasaj sayısının fazla olması buna neden olmuş olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada başka kurumlarda görev yapan araştırmacılardan temin edilen, kültür koleksiyonumuzda bulunan ve bu çalışma kapsamında izole edilen toplam 319 adet aktinomiset izolatının antioksidan, sitotoksik, apoptotik ve UV koruyucu aktiviteleri araştırılmıştır.

Yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatların belirlenmesi için yapılan tarama çalışmasında doğru ve yüksek performans gösterecek bir besiyerinin seçilmesi amacıyla temsili olarak seçilen 5 adet izolat (313, 602, 819, 1812 ve 1210) Soya Unu Mannitol Broth (SMM), Yeast Extract – Malt Extract Broth (YEME), Tryptone Yeast Extract Broth (TYB) ve Nişasta Kazein Broth (NKM) olmak üzere dört farklı sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Uygun fermentasyon ortamının belirlenmesi amacıyla total fenolik madde içerik tayini ve DPPH radikal süpürücü aktivite tayini yöntemleri kullanılarak elde edilen sayısal veriler istatistiksel analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. İki yöntemde sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, YEME ve SMM besiyerlerinin istatistiksel olarak birbirine benzer ve diğer besiyerlerine göre daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Kültür sıvısının süzülmesindeki zorluklar dikkate alınarak YEME besiyeri fermentasyon besiyeri olarak seçilmiştir.

Farklı araştırmacılar tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere iletilen Morca sediment/toprak örnekleri (Morca mağarası) ve Aspendos antik kentinden seyreltme plaka tekniği ve direkt serpme tekniği kullanılarak 117 adet aktinomiset izolatı izole edilmiştir.

Yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatların belirlenmesi için antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivite yöntemleri kullanılmıştır. DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi kullanılarak 319 adet aktinomiset izolatının % aktiviteleri araştırılmıştır. En yüksek ve en düşük antioksidan aktivite gösteren 30 adet aktinomiset izolatı Petride Agar Diskleri yöntemi kullanılarak taranmış ve antimikrobiyal aktivite gösteren tüm izolatlar elenmiştir. En yüksek ve en düşük antioksidan aktivite gösteren beşer izolat, MTS yöntemi kullanılarak taranmış ve en yüksek sitotoksik aktivite gösteren 404i (en yüksek antioksidan aktivite) ve

C3-3 izolatu (en düşük antioksidan aktivite) çalışmanın bir sonraki aşamalarında kullanılmak amacıyla seçilmiştir.

404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitlerinin eldesinde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi başarılı olmadığı için antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmalarında liyofilize kültür sıvıları kullanılmıştır. 404i ve C3-3 izolatlarının liyofilize kültür sıvılarının total fenolik madde miktarları 0,018 ve 0,019 mg/ml gallik asit eşdeğeri olarak bulunmuştur. DPPH radikal süpürücü aktivite yönteminde elde edilen EC₅₀ değerleri 16,589 ve 13,2 mg/ml olarak bulunmuştur. Redükleyici güç tayininde 404i izolatu bir aktivite göstermezken, C3-3 izolatu 9,64 mg/ml konsantrasyonda EC₅₀ değeri vermiştir. Beta karoten-linoleik asit yönteminde 120. dakikanın sonunda 404i izolatının beta karoteni %59 oranında ve C3-3 izolatının ise %68 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Yapılan metal şelatlayıcı aktivite çalışmasında 404i ve C3-3 izolatları sırasıyla 0,302 ve 0,291 mg/ml EDTA eşdeğeri olarak bulunmuştur. Her iki izolatta 0,3 mg/ml konsantrasyonda ABTS radikal katyon renksizleştirme yönteminde %100 aktiviteye ulaşmıştır. Lipitlerin peroksidasyonunu belirlemek amacıyla ferrik tiyosiyanat ve tiyobarbiturik asit yöntemleri kullanılmıştır. 404i ve C3-3 izolatlarına ait ekstraktlar lipitlerin peroksidasyonunu ferrik tiyosiyanat yönteminde %55,35 ve %55,88 oranında azaltmıştır. Tiyobarbiturik asit yönteminde her iki izolata ait aktif metabolitler, pozitif kontrol olan askorbik asitte oranla lipitlerin peroksidasyonunu azaltmıştır.

Ökaryotik bir hücre olan *S. cerevisiae* hücrelerinde yapılan UV koruyucu aktivite çalışmasında, izolatlara ait liyofilize kültür sıvıları UV koruyucu özellik göstermemiştir.

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi amacıyla yapılan MTS testinde 404i ve C3-3 izolatları sırasıyla K562 hücre hattında IC₅₀ değerleri 312,57 ve 266,66 µg/ml, HL-60 hücre hattında 141,80 ve 75,85 µg/ml ve THP-1 hücre hattında 112,95 ve 90,42 µg/ml olarak bulunmuştur. HL-60 ve THP-1 hücre hattına ait IC₅₀ konsantrasyonlarının 404i ve C3-3 izolatlarının Apaf-1, Ask-1, TNF-α, NF-KB ve NF-KB1 genlerinin mRNA ifadeleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. 404i izolatının aktif metabolitleri HL-60 hücre hattında kontrole göre kıyaslandığında Apaf-1, Ask-1, TNF-α ve NF-KB ve NF-KB1 genlerinde mRNA ifade düzeyini arttırdığı; THP-1 hücre hattında ise Apaf-1, Ask-1 ve NF-KB1

genlerinde mRNA ifade düzeyini azalttığı belirlenmiştir. C3-3 izolatının metabolitleri hem HL-60 hem de THP-1 hücre hattında tüm genlerde mRNA ifade düzeyini arttırmıştır.

Bilindiği üzere antioksidan maddelerin tıbbi, kozmetik ve gıda endüstrisi gibi birçok kullanım alanı vardır. Antioksidanlarla ilişkili olduğu düşünülen sitotoksik maddelerin kanserin kontrol altına alınmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmalarında başarılı sonuçlar elde ettiğimiz 404i ve C3-3 izolatlarının moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve sonrasında biyoaktif bileşenlerinin karakterizasyonuna yönelik çalışmaların yapılması öncelikli olmalıdır. Tanımlanan bileşenlerin üretim verimliliğinin artması amacıyla besiyeri optimizasyonu ve sonrasında ölçek büyütme aşamasına geçilebilir. Çalışmada kullandığımız hücre hatları dışında farklı lösemi hücre hatlarında 404i ve C3-3 izolatlarının aktif metabolitlerinin sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenmelidir. Çalışmada kullandığımız gen bölgeleri haricinde apoptozda kilit rol oynayan hücre ölüm reseptörleri, kaspazlar ve Bcl-2 gen ailesi üzerinde 404i ve C3-3 izolatlarının mRNA ifade düzeyleri çalışılmalıdır.

İzolatlarımızdan 404i antioksidan, sitotoksik ve apoptotik etkileri açısından değerlendirildiğinde üzerinde ayrıntılı moleküler çalışmaların yapılması gereken önemli bir antiproliferatif metabolit aday olma potansiyeline sahiptir.

Elde edilen sonuçlar ışığında 404i ve C3-3 izolatlarının tanımlanmış ve optimize edilmiş biyoaktif bileşenleri, doğal antioksidanlara artan önem de göz önünde bulundurulduğunda, BHT gibi toksik antioksidan maddelere bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelfattah, M. S., Elmallah, M. I. Y., Hawas, U. W., Abou El-Kassem, L. T., & Eid, M. A. G., 2016. Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 651-657.
- Abd-Elnaby, H., Abo-Elala, G., Abdel-Raouf, U., Abd-elwahab, A., & Hamed, M., 2016. Antibacterial and anticancer activity of marine *Streptomyces parvus*: optimization and application. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 180-191.
- Ali, Md & Sultana, Shirin., 2012. Blood cancer. 10.13140/RG.2.1.4602.4803.
- Almasi, F., Mohammadipناه, F., Adhami, H. R., & Hamedi, J., 2018. Introduction of marine-derived *Streptomyces* sp. UTMC 1334 as a source of pyrrole derivatives with anti-acetylcholinesterase activity. *Journal of applied microbiology*, 125(5), 1370-1382.
- Amagasaki, T., Green, R., & Jacobsen, D. W., 1990. Expression of transcobalamin II receptors by human leukemia K562 and HL-60 cells.
- Anderson, M. J., 2001. Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 58(3), 626-639.
- Andersson, L. C., Nilsson, K., & Gahmberg, C. G., 1979. K562—a human erythroleukemic cell line. *International journal of cancer*, 23(2), 143-147.
- Anonim, 2020, Antioksidan Aktivitenin DPPH Yöntemi ile Belirlenmesi, <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>, erişim tarihi: 19.12.2020
- Araújo, JMD, Silva, ACD ve Azevedo, JL., 2000. Mısırın köklerinden ve yapraklarından endofitik aktinomisetlerin izolasyonu (*Zea mays* L.). *Brezilya Biyoloji ve Teknoloji Arşivi*, 43 (4), 0-0.
- Ardestani, S., Deskins, D. L., & Young, P. P., 2013. Membrane TNF-alpha-activated programmed necrosis is mediated by Ceramide-induced reactive oxygen species. *Journal of molecular signaling*, 8, 12.
- Arora, D. S., & Chandra, P., 2011. Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*. *ISRN pharmacology*, 2011.
- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569(1-3), 19.
- Arroyo, I., & Arroyo, G., 1996. Annual microbiological analysis of Altamira cave (Santillana del Mar), Spain. In 8th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone (pp. 601-608).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arslan, D. Ö., Korkmaz, G., & Gözüaçık, D., 2011. Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *ACU Sağlık Bil Derg*, 2011(2):184-194
- Arumugam, M., Mitra, A., Jaisankar, P., Dasgupta, S., Sen, T., Gachhui, R., ... & Mukherjee, J., 2010. Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(1), 109-117.
- Atıcı, E., 2007. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk onkoloji dergisi*, 22(4), 197-204.
- Aydın, C., Ermiş, A., & Mammadov, R., 2015. Phenolic contents and antioxidant properties of *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. ex Sprengel ethanol extract. *International Journal of Secondary Metabolite*, 2(1), 18-26.
- Balachandran, C., Sangeetha, B., Durairandiyan, V., Raj, M. K., Ignacimuthu, S., Al-Dhabi, N. A., ... & Arasu, M. V., 2014. A flavonoid isolated from *Streptomyces* sp.(ERINLG-4) induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through p53 and cytochrome c release caspase dependant pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 24-35.
- Baud'Huin, M., Lamoureux, F., Duplomb, L., Rédini, F., & Heymann, D. R. A. N. K. L., 2007. Rankl, Rank, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(18), 2334-2350.
- Bayer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*, 45(4), 493-496.
- Beinke, S., & Ley, S. C., 2004. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochemical Journal*, 382(2), 393-409.
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Bernal, G. M., Wahlstrom, J. S., Crawley, C. D., Cahill, K. E., Pytel, P., Liang, H., ... & Yamini, B. 2014. Loss of Nfkb1 leads to early onset aging. *Aging (Albany NY)*, 6(11), 931.
- Betteridge, D. J., 2000. What is oxidative stress?. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 49(2), 3-8.
- Beyhan, Ö., Elmastas, M., & Gedikli, F., 2010. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(11), 1065-1072.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F., 2020. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blank, M., & Shiloh, Y., 2007. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle*, 6(6), 686-695.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Breitman, T. R., Collins, S. J., & Keene, B. R., 1980. Replacement of serum by insulin and transferrin supports growth and differentiation of the human promyelocytic cell line, HL-60. *Experimental cell research*, 126(2), 494-498.
- Brücher, B. L., Lang, F., & Jamall, I. S., 2019. NF- κ B signaling and crosstalk during carcinogenesis. *4open*, 2, 13.
- Burci, L. M., da Silva, C. B., de Oliveira, M., Dalarmi, L., Zanin, S. M. W., Miguel, O. G., ... & Miguel, M. D., 2015. Determination of antioxidant, radical scavenging activity and total phenolic compounds of *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit) seeds extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(40), 1013-1020.
- Burton, G. W., Joyce, A., & Ingold, K. U., 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 221(1), 281-290.
- Büyüktuncel, E., 2013. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler.
- Cano, A., Acosta, M., & Arnao, M. B., 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5(6), 365-370.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology and medicine*, 14(3), 303-311.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical biology and medicine*, 22(5), 749-760.
- Chang, H. B., & Kim, J. H., 2007. Antioxidant properties of dihydroherbimycin A from a newly isolated *Streptomyces* sp. *Biotechnology letters*, 29(4), 599-603.
- Chang, L. W., Yen, W. J., Huang, S. C., & Duh, P. D., 2002. Antioxidant activity of sesame coat. *Food chemistry*, 78(3), 347-354.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chapman, R. A., & Mackay, K., 1949. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 26(7), 360-363.
- Chaudière, J., & Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10), 949-962.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K., 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(9), 2619-2623.
- Chen, Y., Liu, R. H., Li, T. X., Huang, S. S., Kong, L. Y., & Yang, M. H., 2017. Enduspeptides AF, six new cyclic depsipeptides from a coal mine derived *Streptomyces* sp. *Tetrahedron*, 73(5), 527-531.
- Chen, Y., Mao, W., Tao, H., Zhu, W., Qi, X., Chen, Y., ... & Wang, C., 2011. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresource technology*, 102(17), 8179-8184.
- Cheng, H., Cao, X., Xian, M., Fang, L., Cai, T. B., Ji, J. J., ... & Wang, P. G., 2005. Synthesis and enzyme-specific activation of carbohydrate– geldanamycin conjugates with potent anticancer activity. *Journal of medicinal chemistry*, 48(2), 645-652.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C., & Ooi, V. E., 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food chemistry*, 81(2), 249-255.
- Christudas, I. N., Kumar, P. P., & Agastian, P., 2013. In vitro α -glucosidase inhibition and antioxidative potential of an endophyte species (*Streptomyces* sp. Loyola UGC) isolated from *Datura stramonium* L. *Current Microbiology*, 67(1), 69-76.
- Concetti, J., & Wilson, C. L., 2018. NF κ B1 and cancer: friend or foe?. *Cells*, 7(9), 133.
- Contreras-Guzmán, E. S., & Strong III, F. C., 1982. Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 65(5), 1215-1221.
- Cordani, M., Butera, G., Pacchiana, R., & Donadelli, M., 2017. Molecular interplay between mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1867(1), 19-28.
- Coşkun, G., & Özgür, H., 2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Crawford, D. L., 1978. Lignocellulose decomposition by selected streptomyces strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35(6), 1041-1045.
- Cui, C. B., Liu, H. B., Gu, J. Y., Gu, Q. Q., Cai, B., Zhang, D. Y., & Zhu, T. J., 2007. Echinospirins as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from marine-derived *Streptomyces albogriseolus*. *Fitoterapia*, 78(3), 238-240.
- D'Costa, A. R., & Santoro, I., 2009. The effect of UV radiation on the survival of yeast and its implication to a real-life situation. In *Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 30th Workshop on Tested Studies for Laboratory Teaching (Vol. 30, p. 371)*.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., & Linssen, J. P., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 140-146.
- Davies-Bolorunduro, O. F., Adeleye, I. A., Akinleye, M. O., & Wang, P. G., 2019. Anticancer potential of metabolic compounds from marine actinomycetes isolated from Lagos Lagoon sediment. *Journal of pharmaceutical analysis*, 9(3), 201-208.
- Deepak, B., & Iqbal, Z., 2015. Lyophilization—Process and Optimization for Pharmaceuticals. *IJDRA*, 3(1), 30-40.
- Demain, A. L., & Sanchez, S., 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1), 5-16.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*, 274(2), 532-538.
- Diplock, A. T., 1997. Will the 'good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease?. *Free radical research*, 27(5), 511-532.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., et al., *Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites*, *J. Biotechnol.*, 2002, 99, 187-198
- Dror, R., Lederman, M., Umezawa, K., Barak, V., Pe'er, J., & Chowers, I., 2010. Characterizing the involvement of the nuclear factor-kappa B (NFκB) transcription factor in uveal melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(4), 1811-1816.
- Duh, P. D., Tu, Y. Y., & Yen, G. C., 1999. Antioxidant activity of water extract of Harg Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT-Food Science and Technology*, 32(5), 269-277.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duraikannu, D., D Chandrasekaran, S., N Selvakumar, J., & Vaithilingam, M., 2014. A preliminary study of in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Streptomyces gancidicus* VITSD1 isolated from marine soil. *Current Bioactive Compounds*, 10(4), 292-297.
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y., 2013. Human housekeeping genes, revisited. *TRENDS in Genetics*, 29(10), 569-574.
- Ekici, L., & Sağdıç, O., 2008. Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. *Gıda*, 33(5), 251-260.
- El Sayed, O. H., Asker, M. M., Swelim, M. A., Abbas, I. H., Attwa, A. I., & El Awady, M. E., 2016. Production of hydroxy marilone C as a bioactive compound from *Streptomyces badius*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 161-168.
- El-Naggar, N. E. A., & El-Ewasy, S. M., 2017. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific reports*, 7, 42129.
- El-Nakeeb, M. A., & Lechevalier, H. A., 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11(2), 75-77.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. M., 1999. The biology of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 341(3), 164-172.
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- Ferreira, I. C., Baptista, P., Vilas-Boas, M., & Barros, L., 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food chemistry*, 100(4), 1511-1516.
- Flohé, L., Brigelius-Flohé, R., Saliou, C., Traber, M. G., & Packer, L., 1997. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(6), 1115-1126.
- Ford, L., Theodoridou, K., Sheldrake, G. N., & Walsh, P. J., 2019. A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, 30(6), 587-599.
- Freshney, R. I., 2005. Cytotoxicity. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fridovich, I., 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 13-18.
- Fu, P., Yang, C., Wang, Y., Liu, P., Ma, Y., Xu, L., ... & Zhu, W., 2012. Streptocarbazoles A and B, two novel indolocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain *Streptomyces* sp. FMA. *Organic letters*, 14(9), 2422-2425.
- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., & Nirgude, P. S., 2015. Lyophilization/freeze drying—a review. *World journal of pharmaceutical research*, 4(8), 516-543.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., ... & Gallo, R., 1979. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, Vol. 54, No. 3
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*, 14(7), 1237.
- Gautham, S. A., & Onkarappa, R., 2013. In vitro antioxidant activity of metabolite from *Streptomyces fradiae* strain GOS1. *International Journal of Drug Development and Research*, 5(1), 235-244.
- Geary, C. G., 2000. The story of chronic myeloid leukaemia: Historical review. *British journal of haematology*, 110(1), 2-11.
- Gezer, K., Duru, M. E., Kivrak, I., Turkoglu, A., Mercan, N., Turkoglu, H., & Gulcan, S., 2006. Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 5(20).
- Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood Jr, D. R., & Prenzler, P. D., 2017. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food chemistry*, 230, 195-207.
- Gillet, J. P., Efferth, T., & Remacle, J., 2007. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1775(2), 237-262.
- Gilmore, T. D., 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684.
- Golstein, P., & Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37-43.
- Goodfellow, M. and Williams, S.T., 1983, Ecology of Actinomycetes, *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 189-216.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goodfellow, M., & Williams, S. T., 1983. Ecology of actinomycetes. Annual review of microbiology, 37(1), 189-216.
- Gorajana, A., Venkatesan, M., Vinjamuri, S., Kurada, B. V., Peela, S., Jangam, P., ... & Zeeck, A., 2007. Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. Microbiological Research, 162(4), 322-327.
- Gökbulut, A., & Şarer, E., 2008. Karotenoitler ve sağlık. Ankara Ecz. Fak. Derg 37 (3) 235 – 256
- Gözde, I. Ş. I. K., Demirezen, Ş., & Beksaç, M. S., 2008. Tümör nekroz faktör ve servikal kanser bağlantısı. Turkish Journal of Scientific Reviews, 1(2), 55-61.
- Granger, D. N., Rutili, G., & McCord, J. M., 1981. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology, 81(1), 22-29.
- Green, D. R., & Llambi, F., 2015. Cell death signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 7(12), a006080.
- Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K., Kramer, I., & Stackebrandt, E., 1999. *Beutenbergia cavernae* gen. nov., sp. nov., an L-lysine-containing actinomycete isolated from a cave. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49(4), 1733-1740.
- Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., & Sáiz-Jiménez, C., 1999. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). Journal of microbiological methods, 36(1-2), 115-122.
- Gülçin, İ., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology, 217(2-3), 213-220.
- Hampton, M. B., & Orrenius, S., 1998. Redox regulation of apoptotic cell death. Biofactors, 8(1-2), 1-5.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. cell, 100(1), 57-70.
- Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., ... & Ferris, C. D., 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. Nature cell biology, 7(7), 665-674.
- Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C., & Ichijo, H., 2009. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. Cell Communication and Signaling, 7(1), 9.
- Hazra, B., Biswas, S., & Mandal, N., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. BMC complementary and Alternative Medicine, 8(1), 63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- He, Y., Zhang, W., Zhang, R., Zhang, H., & Min, W., 2006. SOCS1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5559-5566.
- Hezbri, Karima, et al., 2015. "Geodermatophilus aquaeductus sp. nov., isolated from the ruins of Hadrian's aqueduct." *Antonie Van Leeuwenhoek* 108.1: 41-50.
- Houtgraaf, JH, Versmissen, J. ve van der Giessen, WJ., 2006. Memeli hücrelerinde DNA hasarı kontrol noktalarının ve onarımının kısa bir incelemesi. *Kardiyovasküler Revaskülarizasyon Tıbbı* , 7 (3), 165-172.
- Hu, S. C., Hong, K., Song, Y. C., Liu, J. Y., & Tan, R. X., 2009. Biotransformation of soybean isoflavones by a marine *Streptomyces* sp. 060524 and cytotoxicity of the products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 115.
- Hu, S. H., Lien, J. L., Hsieh, S. L., Wang, J. C., & Chang, S. J., 2009. Antioxidant and antigenotoxicity activities of extracts from liquid submerged culture of culinary-medicinal ferula oyster mushroom, *Pleurotus eryngii* (DC.) Quel. var. *ferulae* (Lanzi) Sacc.(Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(4).
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huck, T. A., Porter, N., & Bushell, M. E., 1991. Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. *Microbiology*, 137(10), 2321-2329.
- Hussain, A., Rather, M. A., Dar, M. S., Dangroo, N. A., Aga, M. A., Shah, A. M., ... & Hassan, Q. P., 2018. *Streptomyces puniceus* strain AS13., Production, characterization and evaluation of bioactive metabolites: A new face of dinactin as an antitumor antibiotic. *Microbiological research*, 207, 196-202.
- Hutter, J. J., 2010. Childhood leukemia. *Pediatrics in Review*, 31(6).
- Ichikawa, T., Date, M., Ishikura, T., & Ozaki, A., 1971. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia microbiologica*, 16(3), 218-224.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A., & Sasner, J. J., 200. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(7), 1811-1815.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Inatani, R., Nakatani, N., & Fuwa, H., 1983. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and biological chemistry*, 47(3), 521-528.
- Ion, A., Popa, I. M., Papagheorghe, L. M. L., Lisievici, C., Lupu, M., Voiculescu, V., ... & Boda, D., 2016. Proteomic approaches to biomarker discovery in cutaneous T-cell lymphoma. *Disease markers*, 2016.
- Izumikawa, M., Ueda, J. Y., Chijiwa, S., Takagi, M., & Shin-ya, K., 2007. Novel GRP78 molecular chaperone expression down-regulators JBIR-04 and-05 isolated from *Streptomyces violaceoniger*. *The Journal of antibiotics*, 60(10), 640-644.
- Izuta, S., Kosaka, S., Kawai, M., Miyano, R., Matsuo, H., Matsumoto, A., ... & Nakashima, T., 2018. Dipyrimicin A and B, microbial compounds isolated from *Amycolatopsis* sp. K16-0194. *The Journal of antibiotics*, 71(5), 535-537.
- Jain, S. K., Pathania, A. S., Parshad, R., Raina, C., Ali, A., Gupta, A. P., ... & Vishwakarma, R. A., 2013. Chrysomycins A–C, antileukemic naphthocoumarins from *Streptomyces sporoverrucosus*. *RSC advances*, 3(43), 21046-21053.
- Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigopal, D. V. R., & Narasimha, G., 2014. Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties. *Biotechnology research international*, 2014.
- Jeong, S. Y., & Han, M. H., 2010. Apoptosis induction of human leukemia cells by *Streptomyces* sp. SY-103 metabolites through activation of caspase-3 and inactivation of Akt. *International journal of molecular medicine*, 25(1), 31-40.
- Jeong, S. Y., Shin, H. J., Kim, T. S., Lee, H. S., Park, S. K., & Kim, H. M., 2006. Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. *The Journal of antibiotics*, 59(4), 234-240.
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, 4(2), 147-171.
- Jung, M. J., Heo, S. I., & Wang, M. H., 2008. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry*, 108(2), 482-487.
- Jurkiewicz, B. A., & Buettner, G. R., 1994. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochemistry and photobiology*, 59(1), 1-4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kamala, K., Sivaperumal, P., Gobalakrishnan, R., Swarnakumar, N. S., & Rajaram, R., 2015. Isolation and characterization of biologically active alkaloids from marine actinobacteria *Nocardiopsis* sp. NCS1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 63-69.
- Kaman, T., Karasakal, Ö. F., Oktay, E. Ö., Ulucan, K., & Konuk, M., 2019. In silico approach to the analysis of SNPs in the human APAF1 gene. *Turkish Journal of Biology*, 43(6), 371.
- Kamtekar, S., Keer, V., & Patil, V., 2014. Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. *Journal of applied pharmaceutical Science*, 4(9), 61.
- Kannabiran, K., 2010. Characterization of antioxidant activity of *Streptomyces* species VITTK3 isolated from Puducherry Coast, India.
- Karadağ, A., 2016. Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15 (2), 19-26. DOI: 10.1501/Ashd_0000000117
- Karthik, L., Kumar, G., & Rao, K. V. B., 2013. Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 6(4), 325-332.
- Kasnak, C., & Palamutoğlu, R., 2015. Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(5), 226-234.
- Kato, S., 1994. Novel antioxidants from microorganisms and their pharmaceutical effects. *Actinomycetologica*, 8(1), S9.
- Kawahara, T., Izumikawa, M., Otaguro, M., Yamamura, H., Hayakawa, M., Takagi, M. ve Shin-ya, K., 2012. JBIR-94 ve JBIR-125, *Streptomyces* sp. R56-07. Doğal ürünler dergisi , 75 (1), 107-110.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- Kekuda, P. T. R., Shobha, K. S., & Onkarappa, R., 2010. Studies on antioxidant and anthelmintic activity of two *Streptomyces* species isolated from Western Ghat soils of Agumbe, Karnataka. *Journal of Pharmacy Research*, 3(1), 26-29.
- Kekuda, T. P., Onkarappa, R., Gautham, S. A., Mesta, S. C., & Raghavendra, H. L., 2015. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic activity of *Streptomyces* species from Western Ghat Soils of Karnataka, India. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 4(2), 164-180.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kekuda, T.P., Shobha, KS ve Onkarappa, R., 2010. Actinomycete metabolitlerinin büyüleyici çeşitliliği ve güçlü biyolojik aktiviteleri. *Eczacılık Araştırmaları Dergisi*, 3 (2), 250-256.
- Kim, K. J., Kim, M. A., & Jung, J. H., 2008. Antitumor and antioxidant activity of protocatechualdehyde produced from *Streptomyces lincolnensis* M-20. *Archives of pharmacal research*, 31(12), 1572-1577.
- Kim, M. C., Lee, J., Kim, D. H., Son, H. J., & Heo, M. S., 2014. Isolation and identification of antioxidant producing marine-source actinomycetes and optimal medium conditions. *Food science and Biotechnology*, 23(5), 1629-1635.
- Kim, S. J., & Kim, G. H., 2006. Quantification of quercetin in different parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. *Food Science and Biotechnology*, 15(1), 39-43.
- Kim, Y. S., Cho, J. H., Ahn, J., & Hwang, B., 2006. Upregulation of isoprenoid pathway genes during enhanced saikosaponin biosynthesis in the hairy roots of *Bupleurum falcatum*. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 22(3).
- Kimura, K. I., & Bugg, T. D., 2003. Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis. *Natural product reports*, 20(2), 252-273.
- Kiruthika, P., & Nisshanthini, S. D., 2013. In vitro antimicrobial and antioxidant profile of *Streptomyces* Sp. isolated from Coromandel coast region, India.
- Klein, E., Vánky, F., Ben-Bassat, H., Neumann, H., Ralph, P., Zeuthen, J., & Polliack, A., 1976. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *International journal of cancer*, 18(4), 421-431.
- Kohen, R., & Nyska, A., 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., ... & Kominami, E., 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 425-434.
- Kontogiorgis, A. C., Pontiki, A. E., & Hadjipavlou-Litina, D., 2005. A review on quantitative structure-activity relationships (QSARs) of natural and synthetic antioxidants compounds. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 5(6), 563-574.
- Kumar, P. P., Raj, J. P., Christhudas, I. N., Jansi, R. S., Raj, M. N., & Agastian, P., 2014. α -Glucosidase Inhibition and Antioxidant Properties of *Streptomyces* sp.: In Vitro. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(3), 1687-1698.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, P. S., Al-Dhabi, N. A., Duraipandiyar, V., Balachandran, C., Kumar, P. P., & Ignacimuthu, S., 2014. In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. *BMC microbiology*, 14(1), 291.
- Kumar, S., 2011. Free radicals and antioxidants: human and food system. *Adv Appl Sci Res*, 2(1), 129-135.
- Kumar, V., Bharti, A., Gupta, V. K., Gusain, O., & Bisht, G. S., 2012. Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 871-880.
- Kurakhamsang, S., Moonmangmee, S., Khunajakr, N., & Moonmangmee, D., 2019. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of Selected Actinomycetes sp. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal-วารสาร ไทย เกษษศาสตร์ และ วิทยาศาสตร์ สุขภาพ*, 14(1), 1-8.
- Kurosawa, K., Bui, V. P., VanEssendelft, J. L., Willis, L. B., Lessard, P. A., Ghiviriga, I., ... & Sinskey, A. J., 2006. Characterization of *Streptomyces* MITKK-103, a newly isolated actinomycin X 2-producer. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(1), 145-154.
- Kurosawa, K., Takahashi, K., & Tsuda, E., 2001. SNF4435C and D, Novel Immunosuppressants Produced by a Strain of *Streptomyces spectabilis*. *The Journal of antibiotics*, 54(7), 541-547.
- Küster, E. and Williams, S.T., 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*, *Nature (London)*, 202, 928-929.
- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 245-251.
- Lee, D. R., Lee, S. K., Choi, B. K., Cheng, J., Lee, Y. S., Yang, S. H., & Suh, J. W., 2014. Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(12), 962-967.
- Lee, S. D., 2006. *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(3), 559-562.
- Lee, S. D., 2006. *Amycolatopsis jejuensis* sp. Kasım ve *Amycolatopsis halotolerans* sp. kasım, doğal bir mağaradan izole edilmiş yeni aktinomisetler. *Uluslararası sistematik ve evrimsel mikrobiyoloji dergisi*, 56 (3), 549-553.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lei, W., Peng, Q., Xiu-Feng, L. O. N. G., ZHANG, S., Zhi-Gang, Z., & Yong-Qiang, T., 2016. Comparative analysis of chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activities of ethylacetate extracts of *Polygonum cuspidatum* and its endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. A0916. *Chinese journal of natural medicines*, 14(2), 117-123.
- Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J. M., Saintpierre-Bonaccio, D., ... & Boiron, P., 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian journal of microbiology*, 49(11), 669-674.
- Li, C., Ji, C., & Tang, B., 2018. Purification, characterisation and biological activity of melanin from *Streptomyces* sp. *FEMS microbiology letters*, 365(19), fny077.
- Li, J., Zhao, G. Z., Chen, H. H., Wang, H. B., Qin, S., Zhu, W. Y., ... & Li, W. J., 2008. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Letters in applied microbiology*, 47(6), 574-580.
- Liu, L. Y., Zhu, H. R., Wu, W., Shen, Y. Y., Wu, Y., Zhou, Y. J., ... & Lin, H. W., 2019. Neoantimycin F, a *Streptomyces*-Derived Natural Product Induces Mitochondria-Related Apoptotic Death in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1042.
- Liu, R., Cui, C. B., Duan, L., Gu, Q. Q., & Zhu, W. M., 2005. Potent in Vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. *Archives of pharmacal research*, 28(12), 1341-1344.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., & Menichini, F., 2012. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 179-184.
- Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.
- Lu, Y., Shipton, F. N., Khoo, T. J., & Wiart, C., 2014. Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. *Pharmacology & Pharmacy*, 2014.
- Manasa, M., Poornima, G., Abhipsa, V., Rekha, C., Prashith, K. T. R., Onkarappa, R., & Mukunda, S., 2012. Antimicrobial and antioxidant potential of *Streptomyces* sp. RAMPP-065 isolated from Kudremukh soil, Karnataka, India. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 1(3), 39-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Manivasagan, P., Sivasankar, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., & Kim, S. K., 2013. Production and characterization of an extracellular polysaccharide from *Streptomyces violaceus* MM72. *International journal of biological macromolecules*, 59, 29-38.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K., 2013. Production, characterization and antioxidant potential of protease from *Streptomyces* sp. MAB18 using poultry wastes. *BioMed research international*, 2013.
- Maragheh, B. F. A., Fatourachi, P., Mohammadi, S. M., Valipour, B., Behtari, M., Dehnad, A., & Charoudeh, H. N., 2018. *Streptomyces Levis* ABRIINW111 Inhibits SW480 Cells Growth by Apoptosis Induction. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(4), 675.
- Matsuo, Y., MacLeod, R. A. F., Uphoff, C. C., Drexler, H. G., Nishizaki, C., Katayama, Y., ... & Orita, K., 1997. Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins (11; 9)(q23; p22p23). *Leukemia*, 11(9), 1469-1477.
- Mc Carthy, A.J., and Williams, S.T., 1990. Methods for studying the Actinomycetes, *Methods in Microbiology*, 22, 533-563.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., & Philosoph-Hadas, S., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(7), 1813-1819.
- Meyer, R., Hatada, E. N., Hohmann, H. P., Haiker, M., Bartsch, C., Röthlisberger, U., ... & Scheidereit, C., 1991. Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor kappa B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(3), 966-970.
- Minatel, I. O., Francisqueti, F. V., Corrêa, C. R., & Lima, G. P. P., 2016. Antioxidant activity of γ -oryzanol: A complex network of interactions. *International journal of molecular sciences*, 17(8), 1107.
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., & Kawanishi, S., 2005. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life sciences*, 76(13), 1439-1453.
- Mohammadipanah, F. ve Momenilandi, M., 2018. Nadir aktinomisetlerin çoklu oksidan maddelere karşı metabolitlerin üretiminde potansiyeli. *Farmasötik biyoloji*, 56 (1), 51-59.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nafis, A., Kasrati, A., Azmani, A., Ouhdouch, Y., & Hassani, L., 2018. Endophytic actinobacteria of medicinal plant *Aloe vera*: Isolation, antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity assays and taxonomic study. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(10), 513.
- Nagababu, E., Rifkind, J. M., Boindala, S., & Nakka, L., 2010. Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. In *Free Radicals and Antioxidant Protocols* (pp. 165-180). Humana Press.
- Nah, J. H., Choi, S. S., Kim, D., Shin, H. S., Sherman, D. H., & Kim, E. S., 2012. Biosynthesis of an engineered tautomycetin analogue via disruption of *tmcK*-encoding terminal decarboxylase in *Streptomyces* CK4412. *Process biochemistry*, 47(12), 1773-1778.
- Naine, J. S., Nasimunislam, N., Vaishnavi, B., Mohanasrinivasan, V., & Devi, S. C., 2012. Isolation of soil actinomycetes inhabiting amrithi forest for the potential source of bioactive compounds. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 5(3), 189-192.
- Nakaew, N., Pathom-aree, W. ve Lumyong, S., 2009. Tay mağara topraklarından nadir aktinomisetlerin genel çeşitliliği ve yeni biyoaktif bileşikler olarak kullanımları. *Actinomycetologica*, 23 (2), 21-26.
- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., & Krishna, D. R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33(1), 2-16.
- Narendhran, S., Rajiv, P., Vanathi, P., & Sivaraj, R., 2014. Spectroscopic analysis of bioactive compounds from *Streptomyces cavouresis* kuv39: Evaluation of antioxidant and cytotoxicity activity. *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 6, 319-322.
- Nedialkova, D., & Naidenova, M., 2005. Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica.
- Nicotera, P., & Melino, G., 2004. Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757-2765.
- Nimse, S. B., & Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Niyomvong, N., Pathom-Aree, W., Thamchaipenet, A., & Duangmal, K., 2012. Actinomycetes from tropical limestone caves. *Chiang Mai J. Sci.*, 39(3), 373-388.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., ... & Ichijo, H., 2005. Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 37033-37040.
- Nybakken, L., Solhaug, KA, Bilger, W. ve Gauslaa, Y., 2004. Likenler *Xanthoria elegans* ve *Cetraria islandica*, Arktik habitatlarda UV-B radyasyonuna karşı yüksek koruma sağlar. *Oecologia* , 140 (2), 211-216.
- Nygaard, G., Di Paolo, J. A., Hammaker, D., Boyle, D. L., Budas, G., Notte, G. T., ... & Firestein, G. S., 2018. Regulation and function of apoptosis signal-regulating kinase 1 in rheumatoid arthritis. *Biochemical pharmacology*, 151, 282-290.
- Oktay, M., Gülçin, İ., & Küfrelioğlu, Ö. İ., 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 36(2), 263-271.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., & Finance, C., 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *European Journal of Soil Biology*, 37(2), 69-74.
- Ozcelik, B., Lee, J. H., & Min, D. B., 2003. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2), 487-490.
- ÖnayUçar, E., Karagöz, A., & Arda, N., 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77(7-8), 556-560.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., ... & Villares, A., 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678.
- Papa, S., Bubici, C., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Kuntzen, C., Knabb, J. R., ... & Franzoso, G., 2006. The NF-κB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 712-729.
- Parenti, F., Beretta, G., Berti, M., & Arioli, V., 1978. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *The Journal of antibiotics*, 31(4), 276-283.
- Parmar, R. S., & Singh, C., 2018. A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. *Biochemistry and biophysics reports*, 13, 22-26.
- Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J., 2016. Adult acute lymphoblastic leukemia. In *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, Vol. 91, No. 11, pp. 1645-1666)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- Pokorný, J., 2007. Are natural antioxidants better–and safer–than synthetic antioxidants?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629-642.
- Pompili, M., Biolato, M., Miele, L., & Grieco, A., 2013. Tumor necrosis factor- α inhibitors and chronic hepatitis C: a comprehensive literature review. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(44), 7867.
- Ponder, B. A., 2001. Cancer genetics. *Nature*, 411(6835), 336-341.
- Prior, R. L., & Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods1. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1173-1181.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Proestos, C., & Komaitis, M., 2009. Antioxidant capacity of hops. In *Beer in health and disease prevention* (pp. 467-474). Academic Press.
- Pui, C. H., Relling, M. V., & Downing, J. R., 2004. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 350(15), 1535-1548.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028-22034.
- Radice, M., Manfredini, S., Ziosi, P., Dissette, V., Buso, P., Fallacara, A., & Vertuani, S., 2016. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia*, 114, 144-162.
- Raja, M., Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., & Vijayakumar, V., 2010. In vitro antibacterial activity of diterpene and benzoxazole derivatives from *Excoecaria agallocha* L. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(3).
- Rajan, P. C., Priya, A. M., Jayapradha, D., & Devi, S. S., 2012. Isolation and characterization of marine actinomycetes from West Coast of India for its antioxidant activity and cytotoxicity. *Int J Pharma Bio Arch*, 3, 641.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramachandran, S., & Prasad, N. R., 2008. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chemico-biological interactions*, 176(2-3), 99-107.
- Ramesh, S., & Mathivanan, N., 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2103-2111.
- Ramos, D., Pellin-Carcelen, A., Agusti, J., Murgui, A., Jorda, E., Pellin, A., & Monteagudo, C., 2015. Deregulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression during tumor progression of human cutaneous melanoma. *Anticancer Research*, 35(1), 439-444.
- Ramya, S., Shanmugasundaram, T., & Balagurunathan, R., 2015. Biomedical potential of actinobacterially synthesized selenium nanoparticles with special reference to anti-biofilm, anti-oxidant, wound healing, cytotoxic and anti-viral activities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 32, 30-39.
- Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernández, E., Hidalgo, M. E., Quihot, W., ... & Oltmanns, U., 2002. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 68(2-3), 133-139.
- Rao, K. V. R., & Rao, T. R., 2013. Molecular characterization and its antioxidant activity of a newly isolated *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 from mangrove soil. *Journal of Young Pharmacists*, 5(4), 121-126.
- Ratanachoo, K., Gascoyne, P. R., & Ruchirawat, M., 2002. Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1564(2), 449-458.
- Rather, S. A., Shah, A. M., Ali, S. A., Dar, R. A., Rah, B., Ali, A., & Hassan, Q. P., 2017. Isolation and characterization of *Streptomyces tauricus* from Thajiwas glacier—a new source of actinomycin-D. *Medicinal Chemistry Research*, 26(9), 1897-1902.
- Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., Suganthi, P., & Ramalakshmi, A., 2010. Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2(3), 94-99.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Riccioni, G., 2009. Carotenoids and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*, 11(6), 434-439.
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J., 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. In *Methods in enzymology* Academic Press. Vol. 234, pp. 279-293.
- Rosi, D., Drozd, M. L., Kuhrt, M. F., Terminiello, L., Came, P. E., & Daum, S. J., 1981. Mutants of *Streptomyces cattleya* producing N-acetyl and deshydroxy carbapenems related to thienamycin. *The Journal of antibiotics*, 34(3), 341-343.
- Rozman, C., & Montserrat, E., 1995. Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 333(16), 1052-1057.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... & Langley, E., 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146-167.
- Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S., & Bhutia, S. K., 2018. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 485-495.
- Saiga, A. I., Tanabe, S., & Nishimura, T., 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(12), 3661-3667.
- Saini, P., & Gangwar, M., 2017. Enzyme and free radical inhibitory potentials of ethyl acetate extract of endophytic actinomycete from *Syzygium cumini*. 207-213.
- Saini, P., Gangwar, M., & Kaur, A., 2015. In vitro studies on antidiabetic, antioxidant and phytochemical activities of endophytic actinomycete from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2(2), 180-188.
- Sajjad, W., Ahmad, S., Aziz, I., Azam, S. S., Hasan, F., & Shah, A. A., 2018. Antiproliferative, antioxidant and binding mechanism analysis of prodigiosin from newly isolated radio-resistant *Streptomyces* sp. strain WMA-LM31. *Molecular biology reports*, 45(6), 1787-1798.
- Saleh, A. M., et al., 2013. "Bioprospecting of *Streptomyces* sp. MECO2 from Stones of an Ancient Egyptian Tomb with Promising Antitrichophyton Activity under Optimized Cultivation Conditions." *World Applied Sciences Journal* 24.9: 1130-1140.
- Salih, A. M., Smith, D. M., Price, J. F., & Dawson, L. E., 1987. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Science*, 66(9), 1483-1488.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Salvesen, G. S., & Riedl, S. J., 2008. Caspase mechanisms. In Programmed cell death in cancer progression and therapy (pp. 13-23). Springer, Dordrecht.
- Sanacora, S., Urdinez, J., Chang, T. P., & Vancurova, I., 2015. Anticancer drug bortezomib increases interleukin-8 expression in human monocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(2), 375-379.
- Sanjivkumar, M., Babu, D. R., Suganya, A. M., Silambarasan, T., Balagurunathan, R., & Immanuel, G., 2016. Investigation on pharmacological activities of secondary metabolite extracted from a mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3). *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 6, 82-90.
- Saraswathi, K., Sabitha Rani, A. M., Sindhu, S., & Arumugam, P., 2015. Isolation, characterization of bioinspired secondary metabolites producing actinomycetes from marine soil samples. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 4, 107-119.
- Sarikurkcü, C., Zengin, G., Aktümsek, A., Ceylan, O., & Şanda, M. A., 2015. *Onopordum anatolicum* tohumlarının antioksidan aktiviteleri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 41(41), 89-96.
- Saurav, K., & Kannabiran, K., 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2, 4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces VITSVK5* spp. *Saudi journal of biological sciences*, 19(1), 81-86.
- Savi, D. C., Haminiuk, C. W. I., Sora, G. T. S., Adamoski, D. M., Kenski, J., Winnischofer, S. M. B., & Glienke, C., 2015. Antitumor, antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolites extracted by endophytic actinomycetes isolated from *vochysia divergens*. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 5(1).
- Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S. A., 1944. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66-69.
- Seddon, J. M., Ajani, U. A., Sperduto, R. D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T. C., ... & Yannuzzi, L. A., 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *Jama*, 272(18), 1413-1420.
- Seesuriyachan, P., Kawee-ai, A., & Chaiyaso, T., 2017. Green and chemical-free process of enzymatic xylooligosaccharide production from corncob: enhancement of the yields using a strategy of lignocellulosic destructuration by ultra-high pressure pretreatment. *Bioresource technology*, 241, 537-544.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Selim, M. S., Amer, S. K., Mohamed, S. S., Mounier, M. M., & Rifaat, H. M., 2018. Production and characterisation of exopolysaccharide from *Streptomyces carpaticus* isolated from marine sediments in Egypt and its effect on breast and colon cell lines. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 23-28.
- Selvin, J., Joseph, S., Asha, K. R. T., Manjusha, W. A., Sangeetha, V. S., Jayaseema, D. M., ... & Denslin Vinitha, A. J., 2004. Antibacterial potential of antagonistic *Streptomyces* sp. isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. *FEMS microbiology ecology*, 50(2), 117-122.
- Sen, M., Bayburt, C., Aydın, S., Onder, N. I., Incesu, Z., Atli, B., & Yamac, M., 2011. Düz kır Mağarasından (Aladağlar) Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Biyolojik Aktiviteleri. 5. Ulusal Speleoloji sempozyumu.
- Seok, JK, Kwak, JY, Choi, GW, An, SM, Kwak, JH, Seo, HH, ... & Boo, YC, 2016. İnsan cildi için doğal bir UV koruyucu olarak *Scutellaria radix* özü. *Fitoterapi Araştırması*, 30 (3), 374-379.
- Ser, H. L., Palanisamy, U. D., Yin, W. F., Chan, K. G., Goh, B. H., & Lee, L. H., 2016. *Streptomyces malaysiense* sp. nov.: a novel Malaysian mangrove soil actinobacterium with antioxidative activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Ser, H. L., Yin, W. F., Chan, K. G., Khan, T. M., Goh, B. H., & Lee, L. H., 2018. Antioxidant and cytotoxic potentials of *Streptomyces gilvigriseus* MUSC 26T isolated from mangrove soil in Malaysia. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 1(1).
- Shahidi, F., & Zhong, Y., 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical society reviews*, 39(11), 4067-4079.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Food/nahrung*, 44(3), 158-163.
- Shakeri, R., Kheirollahi, A., & Davoodi, J., 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*, 135, 111-125.
- Shanmugasundaram, T., Radhakrishnan, M., Gopikrishnan, V., Pazhanimurugan, R., & Balagurunathan, R., 2013. A study of the bactericidal, anti-biofouling, cytotoxic and antioxidant properties of actinobacterially synthesised silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 680-687.
- Sharma, D., Kaur, T., Chadha, B. S., & Manhas, R. K., 2011. Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(6), 801-808.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shimoni, E., Armon, R., & Neeman, I., 1994. Antioxidant properties of deferoxamine. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(6), 641-644.
- Shingala, M. C., & Rajyaguru, A., 2015. Comparison of post hoc tests for unequal variance. *International Journal of New Technologies in Science and Engineering*, 2(5), 22-33.
- Shiple, P. R., Donnelly, C. C., Le, C. H., Bernauer, A. D., & Klegeris, A., 2009. Antitumor activity of asukamycin, a secondary metabolite from the actinomycete bacterium *Streptomyces nodosus* subspecies *asukaensis*. *International journal of molecular medicine*, 24(5), 711-715.
- Shirling and Gottlieb., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 16(3), 313-340.
- Shivale, N., Marar, T., Samant, M., & Harmalkar, M., 2018. Screening of Antioxidant Activity of marine bacteria isolated from marine soil obtained from North-West coastal region of India. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 7(3).
- Shon, M. Y., Kim, T. H., & Sung, N. J., 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food chemistry*, 82(4), 593-597.
- Simonson, C. S., Kokjohn, T. A., & Miller, R. V., 1990. Inducible UV repair potential of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology*, 136(7), 1241-1249.
- Singh, L. S., Baruah, I., & Bora, T. C., 2006. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology*, 5(2), 217-221.
- Singh, M. P., & Greenstein, M., 2000. Antibacterial leads from microbial natural products discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 3(2), 167-176.
- V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144–158.
- Sinha, S., & Saxena, R., 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62(8), 1340-1350.
- Sivarajan, A., Shanmugasundaram, T., Sangeetha, M., Radhakrishnan, M., & Balagurunathan, R., 2019. Screening, production, and characterization of biologically active secondary metabolite (s) from marine *Streptomyces* sp. PA9 for antimicrobial, antioxidant, and mosquito larvicidal activity.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., & Neer, E. J., 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences*, 24(5), 181-185.
- Soengas, M. S., Capodieci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., ... & Cordon-Cardó, C., 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409(6817), 207-211.
- Soga, M., Matsuzawa, A., & Ichijo, H., 2012. Oxidative stress-induced diseases via the ASK1 signaling pathway. *International journal of cell biology*, 2012.
- Solecka, J., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Jakubiec-Krzesniak, K., Ziemska, J., Kawęcki, R., ... & Wietrzyk, J., 2018. Cyclo (Pro-DOPA), a third identified bioactive metabolite produced by *Streptomyces* sp. 8812. *The Journal of antibiotics*, 71(8), 757-761.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., & Rajnisz, A., 2012. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sciences*, 7(3), 373-390.
- Souri, Z., Wierenga, A., van Weeghel, C., van Der Velden, P. A., Kroes, W. G., Luyten, G. P., ... & Jager, M. J., 2019. Loss of BAP1 Is Associated with Upregulation of the NFκB Pathway and Increased HLA Class I Expression in Uveal Melanoma. *Cancers*, 11(8), 1102.
- Sowndhararajan, K., & Kang, S. C., 2013. Evaluation of in vitro free radical scavenging potential of *Streptomyces* sp. AM-S1 culture filtrate. *Saudi journal of biological sciences*, 20(3), 227-233.
- Srinivasan, M., Keziah, S. M., Hemalatha, M., & Devi, C. S., 2017, November. Pigment from *Streptomyces bellus* MSA1 isolated from marine sediments. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, IOP Publishing. Vol. 263, No. 2, p. 022049.
- Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B., & Nikodinovic-Runic, J., 2012. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(5), 1217-1231.
- Stone, R. M., O'Donnell, M. R., & Sekeres, M. A., 2004. Acute myeloid leukemia. *ASH Education Program Book*, 2004(1), 98-117.
- Subathra, D. C., Amrita, K., Nitin, J., Jemimah, N. S., & Mohana, S. V., 2013. Screening of actinomycetes isolated from soil samples for antibacterial and antioxidant activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5(4), 483-489.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Subramanian, D., Kim, M. S., Kim, D. H., & Heo, M. S., 2017. Isolation, Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Marine Actinomycete, *Streptomyces Carpaticus* MK-01, against Fish Pathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.
- Sun, S. S., & Tang, R. C., 2011. Adsorption and UV protection properties of the extract from honeysuckle onto wool. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(8), 4217-4224.
- Supino, R., 1995. MTT deneyleri. In vitro toksisite test protokolleri (s. 137-149). Humana Press.
- Suzuki, K., Sato, T., Morioka, M., Nagai, K., Abe, K., Yamaguchi, H., ... & Susaki, K., 1991. Tetrazomine, a new antibiotic produced by an actinomycete strain. *The Journal of Antibiotics*, 44(5), 479-485.
- Şen, M., Bayburt, C., Aydın, S., Önder, N. İ., İncesu, Z., Atlı, B., ... & Şen, M., 2011. Düz kır mağarasından (aladağlar) elde edilen bakteri izolatlarının biyolojik aktiviteleri. 5. Ulusal Speleoloji Sempozyumu, 64.
- Tan, L. T. H., Chan, C. K., Chan, K. G., Pusparajah, P., Khan, T. M., Ser, H. L., ... & Goh, B. H., 2019. *Streptomyces* sp. MUM256: A source for apoptosis inducing and cell cycle-arresting bioactive compounds against colon cancer cells. *Cancers*, 11(11), 1742.
- Tan, L. T. H., Chan, K. G., Khan, T. M., Bukhari, S. I., Saokaew, S., Duangjai, A., ... & Goh, B. H., 2017. *Streptomyces* sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. *Frontiers in pharmacology*, 8, 276.
- Tan, L. T. H., Chan, K. G., Pusparajah, P., Yin, W. F., Khan, T. M., Lee, L. H., & Goh, B. H., 2019. Mangrove derived *Streptomyces* sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticolon-cancer agents. *BMC microbiology*, 19(1), 38.
- Tan, L. T. H., Mahendra, C. K., Yow, Y. Y., Chan, K. G., Khan, T. M., Lee, L. H., & Goh, B. H., 2019. *Streptomyces* sp. MUM273b: A mangrove-derived potential source for antioxidant and UVB radiation protectants. *MicrobiologyOpen*, 8(10), e859.
- Tashiro, E., Hironiwa, N., Kitagawa, M., Futamura, Y., Suzuki, S. I., Nishio, M., & Imoto, M., 2007. Trierixin, a Novel Inhibitor of ER Stress-induced XBP1 Activation from *Streptomyces* sp. *The Journal of antibiotics*, 60(9), 547-553.
- Terleth, C., Van Sluis, C. A., & Van de Putte, P., 1989. Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 17(12), 4433-4439.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thenmozhi, M., & Kannabiran, K., 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 1(1), 51-57.
- Tian, S. Z., Pu, X., Luo, G., Zhao, L. X., Xu, L. H., Li, W. J., & Luo, Y., 2013. Isolation and characterization of new p-terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(12), 3006-3012.
- Tokur, B., Korkmaz, K., & Ayas, D., 2006. Comparison of Two Thiobarbituric Acid (TBA) Method for Monitoring Lipid Oxidation in Fish. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(3), 331-334.
- Tomatır, A. G., 2003. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(6), 499-508.
- Travasariou, A., Angelopoulou, M. T., Vougianniopoulou, K., Papadopoulou, A., Aligiannis, N., Cantrell, C. L., ... & Pratsinis, H., 2019. Bioactive metabolites of the stem bark of *Strychnos aff. darinensis* and evaluation of their antioxidant and UV protection activity in human skin cell cultures. *Cosmetics*, 6(1), 7.
- Tsai, S. Y., Tsai, H. L., & Mau, J. L., 2009. Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. *Journal of food biochemistry*, 33(3), 368-389.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, 26(2), 171-176.
- Tubaro, F., Micossi, E., & Ursini, F., 1996. The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(2), 173-179.
- Turkan, F., & Atalar, M. N., 2018. The effects of amoxicillin and vancomycin hydrochloride hydrate on glutathione S-transferase enzyme activity: an in vitro study. *Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(2), 141-148.
- Uyar, B. B., Gezmen-Karadağ, M., ŞANLIER, N., & Günyel, S., 2013. Toplumumuzda sıklıkla kullanılan bazı bitkilerin toplam fenolik madde miktarlarının saptanması. *Gıda*, 38(1), 23-29.
- Valipour, B., Mohammadi, S. M., Abedelahi, A., Maragheh, B. F. A., Naderali, E., Dehnad, A., & Charoudeh, H. N., 2018. Culture filtrate ether extracted metabolites from *Streptomyces levis* ABRIINW111 increased apoptosis and reduced proliferation in acute lymphoblastic leukemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 216-223.
- Velculescu, V. E., Madden, S. L., Zhang, L., Lash, A. E., Yu, J., Rago, C., ... & Cook, B. P., 1999. Analysis of human transcriptomes. *Nature genetics*, 23(4), 387-388.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Vijayakumar, R., Muthukumar, C., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., & Saravanamuthu, R., 2007. Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, 0712050027-0712050027.
- Wang, D., Wang, C., Gui, P., Liu, H., Khalaf, S. M., Elsayed, E. A., ... & Zhu, W., 2017. Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived *Streptomyces heliomycini*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1147.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Locke, S., 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. *FEBS letters*, 187(1), 33-37.
- Werdyani, S., Nastiti Wijayanti, A. F., & Rahmawati, S., 2017. Cytotoxic Effects Of Ethyl Acetate Fractions From Secondary Metabolites Of *Streptomyces* Sp. GMY01 On Human Breast Cancer MCF7 Cell Lines. ISSN- 0974-2441
- Wettasinghe, M., & Shahidi, F., 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food chemistry*, 67(4), 399-414.
- Wilbur, K. M., 1949. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Archs Biochem Biophys*, 24, 305-313.
- Williams, S.T. and Cross, T., 1971. *Actinomycetes*, *Meth. Microbiol.*, 4, 295-334.
- Williams, Y. N., Masuda, M., Sakurai-Yageta, M., Maruyama, T., Shibuya, M., & Murakami, Y., 2006. Cell adhesion and prostate tumor-suppressor activity of TSL2/IGSF4C, an immunoglobulin superfamily molecule homologous to TSLC1/IGSF4. *Oncogene*, 25(10), 1446.
- Wu, Y., Lu, C., Qian, X., Huang, Y., & Shen, Y., 2009. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants. *Current microbiology*, 59(4), 475-482.
- Wyllie, A. H., 1995. The genetic regulation of apoptosis. *Current opinion in genetics & development*, 5(1), 97-104.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, O. F., & Bilaloglu, V., 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argenta* Desf Ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5030–5034.
- Yoon, K. W., Cho, J. H., Lee, J. K., Kang, Y. H., Chae, J. S., Kim, Y. M., ... & Naik, U. P., 2009. CIB1 functions as a Ca²⁺-sensitive modulator of stress-induced signaling by targeting ASK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17389-17394.
- Zeb, A., & Ullah, F., 2016. A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2016.
- Zheng, L., Roeder, R. G., & Luo, Y., 2003. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*, 114(2), 255-266.
- Zhong, K., Gao, X. L., Xu, Z. J., Li, L. H., Chen, R. J., Deng, X. J., ... & Yamaguchi, I., 2011. Isolation and characterization of a novel *Streptomyces* strain Eri11 exhibiting antioxidant activity from the rhizosphere of *Rhizoma Curcumae Longae*. *Afr. J. Microbiol. Res*, 5, 1291-1297.
- Zhou, L. M., Kong, F. D., Xie, Q. Y., Ma, Q. Y., Hu, Z., Zhao, Y. X., & Luo, D. Q., 2019. *Divergolides T–W* with Apoptosis-Inducing Activity from the Mangrove-Derived Actinomycete *Streptomyces* sp. KFD18. *Marine drugs*, 17(4), 219.