T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİYETSEL TAKVİYE SPİRULİNA'NIN SİTOKROM P450 VE GST ARACILI POTANSİYEL İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE AYDINLATILMASI

Seda SAVRANOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **27/06/2013**

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

SEDA SAVRANOĞLU tarafından **YRD.DOÇ.DR. TUĞBA BOYUNEĞMEZ TÜMER** yönetiminde hazırlanan **"DİYETSEL TAKVİYE SPİRULİNA'NIN SİTOKROM P450 VE GST ARACILI POTANSİYEL İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE AYDINLATILMASI"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER

Danışman

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 27.06.2013

Doç. Dr. Zeki KARACA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi kısmi olarak TUBİTAK 111T582 ve ÇOMÜ-BAP 2012-024 no'lu projelerle desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Seda SAVRANOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, benden bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER'e, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüslediği için sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim sayın Prof.Dr. Alaattin ŞEN ve Prof.Dr. Bülent GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarımda laboratuvar cihazları ile ilgili konularda bana destek olan ve bilgilerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Pamukkale Üniversitesi Biyoloji bölümü öğretim üyeleri Prof.Dr. Alaattin ŞEN ve Yrd.Doç.Dr. Şevki ARSLAN'a;

Deney hayvanı çalışmalarında bilgilerini benimle paylaşan ve yardımcı olan hocalarım Doç.Dr. Sibel HAYRETDAĞ ve Araş.Gör.Dr. Mert GÜRKAN'a ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji bölümü lisans öğrencileri Ayça ÖZCAN, Hatice SÖYLEMEZ, Begüm KURT, Burak SERVİLİ, Kağan AĞAN, Kerem GÜNAY'a;

Bazı deney çalışmalarında bana yardımcı olan arkadaşlarım Pamukkale Üniversitesi Biyoloji bölümü yüksek lisans öğrencileri Gülsüm TERZİOĞLU, Pelin ATMACA' ya ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi yüksek lisans öğrencisi Kübra BOZ'a;

Tez dönemim süresince bana manevi destek veren çok sevgili arkadaşlarım Pelin CANLIGİL, Beste TEKBAŞARAN, Damla YÜCEL ve Hande İPEK'e;

Her konuda yardımını ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşım Uğur KULABAŞ' a;

teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Ayrıca, her zaman benden inancını ve desteğini esirgemeyen, tüm eğitim hayatım boyunca göstermiş oldukları maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili annem Şükran SAVRANOĞLU, babam Zeki SAVRANOĞLU ve ağabeyim Ali SAVRANOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi, saygılarımı ve sevgilerimi sunuyorum.

Seda SAVRANOĞLU

SİMGELER VE KISALTMALAR

CYP450	Sitokrom P450
KND	Kafein N-demetilaz
ANH	Anilin 4-hidroksilaz
END	Eritromisin N-demetilaz
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit disodyum tuzu
TCA	Trikloroasetik asit
NADP+	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat okside şekli
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat indirgenmiş şekli
BSA	Sığır Serum Albumin
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
GST	Glutatyon S-transferaz
ε-ACA	Epsilon aminokaproik asit
NBT	Nitroblue tetrazolium
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
p-AP	p-aminofenol
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
SDS	Sodyum dodesil sülfat
BHT	Bütilhidroksitolüen
DCNB	1,2-kloro-4-dinitrobenzen
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
GSH	Glutatyon indirgenmiş formu
TEMED	N’, N’, N’-tetrametil-etilen-diamin
BCIP	5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat
APS	Amonyum persülfat
PMS	Fenazin metosülfat
DEPC	Dietilpirokarbonat
G6PDH	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
KPi	Potasyum fosfat

KCI	Potasyum klorür
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
Na_2CO_3	Sodyum bikarbonat
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
Tween 20	Polioksietilen- sarbiton -monolaurat

ÖZET

DİYETSEL TAKVİYE SPİRULİNA'NIN SİTOKROM P450 VE GST ARACILI POTANSİYEL İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE AYDINLATILMASI

Seda SAVRANOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER

27/06/2013, 102

Spirulina doğal preparatı, bir çeşit fotosentetik mavi yeşil alg türü olan *Spirulina platensis* biyokütlesinden üretilen, zengin antioksidan özellikteki fitokimyasal ve besin içeriğinden dolayı halk arasında yaygın olarak tercih edilen bir üründür. Çalışmalar Spirulina'nın farklı hastalıkların tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı olarak kullanılmasına yönelik terapötik etkilerini ortaya koymuştur. Ancak, Spirulina'nın ilaç ve ksenobiyotiklerin büyük bir kısmının metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimleri üzerine olan etkileri henüz aydınlatılmamıştır. Bu çalışmanın amacı; Spirulina doğal preparatının, ksenobiyotik metabolizmasında önemli rolü bulunan başlıca sitokrom P450 ve GST izozimleri üzerine etkilerinin moleküler düzeyde aydınlatılmasıdır. Bu amaçla, su içerisinde çözülen Spirulina 35 gün süreyle günlük 200, 500, 1000 mg/kg dozlarında oral olarak sıçanlara verilmiştir. Uygulama sonucunda sıçan karaciğer dokularında karsinojenlerin aktivasyonunda rol alan CYP1A2 ve CYP2E1 izozimlerinin aktivite/ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. Bu azalışlar, mRNA için % 14 - % 30, protein seviyesi için % 19 - % 67, enzim aktiviteleri için % 22 - % 45 arasında değişmektedir ($p<0.05$). Spirulina uygulaması CYP3A1 izoziminin mRNA ve protein seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artırırken ($p<0.05$), enzim aktivitesinde çok küçük oranda anlamlı olmayan düşüşlere neden olmuştur. Gözlemlenen bu çift yönlü etki, Spirulina'nın içeriğindeki bazı aktif fitokimyasalların CYP3A1 enzimini inhibe ederek, mRNA ve protein indüksiyonu ile artan katalitik aktiviteyi kontrol grubuna benzer seviyelere çektiği ihtimalini düşündürmektedir. Bunlara ek olarak, Spirulina uygulaması sıçan karaciğer

dokusunda total GST aktivitesini 1. Doz grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artırırken (%33, $p<0.05$), GST Mu ve GST Pi izozimlerinin aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir. Elde edilen verilere göre, Spirulina' nın karsinojen aktivasyonunda rol alan CYP1A2 ve CYP2E1 enzimlerini inhibe etmesi, bu maddelerin karsinojenez, mutajenez ve toksisitelerinde potansiyel kemopreventif bir ajan olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda elde edilen bu veriler doğrultusunda, Spirulina'nın özellikle CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A1 tarafından metabolize edilen bazı klinik ilaçların farmakokinetiğinde potansiyel değişimler yaratabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Spirulina, sitokrom P450, GST, ksenobiyotik metabolizması, ilaç etkileşimi, kemopreventif etki

ABSTRACT

ELUCIDATION OF CYTOCHROME P450 AND GST MEDIATED POTENTIAL DRUG INTERACTIONS OF DIETARY SUPPLEMENT SPIRULINA AT THE MOLECULAR LEVEL

Seda SAVRANOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School

Biology Science Thesis, Master of Science

Advisor: Assist.Prof.Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER

27/06/2013, 102

Spirulina is a kind of photosynthetic blue green-algea having remarkable nutrient profile and antioxidant phytochemical constituents. Manufactured as dietary supplement, Spirulina has been widely used among people in the alternative and complementary therapies. Recent research studies demonstrated its therapeutic benefits towards a diverse array of disease conditions. However, the cytochrome P450s and GSTs mediated drug/chemical interaction potential of Spirulina has not been pursued yet. The aim of this study is to elucidate the effects of Spirulina on the main cytochrome P450 and GST isozymes. With this aim, Spirulina was given to the rats orally at doses of 200, 500, and 1000 mg/kg/bw daily for 35 consecutive days. Accordingly, the hepatic expression levels and enzymatic activities of CYP1A2 and CYP2E1 decreased significantly relative to controls. The decreases were changing between 14 to 30% for mRNA, 19 to 67% for protein levels and 22 to 45% for the enzyme activities ($p<0.05$). In terms of CYP3A1, while the Spirulina application resulted in significant increases at the protein and mRNA levels, these increases were not represented at the enzyme activities.This dual effect observed for CYP3A1 in SP treated rat liver i.e., induced mRNA/protein level, but the reduced/unchanged enzymatic activities suggest that enzyme inhibition caused by the constituents of SP may draw the catalytic activities to the values near to that of observed in controls. In case of GSTs, no remarkable effects on the activities of GST Mu and GST Pi isozyme were observed. In conclusion, the inhibitory effects of Spirulina on carcinogen activating CYP1A2 and CYP2E1 may indicate the potential of this compound as chemopreventive agent towards organ toxicities, mutagenesis and carcinogenesis induced by chemicals. Current data may also indicate that Spirulina has some potential to change

the pharmacokinetics of clinical drugs especially metabolized by CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A1.

Key words: Spirulina, cytochrome P450, GST, xenobiotic metabolism, drug interaction, chemoprevention.

İÇERİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU..... ii

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI…… iii

TEŞEKKÜR .....…….. iv

SİMGELER VE KISALTMALAR…….……..……. v

ÖZET …… vii

ABSTRACT ..…… ix

BÖLÜM 1 – GİRİŞ …….. 1

1.1.Spirulina Doğal Preparatının Besin İçeriği, Terapötik Özellikleri, Alternatif ve Destekleyici Tedavilerde Kullanımı……..... 2

1.2. Sitokrom P450 Enzim Ailesi……..... 6

1.2.1. Sitokrom P450 enzimlerinin sınıflandırılması ve adlandırılması…… 9

1.2.2. Ksenobiyotik metabolizmasında görev alan sitokrom P450 enzimleri……..…..……. 9

1.2.3. CYP1A2 izozimi……..... 12

1.2. 4. CYP2E1 izozimi…….….. 14

1.2.5. CYP3A4 izozimi……..... 16

1.3. Glutatyon S-Transferaz Enzimleri……. 18

1.4. Ksenobiyotik Metabolizmasında Görev Alan Enzimler ve Fitokimyasal Etkileşimleri…….. 22

1.5. Spirulina' nın Fitokimyasal Bileşenleri İle CYP450-GST Enzimlerinin Etkileşimi…….. 24

1.6. Spirulina -İlaç Etkileşimlerini Gösteren Klinik Vaka Raporları…… 25

1.7. Çalışmanın Amacı……..... 26

BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR …… 27

BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM……. 28

3.1. Materyal…… 28

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal madddeler…….... 28

3.1.2. Primerler ve antikorlar…….... 29

3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar……. 29

3.2. Yöntem…….. 29

3.2.1. Deney hayvanı çalışmaları……..…. 29

3.2.1.1.Spirulina doğal preparatının deney hayvanlarına uygulanması..... 29

3.2.1.2. Dokuların Temini……..... 31

3.2.2.Sıçan karaciğer dokularından sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların hazırlanması…….. 31

3.2.3. Sıçan karaciğer dokularından hazırlanan sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarı tayini……..... 32

3.2.4. Spirulina' nın sitokrom P450 bağımlı enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin saptanması…….... 32

3.2.4.1. Karaciğer mikrozomlarında kafein N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi ……. 32

3.2.4.2. Karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin belirlenmesi…….. 35

3.2.4.3.Karaciğer mikrozomlarında eritromisin N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi ……..……. 36

3.2.5. Spirulina'nın sitozolik glutatyon S-transferaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerinin saptanması…….…... 38

3.2.5.1. Karaciğer sitozollerinde total glutatyon S-transferaz aktivitesinin belirlenmesi……..…… 38

3.2.5.2. Karaciğer sitozollerinde glutatyon S-transferaz Mu aktivitesinin belirlenmesi……..…… 40

3.2.5.3. Karaciğer sitozollerinde glutatyon S-transferaz Pi aktivitesinin belirlenmesi…..……..... 40
3.2.6. Spirulina' nın sitokrom P450 izozimlerinin protein düzeyinde ekspresyonları üzerine etkilerinin saptanması…… 41
3.2.7. Spirulina' nın sitokrom P450 izozimlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonları üzerine etkilerinin saptanması……..... 45
3.2.7.1. Sıçan karaciğer dokularından total RNA izolasyonu…… 45
3.2.7.2. RNA konsantrasyonunun belirlenmesi……... 45
3.2.7.3. cDNA sentezi……..……... 46
3.2.7.4. Yarı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu…….…… 46
3.2.8. İstatistiksel analizler…….… 48
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA…….. 50
4.1. Araştırma Bulguları……. 50
4.1.1. Deney hayvanı çalışmaları……..... 50
4.1.2. Deneklerin su ve yem tüketimleri……... 51
4.1.3. Karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal ve sitozolik fraksiyonların protein değerleri…… 54
4.1.4. Spirulina'nın sitokrom P450 bağımlı enzim aktiviteleri üzerine etkileri..…… 56
4.1.4.1. Spirulina' nın kafein N-demetilaz (KND) aktivitesi üzerine etkileri…….……..... 56
4.1.4.2. Spirulina' nın anilin 4-hidroksilaz (ANH) aktivitesi üzerine etkileri…….…….. 58
4.1.4.3. Spirulina' nın eritromisin N-demetilaz (END) aktivitesi üzerine etkileri…….…….. 60
4.1.5. Spirulina' nın GST enzim aktiviteleri üzerine etkileri……..... 62
4.1.5.1. Spirulina' nın total GST aktivitesi üzerine etkileri……..... 62

4.1.5.2. Spirulina' nın GST Mu aktivitesi üzerine etkileri……..….. 64

4.1.5.3. Spirulina' nın GST Pi aktivitesi üzerine etkileri……..……. 66

4.1.6. Spirulina' nın sitokrom P450 izozimlerinin protein düzeyinde ekspresyonları üzerine etkileri…….. 68

4.1.6.1. Spirulina'nın CYP1A2 izoziminin protein düzeyinde ekspresyonu üzerine etkileri……..... 68

4.1.6.2. Spirulina'nın CYP2E1 izoziminin protein düzeyinde ekspresyonu üzerine etkileri…… 70

4.1.6.3. Spirulina'nın CYP3A1 izoziminin protein düzeyinde ekspresyonu üzerine etkileri…… 71

4.1.7. Spirulina' nın mRNA seviyesinde sitokrom P450 izozimlerinin ekspresyonları üzerine etkileri…….. 72

4.1.7.1. Spirulina'nın mRNA seviyesinde CYP1A2 izoziminin ekspresyonu üzerine etkileri……..... 72

4.1.7.2. Spirulina'nın mRNA seviyesinde CYP2E1 izoziminin ekspresyonu üzerine etkileri……..... 74

4.1.7.3. Spirulina'nın mRNA seviyesinde CYP3A1 izoziminin ekspresyonu üzerine etkileri……..... 75

4.2. Tartışma…… 77

BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER…….. 86

KAYNAKLAR..... 87

Çizelgeler..... I

Şekiller…….. III

Özgeçmiş……..……. VI

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Günümüzde içeriğinde pek çok aktif fitokimyasal bulunan doğal kaynaklı bitkisel preparatlar -Ginkgo biloba, St. John otu, Ginseng, Ekinezya, Kava-, dünyanın birçok yerinde alternatif ya da tamamlayıcı tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ernst, 2002). Bunlardan biri olan Spirulina doğal preparatı, bir çeşit fotosentetik mavi-yeşil alg türüne ait *Spirulina platensis* biyokütlesinden ticari olarak üretilmekte ve toz, tablet, kapsül formlarındaki preparatları reçetesiz olarak geniş bir kitleye ulaşmaktadır. Alternatif, tamamlayıcı ve destekleyici tedavi amaçlı tercih edilen bu diyet takviyesi, besin değerinin son derece yüksek olmasının yanı sıra, içeriğinde antioksidan özellikli çok sayıda farklı fitokimyasalın olması nedeniyle de oldukça önemli bulunmaktadır. Tüm dünyada ilgi gören ve farklı tedavilerde kullanılan Spirulina diyet takviyesinin antilipidemik, antidiyabetik, antiviral, antihistaminik ve antikarsinojenik özellikleri yapılan birçok klinik araştırmayla ortaya koyulmuştur (Karkos ve ark., 2011). Ayrıca deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarla da; Spirulina' nın, günlük hayatta maruz kalınan kimyasalların ya da terapötik amaçlı kullanılan bazı ilaçların neden olduğu doku harabiyetlerinde iyileştirici ve koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Belay, 2002).

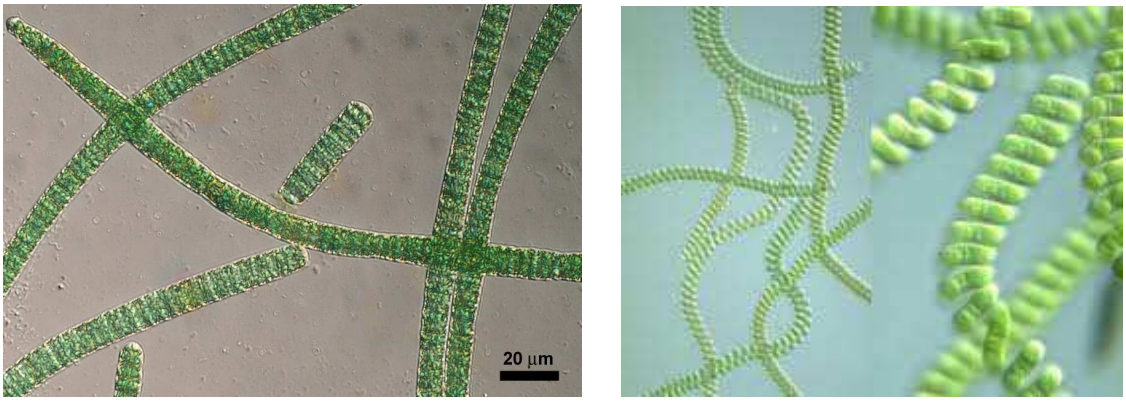
Son zamanlarda, yaygın şekilde kullanılan doğal kaynaklı bu ürünlerin içeriğinde bulunan fitokimyasalların, ksenobiyotiklerin (ilaç, çevresel kirleticiler vb.) Faz I ve Faz II metabolizmasında rol alan sitokrom P450 (CYP450) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimlerinin ekspresyonlarında değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Ioannides, 2002; Moon ve ark., 2006). Bu etki iki şekilde olabilmektedir: Doğal kaynaklı preparatların içeriğindeki fitokimyasallar, pek çok ilacın ve günlük hayatta maruz kaldığımız binlerce farklı kimyasalın metabolizmasını etkileyerek antioksidatif, antikarsinojenik ve antimutajenik etkiler oluşturabilir ya da düşük-yüksek ilaç cevabı, ilaç toksisitesi, ters ilaç etkileşimleri gibi beklenmedik toksikolojik ve farmakolojik etkiler oluşturabilirler. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan Spirulina doğal preparatının içeriğindeki fitokimyasallar ile ksenobiyotikler arasındaki potansiyel etkileşimlerin bilinmesi halk sağlığı açısından son derece önemlidir.

Tez konusu kapsamında, geniş bir kitle tarafından tamamlayıcı ve alternatif tedavilerde yaygın olarak kullanılan Spirulina doğal preparatının, ksenobiyotiklerin Faz I metabolizmasının büyük bir kısmından sorumlu CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4 enzimlerinin aktivite/ekpresyon düzeyleri üzerine etkileri ilk kez ortaya konulmuştur. Buna

ek olarak, Spirulina'nın uzun süreli kullanımında Faz II enzimlerinden total GST, GST Mu ve GST Pi aktiviteleri üzerine olan etkileride çalışılmıştır.

1.1. Spirulina Doğal Preparatının Besin İçeriği, Terapötik Özellikleri, Alternatif ve Destekleyici Tedavilerde Kullanımı

Spirulina doğal preparatı, Şekil 1.1'de görüldüğü üzere, adını flamentli ve spiral yapısından alan, mavi yeşil algler sınıfına ait *Spirulina platensis* biyokütlesinden elde edilmekte ve farklı ticari formlarda (toz, tablet, kapsül) piyasada bulunmaktadır (Dillon ve ark., 1998).



Şekil 1.1. *Spirulina platensis* türünün mikroskobik görüntüsü (http://fisheriesexploration.blogspot.com, http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/27'den alınmıştır).

Son dönemlerde yaygın şekilde diyet takviyesi olarak kullanılan Spirulina' nın, 16. yy' dan beri gıda maddesi olarak Texcoco Gölü etrafında yaşayan Aztek uygarlığı tarafından kullanıldığı; Afrika ve Meksika'daki yerli halk tarafından tüketilen geleneksel gıdalar arasında yer aldığı; günümüzde ise, halen Çad gölü kıyısında yaşayan Kanembu kabilesi yerlileri tarafından besin maddesi olarak tüketildiği bilinmektedir (Ciferri ve Tiboni, 1985; Pinero Estrada ve ark., 2001).

Eski çağlardan beri besin olarak kullanılan bu doğal ürünün bilimsel çalışmalara konu olması ve ticari anlamda kültüre edilmesi, 1963 yılında Fransız Petrol Araştırma Enstitüsü tarafından gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, bu ürünün sahip olduğu zengin besin içeriğinden dolayı, NASA (National Aeronoutics and Space Administration) ve ESA (European Space Agency) tarafından uzun süreli uzay yolculuklarında esas yiyecek olarak kullanılmasıyla ilgili çalışmalar devam etmiştir (Karkos ve ark., 2011; Rossi ve ark., 2008). 2000'li yıllarda ise, Birleşmiş Milletler ve Dünya Tarım Örgütleri tarafından bu

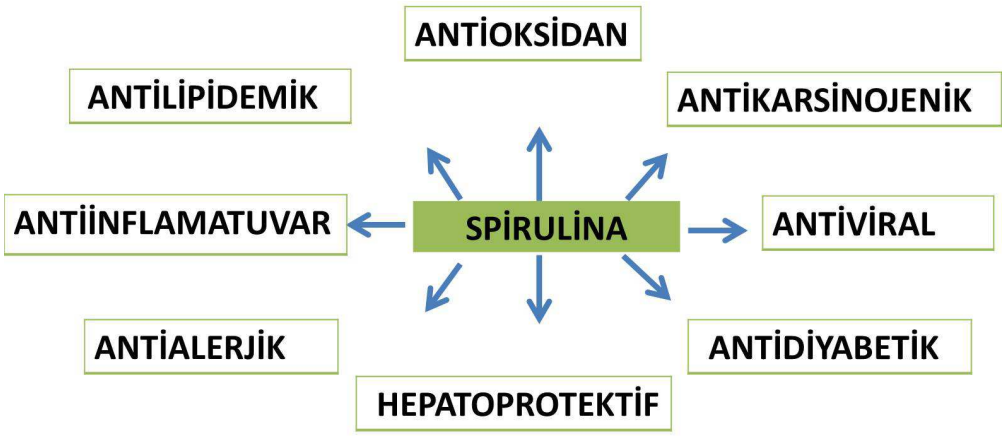
besinin hem çocuklar hem de yetişkinler için oldukça faydalı bir diyetsel takviye olduğu beyan edilmiştir (U.N. World Health Organization, 1993).

Spirulina doğal preparatının içeriğinin yaklaşık % 70' ini proteinlerin oluşturduğu ve tüm temel aminoasitleri içerdiği bilinmektedir. Ayrıca bu doğal ürün, vitaminler ve mineraller bakımından da son derece zengindir. İçeriğinde özellikle vitamin B12, vitamin A, vitamin B2, vitamin B3 gibi vitaminler ve demir, magnezyum, kalsiyum, potasyum gibi mineraller yoğun olarak bulunur. Spirulina'nın içeriğinde kuru ağırlığın yaklaşık % 20' sini oluşturan fikosiyaninin (mavi pigment) yanı sıra, klorofil (yeşil pigment), zeaksantin (sarı pigment), zantofiller (miksozantofil, zeazantin, kriptozantin, ekinenon), karotenler (α-karoten, β-karoten, euglenanon, lutein) gibi aktif fitokimyasallar da yüksek oranda bulunmaktadır (Khan ve ark., 2006; Mohan ve ark., 2006). Ayrıca, bu doğal ürünün yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asidi ve gamma linolenik asit içerdiği de bilinmektedir (Otleş ve Pire, 2001; http://www.cyanotech.com/spirulina/analysis.html).

Spirulina'nın içeriğinde yoğun olarak bulunan antioksidan özellikli fitokimyasallardan dolayı bu preparatın tıbbi amaçlı kullanılmasına yönelik çalışmalar artan bir ilgi ile devam etmektedir. Bu zamana kadar yapılan araştırmalarda, Spirulina' nın katarakt (Haque ve Gilani, 2005), serebral iskemi (Khan ve ark., 2005; Wang ve ark., 2005), vasküler reaktivite (Mascher ve ark., 2005) ve deneysel Parkinson modelinde (Chamorro ve ark., 2006) önleyici bir ajan olduğu gösterilmiştir. Bunların yanı sıra, oldukça önemli olarak Spirulina' nın antilipidemik, antioksidan, antidiyabetik, antiviral, antihistaminik ve antikarsinojenik özelliklerini ortaya koyan pek çok klinik çalışma mevcuttur (Karkos ve ark., 2011; Khan ve ark., 2005). Örneğin; Türkiye' de yapılan çift kör ve plasebo kontrollü bir klinik çalışmada, alerjik rinit tedavisindeki hastalara Spirulina takviyesi yapıldığında, hastalardaki bazı semptomların -burun akıntısı, hapşırma, burun tıkanıklığı ve kaşıntısı- iyileşmesinde plasebo grubundaki hastalara göre oldukça anlamlı ($p<0.001$) gelişmeler kaydedildiği görülmüştür (Cingi ve ark., 2008). Spirulina' nın bağışıklık sisteminde makrofajların sayısını artırarak bağışıklık fonksiyonlarını düzenleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (Khan ve ark., 2005). İskemik kalp hastalarında yapılan klinik bir çalışmada ise, Spirulina takviyesinin plazma kolesterol, trigliserit ve LDL seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşlere neden olduğu gösterilmiştir (Ramamoorthy ve Prekumari, 1996). Spirulina'nın antilipidemik ve antidiyabetik etkisini gösteren diğer bir klinik çalışmada ise, 15 Tip II diyabet hastasına 2 ay süreyle verilen Spirulina takviyesinin açlık kan şekeri seviyesini önemli ölçüde azalttığı; trigliserit, total kolesterol ve serbest yağ asidi seviyesini önemli ölçüde düşürerek lipit profilini düzenlediği gösterilmiştir (Mani ve ark., 2000). Başka bir çalışmada, Spirulina takviyesi

alan ağzında kanser öncesi lezyonlar bulunan tütün çiğneyici hastaların % 45'inde lezyonların bütünüyle gerilediği görülürken; plasebo alan grubun yalnızca % 3'ünde bu şekilde bir gerileme görülmüştür (Mathew ve ark., 1995).

Yukarıda bahsedilen klinik çalışmalara ek olarak son zamanlarda deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar da, Spirulina' nın içeriğindeki aktif fitokimyasalların, günlük hayatta maruz kalınan bazı toksik ve mutajenik kimyasallar ile ilaçların oluşturdukları doku hasarında iyileştirici ve koruyucu etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (İsmail ve ark., 2009; Khan ve ark., 2005; Lu ve ark., 2010; Viswanadha ve ark., 2011). Örneğin, *in vivo* olarak yapılan bir çalışmada, Spirulina'nın gram negatif bakteri enfeksiyonlarında kullanılan, bir çeşit antibiyotik olan gentamisin sülfat'ın neden olduğu nefrotoksisitede lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzimlerden SOD ve GPx seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (Karadeniz ve ark., 2008). Yine, *in vivo* olarak yapılan bir diğer çalışmada, 4-nitroquinoline-1-oksit ile hepatotoksisite oluşturulan sıçanlarda, Spirulina'nın GST, CAT, GPx gibi antioksidan enzimlerin seviyesini artırdığı gösterilmiştir (Viswanadha ve ark., 2011). Spirulina' nın yapılan tüm bu araştırmalarla ortaya koyulan terapötik özellikleri Şekil 1.2' de genel olarak şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. Spirulina'nın terapötik özellikleri.

Bahsedilen tüm bu iyileştirici ve koruyucu etkilerinden dolayı Spirulina doğal preparatı, son dönemlerde adını sıklıkla duyduğumuz, oldukça popüler ve halk arasında yaygın kullanımı olan bir üründür. Ticari olarak Dünya'nın birçok yerinde üretilen Spirulina Şekil 1.3' de görüldüğü üzere, 'Doğal kaynaklı besin takviyesi' adı altında farklı ticari formlarda piyasada bulunmakta ve reçetesiz olarak satılmaktadır.



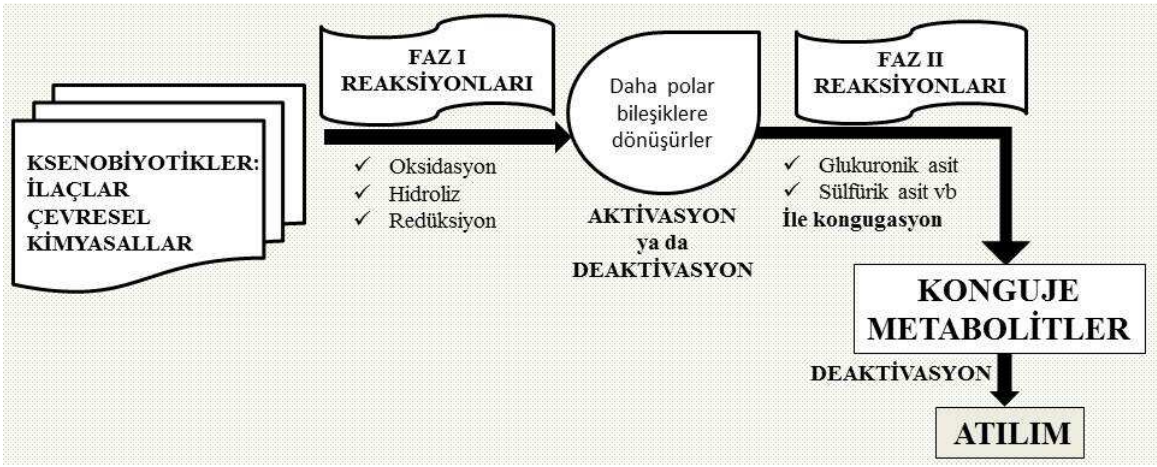
Şekil 1.3. Piyasada toz kapsül ve tablet halinde bulunan Spirulina doğal preparatları (http://www.alibaba.com/product).

Yalnızca *Spirulina platensis* biyokütlesi içeren bu preparatların tamamen doğal olması nedeniyle yüksek dozlarda (günde 10-20 tablete çıkan) kullanılması önerilmektedir. Yukarıda da detaylı bir şekilde özetlendiği gibi, literatür çalışmalarının büyük bir kısmı, Spirulina'nın rutin ilaç alan hastalarda tedaviyi destekleyici ve tamamlayıcı olarak, ilaç kullanımına bağlı doku hasarlarında ise, koruyucu ve iyileştirici olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Tez çalışması kapsamında ileri sürülen hipotez, Spirulina' nın içeriğinde bulunan çok sayıda aktif fitokimyasalın, ilaç metabolizmasında önemli role sahip sitokrom P450 ve GST izozimlerinin aktivite/ekspresyon düzeylerini değiştirebileceği; böylece eş zamanlı alınan ilaçlar açısından farmakolojik ve günlük hayatta maruz kalınan kimyasallar açısından toksikolojik sonuçlar doğurabileceğidir. Literatürde bu hipotezi destekleyen çok sayıda Spirulina ilaç etkileşimi vakası söz konusudur, bunlara bölüm 1.6' da ayrıntılı olarak değinilecektir. Literatürde Spirulina'nın total sitokrom P450 seviyesini anlamlı derecede düşürdüğünü gösteren bir çalışma bulunmakla beraber (Mittal ve ark., 1999), sitokrom P450 izozimleri üzerine etkilerini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Total olarak bakılan sitokrom P450 seviyesi, farklı substrat özgüllüklerine sahip, farklı ksenobiyotik-ilaç gruplarının metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 izozimlerinin seviyelerinin bireysel değişimi ile ilgili bilgi veremez. Aynı şekilde literatürde Spirulina'nın, total GST aktivitesi üzerine etkilerini gösteren birkaç çalışma bulunurken (Mittal ve ark., 1999; Premkumar ve ark., 2004; Visvanadha ve ark., 2011), birçok farklı ksenobiyotiğin detoksifikasyonundan sorumlu GST izozimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Bu nedenle literatürde, ksenobiyotik metabolizmasının çok büyük bir kısmından sorumlu sitokrom

P450 ve GST enzimleri kaynaklı olası Spirulina-ilaç-ksenobiyotik etkileşimine dair, dolayısıyla bu preparatın güvenli kullanımıyla ile ilgili son derece önemli bir eksik bulunmaktadır.

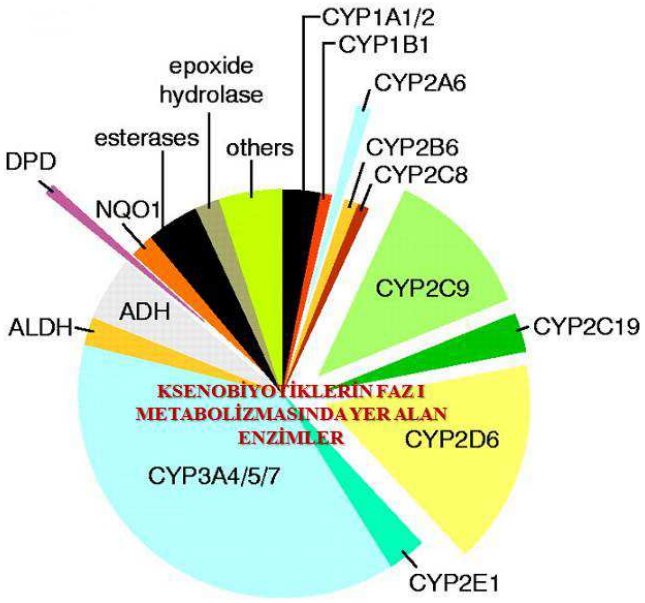
1.2. Sitokrom P450 Enzim Ailesi

Bilindiği üzere ilaçlar dahil vücuda giren her çeşit yabancı kimyasal (ksenobiyotikler), Faz I ve Faz II enzimleri ile metabolitlerine çevirilerek vücuttan atılır. Vücuda alınan ve çoğunluğu hidrofobik yapıdaki ksenobiyotikler karaciğerde önce Faz I enzimleri tarafından katalizlenen redüksiyon, oksidasyon ve hidroliz reaksiyonları sonucunda kısmen daha suda çözünür metabolitlere dönüştürülürler. Faz I reaksiyonları, substratın doğasına göre kimi zaman aktivasyon kimi zaman deaktivasyonla sonuçlanır. Şekil 1.4'de görüldüğü gibi bu metabolitlerin bir kısmı bundan sonra, Faz II enzimleri olarak adlandırılan konjugasyon enzimleri tarafından daha da hidrofilik yapıda olan sülfat, glukuronik asit gibi konjugatlarına çevrilirler. Faz II reaksiyonları çoğunlukla deaktivasyonla sonlanır ve oluşan metabolit vücuttan atılır (Buhler ve Williams, 1989).



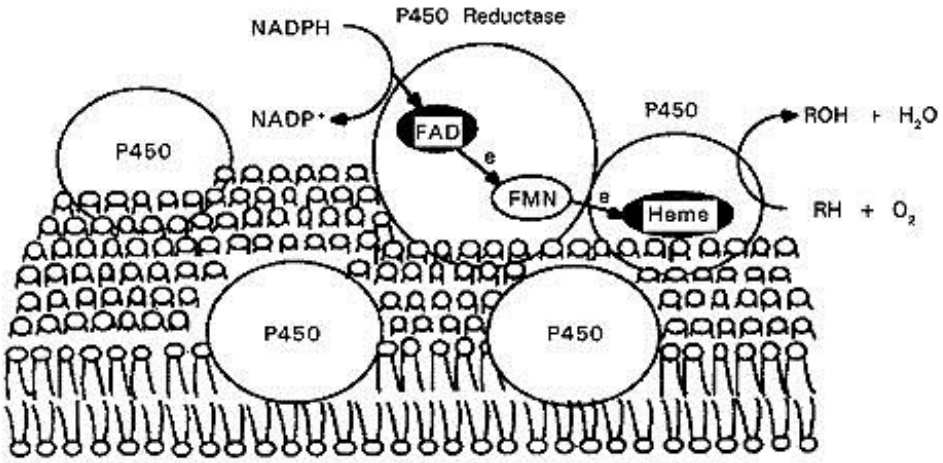
Şekil 1.4. Ksenobiyotiklerin Faz I ve Faz II metabolizması.

Şekil 1.5' deki grafikte görüldüğü gibi, piyasadaki klinik amaçlı kullanılan ilaçların yaklaşık % 80'inin, çevresel kirleticiler ile diyetsel bileşiklerin büyük bir kısmının Faz I metabolizmasından sitokrom P450 enzimleri sorumludur (Arınç, 2010). Bu enzimler mikrozomal bir sistem olan sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz sisteminin [E.C.1.14.14.1] terminal enzimleridir (NADPH bağımlı sitokrom P450 karışık fonksiyonlu oksidazlar olarak da bilinirler), (Lu ve Coon, 1968).



Şekil 1.5. CYP izozimlerinin ksenobiyotiklerin Faz I metabolizmasında dağılımları (Evans ve Relling, 1999).

Endoplazmik retikulumun fosfolipit tabakasına gömülü olarak bulunan sitokrom P450 monooksijenaz enzim sisteminin, sitokrom P450, NADPH bağımlı sitokrom P450 redüktaz ve lipit (fosfolipit) olmak üzere üç komponenti bulunur (Neve ve Ingelman, 2010). Sitokrom P450 monooksijenaz enzim siteminin endoplazmik retikulumdaki lokalizasyonu Şekil 1.6' da verilmiştir.



Şekil 1.6. Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sisteminin endoplazmik retikulumdaki lokalizasyonu (Ohkawa ve ark., 1988' den alınmıştır).

Mikrozomal sitokrom P450 enzim sisteminin monooksijenaz aktivitesi, NADPH'ten gelen elektronların sistem içerisindeki akışı ve moleküler oksijenin indirgenmesi ile gerçekleşir. Reaksiyon sırasında moleküler oksijenin biri substratın moleküler yapısına eklenirken, diğeri de suya indirgenir (Şekil 1.7), (Estabrook ve ark., 1968). Bu nedenle, genellikle sitokrom P450 tarafından katalizlenen reaksiyonlar monooksijenasyon reaksiyonu olarak olarak isimlendirilir.

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow R\text{-}OH + NADP^+ + H_2O$$

Şekil 1.7. Sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenazların katalizlediği genel reaksiyon.

Sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz sisteminin komponentlerinden NADPH bağımlı sitokrom P450 redüktaz, yapısında FAD-FMN flavoproteinlerini içeren ve elektronların NADPH'ten sitokrom P450 enzimlerine transferini sağlayan tek cins bir enzimdir (Iyanagi ve Mason, 1973, Iyanagi ve ark.,1974). Sitokrom P450 enzimleri ise, farklı ve çok çeşitli substrat özgüllüklerine sahip bir enzim süper ailesidir. Bu enzimler; çevresel kirleticiler, kimyasallar, ilaçlar, antioksidanlar, organik çözücüler, anestezik ajanlar, boyalar gibi ekzojen bileşiklerin metabolizmasında rol almalarının yanı sıra, steroid hormonlar, yağ asitleri, kolestrol, safra asidi, prostoglandinler, biojenik aminler, retinoidler gibi endojen kaynaklı bileşiklerin de oksidatif, redüktatif ve peroksidatif metabolizmasından da sorumludur (Gonzalez, 1989; Guengerich, 1992; Waterman, 1996). Organizmada endojen ve ekzojen kaynaklı bileşiklerin metabolizmasında ve çeşitli fizyolojik işlevlerinde çok önemli role sahip sitokrom P450 enzimleri arkelerden, funguslara mayalara; bitkilerden hayvanlara kadar yaşamın tüm formlarında bulunmaktadır (Cardini ve Jurtshuk, 1967; Ferris ve ark., 1973; Klingenberg, 1958; Lindenmayer ve Smith, 1964; Murphy ve West, 1969; Wright ve ark., 1996;). Memelilerde en fazla karaciğerde ekpres edilen bu enzimler böbrek, akciğer, ince bağırsak, deri, beyin, pankreas, kemik iliği, ovaryum, testis gibi ekstrahepatik dokularda da bulunmakta ve ekspresyon düzeyleri dokudan dokuya farklılık göstermektedir (Krishna ve Klotz, 1994; Wrighton ve Stevens, 1992). Farklı organizmaların farklı dokularında bulunan, değişik substrat özgüllüklerine sahip bu karmaşık enzim ailesi, birtakım kurallar çerçevesinde adlandırılarak sınıflandırılmayı gerektirmiştir.

1.2.1. Sitokrom P450 enzimlerinin sınıflandırılması ve adlandırılması

Bahsedildiği üzere birçok farklı dokuda bulunan sitokrom P450 enzimleri, hücrede endoplazmik retikulumda lokalize olur. Endoplazmik retikulum membranlarından fraksiyonel santrifüjlemeyle yapay olarak elde edilen mikrozomlar, karbonmonoksit gazı ile suspense edilince sodyum dithionit gibi indirgeyici bir ajan varlığında indirgenerek 450 nm'de spesifik bir absorbans spektrumu verirler. Bu nedenle bu proteinlere sitokrom P450 adı verilmiştir (Klingenberg, 1958; Omura ve Sato, 1964). Önceki bölümde de bahsedildiği gibi sitokrom P450 enzimleri farklı substrat özgüllüklerine sahip bir süper enzim ailesidir. Bu süper aile altındaki sitokrom P450 izozimleri, aminoasit dizilimlerindeki benzerliklere göre, ailelere ve alt ailelere ayrılır. Aminoasit diziliminde, % 40'dan fazla benzerlik gösteren proteinler aynı aile altında toplanırken, % 55'den fazla benzerlik gösterenler ise aynı alt aile altında sınıflandırılır (Nebert ve Mc Kinnon, 1994; Nelson ve ark., 1996). Sitokrom P450 süper ailesi altında çok fazla izozimin bulunması sistematik bir adlandırma geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur (Nebert ve ark., 1987). Bu sistemde tek bir sitokrom P450 izoziminin adlandırılması sırasında ilk olarak, İngilizce CYtochrome P450 kelimesinin kısaltması olan CYP kullanılır. CYP simgesinden sonra gelen rakam ise, belli bir aileyi tanımlamaktadır (CYP1 ve CYP2 ailesi gibi). Aileyi tanımlayan rakamı takiben gelen büyük harf ise, alt aileyi belirtmektedir (CYP1 ailesi altında CYP1A ve CYP1B alt aileleri gibi). Aile ve alt aileyi takip eden rakam ise, spesifik CYP izozimlerini temsil eder (CYP1A alt ailesi altında CYP1A1 ve CYP1A2 izozimleri gibi). 20 Ağustos 2009 itibariyle toplam 11.294 sitokrom P450 izozimi (3282 hayvan, 4266 bitki, 927 bakteri 2570 ve 249 diğer ökaryotlar) tanımlanmıştır . İnsanda 18 tane sitokrom P450 ailesi ve bunların altında toplamda 59 CYP izozimi bulunmaktadır (http://drnelson.utmem.edu/ CytochromeP450.html). Bunlardan CYP5-51 ailelerinde bulunan izozimler endojen metabolizmasında özellikle de steroid hormonların biyosentezinde rol alırken, CYP1-3 aileleri ilaç moleküllerinin ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol alır (Evans ve Relling, 1999; Trafalis ve ark., 2010). Son grup günümüzde kullanılan klinik ilaçların ve günlük hayatta maruz kaldığımız binlerce farklı kimyasalın Faz I metabolizmasının % 80'inden sorumlu olduğu için toksikolojik ve farmakolojik açıdan oldukça önemlidir.

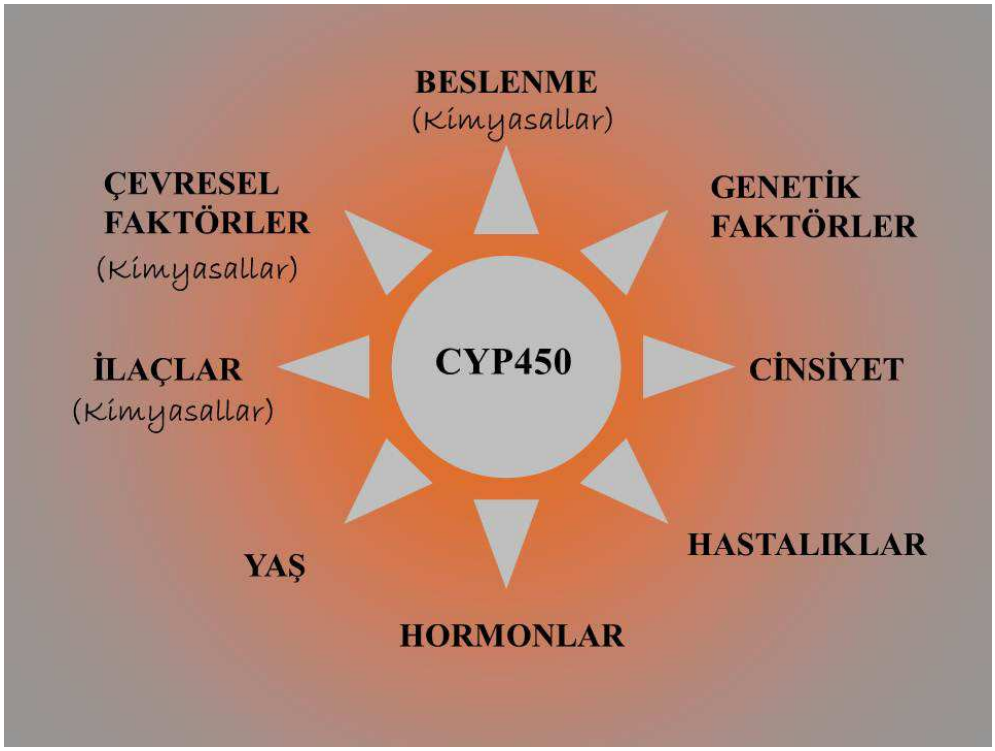
1.2.2. Ksenobiyotik metabolizmasında görev alan sitokrom P450 enzimleri

Sitokrom P450 enzimlerinden özellikle CYP1-3 ailelerinde bulunan izozimler, günlük hayatta çeşitli yollarla maruz kaldığımız klinik ilaçlar, bitkisel ve fungal kökenli gıdaların sekonder metabolitleri, çevresel kirleticiler, halojenli hidrokarbonlar, poliaromatik hidrokarbonlar, arilaminler, yanma bileşenleri, endüstriyel bileşikler,

herbisitler, pestisitler, antioksidanlar, organik çözücüler, anastezik ajanlar, boyalar gibi pek çok ekzojen bileşiğin Faz I metabolizmasında görev almaktadır (Gonzalez, 1989; Guengerich, 1992).

Genel olarak, CYP1-3 enzim aileleri, insanda karaciğer total sitokrom P450 içeriğinin % 70' ni oluşturur (Wrighton ve Stevens, 1992). Bu izozimlerden CYP2B, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 ilaç metabolizmasında aktif olarak görev alırken; CYP1A ailesi ve CYP2E1 izozimi, ksenobiyotik metabolizmasında görev almaktadır. Özellikle, CYP1A2 ve CYP2E1 prokarsinojen maddelerin metabolik aktivasyonundan sorumludur (Guengerich, 1977; Guengerich, 2005). Karsinojen metabolizmasında son derece aktif olan bu enzimler, prokarsinojenleri karsinojenlere dönüştürerek, DNA ve diğer makromoleküllere bağlanmasına yol açar. Bu durumun mutasyonlara ve kanser gibi biyolojik hasarlara sebebiyet verdiği bilinmektedir (Rendic ve Guengerich, 2012). Bunun en çarpıcı örneklerinden biri; sigara dumanı ve kirli şehir havasında yoğun olarak bulunan ve sanayide çözücü olarak yaygın bir şekilde kullanılan benzenin, CYP2E1 izozimi tarafından biyoaktivasyonu sonucu oluşan toksik ve karsinojenik metabolitlerin kemik iliğinde toksisiteye neden olmasıdır (Bernauer ve ark., 1999). Bunun yanı sıra, özellikle çevre kirliliğinin artmasına neden olan ve günlük hayatta sıkça maruz kaldığımız poliaromatik hidrokarbonların (PAH), sitokrom P450 enzimleriyle oksidasyonu sonucu oluşan reaktif ve karsinojenik metabolitlerin karsinojenez oluşumuna öncülük ettiği de bilinmektedir (Jerina ve ark., 1970; Selkirk ve ark., 1971; Sen ve ark., 2010).

Şekil 1.8'de gösterildiği gibi genetik yapı (polimorfizmler), çevresel faktörler, hastalıklar, yaş ve fizyopatolojik şartlar (diyabet, uzun süreli açlık gibi), sitokrom P450 enzimlerinin aktivite ve ekspresyon düzeylerini etkilemektedir (Lewis, 2003; Lin ve Lu, 2001). Bu da gerek farmakolojik, gerekse toksikolojik açıdan önemli sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin, bireyler arasında var olan genetik farklılıklar, ilaç metabolizmasında bireyin ilaca olan yanıtını değiştirebilir; bu kimi zaman hayati boyutta zıt ilaç reaksiyonlarının gelişmesine neden olabilmektedir (Guengerich, 2006). Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalar bu enzimlerin bireyler arasındaki genetik farklılıkları (polimorfizm kaynaklı) lösemi, akciğer ve göğüs kanseri gibi bazı kanser çeşitlerine yatkınlığı artırdığını göstermektedir (Le Marchand ve ark., 1998; Shields ve ark., 1996; Tümer ve ark., 2010; Wu ve ark., 1998).



Şekil 1.8. Sitokrom P450 enzimlerini ekspresyonlarını etkileyen bazı faktörler.

Bazı sitokrom P450'lerin seviyeleri ve aktiviteleri çeşitli kimyasallara maruz kalma neticesinde de artma veya azalma gösterebilir (Conney ve ark., 1956). Sitokrom P450'lerin substratı olan pek çok endojen ve ekzojen maddenin aynı zamanda enzimin yarışmalı, yarışmasız ve geri dönüşümsüz inhibitörü, indükleyicisi veya baskılayıcısı oldukları durumlar da söz konusudur. Mesela, bir substratın biyotransformasyonundaki etkinin azalması ya da artması, başka bir substratın enzimin aktivitesinde yarattığı değişikliğe göre farklılık gösterir. Bu etki enzimin iki substrata karşı olan afinitesi ile ilgilidir (Coleman, 2005; Estabrook, 2003). Örneğin; bir çeşit antihistaminik olan terfenadin, CYP3A4 tarafından metabolize edilir. Aynı şekilde CYP3A4 tarafından metabolize edilen ketokonazol veya eritromisin gibi ilaçların enzimi inhibe etmesi sonucu terfenadin plazmada ve kalp dokusunda birikerek toksisitesiye neden olur (Rau ve ark., 1997). Verilen örnekten de anlaşıldığı üzere, aynı enzimin farklı substratlarının eş zamanlı olarak vücuda alınması, enzimlerin aktivitelerini değiştirerek beklenmedik etkilerin görülmesine neden olmaktadır.

İlaç ve ksenobiyotiklere benzer şekilde, Ginkgo -*Gingko biloba*-, Sarımsak-*Allium sativum*, St. John otu -*Hypericum perforatum*-, gibi bitkilerin içerisinde bulunan bazı aktif kimyasallarında, sitokrom P450 enzimlerinin aktivite ve ekspresyon düzeylerini değiştirdikleri bilinmektedir (Bailey ve ark., 1991; Markowitz ve ark., 2000; Piscitelli ve

ark., 2002; Rowin ve Lewis, 1996). Fitokimyasallar olarak da bilinen bu bitkisel kökenli kimyasalların, hepatik ve ekstra hepatik sitokrom P450 aktivitelerini/ekspresyonlarını değiştirerek önemli ilaç-diyet etkileşimlerine neden olduğu ortaya koyulmuştur (Guengerich, 1984; Parke ve Ioannides, 1994; Ioannides, 1999). Buna örnek olabilecek pek çok etkileşim bilinmektedir. Örneğin; greyfurt suyunun içerisinde bulunan fitokimyasallardan dihidroksibergamotin ve naringenin, incebağırsakta pek çok ilacın (kolestrol düşürücü statinler, kalsiyum kanal antagonistleri gibi) presistemik metabolizmasından sorumlu CYP3A4 enziminin katalitik aktivitesini inhibe eder ve sentezini baskılar. Bunun sonucunda, ilaç molekülü metabolize olamadığından sistemik dolaşıma geçen aktif ilaç konsantrasyonu, hedeflenen plazma seviyesinin üzerine çıkar ve aşırı dozla ilişkili toksik yan etkilerin görülmesine neden olabilir (Bailey ve ark., 1991; Lown ve ark., 1997). Bu etkileşimlere verilecek bir başka örnek ise; St.John otunun, CYP3A4'ü güçlü şekilde indüklemesinden dolayı eş zamanlı olarak kullanılan siklosporinin hızlı bir şekilde metabolize olarak plazma konsantrasyonunun subterapötik seviyelere düşmesi ve bunu takiben hastada organ reddi vakasının görülmesidir (Ruschitzka ve ark., 2000).

Literatürde var olan daha pek çok örnekten dolayı, içeriğinde yoğun olarak aktif fitokimyasallar bulunan bitkisel preparatların, sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyon düzeylerinde yarattığı değişimlerin araştırılıp ortaya koyulması toksikolojik ve farmakolojik açıdan son derece önemlidir. Bu nedenle tez konusu kapsamında, halk arasında yaygın olarak kullanılan ve içeriğinde çok sayıda aktif fitokimyasal bulunan Spirulina'nın, birçok toksik ve karsinojenik kimyasalın ve çok sayıda ilacın metabolizmasında rol alan sitokrom P450 izozimlerinden CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4' ün aktivite ve ekspresyon (protein ve mRNA) düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bir sonraki bölümde bu CYP izozimlerinin önemi ve araştırılma nedenlerine ilişkin bilgiler daha ayrıntılı şekilde sunulmuştur.

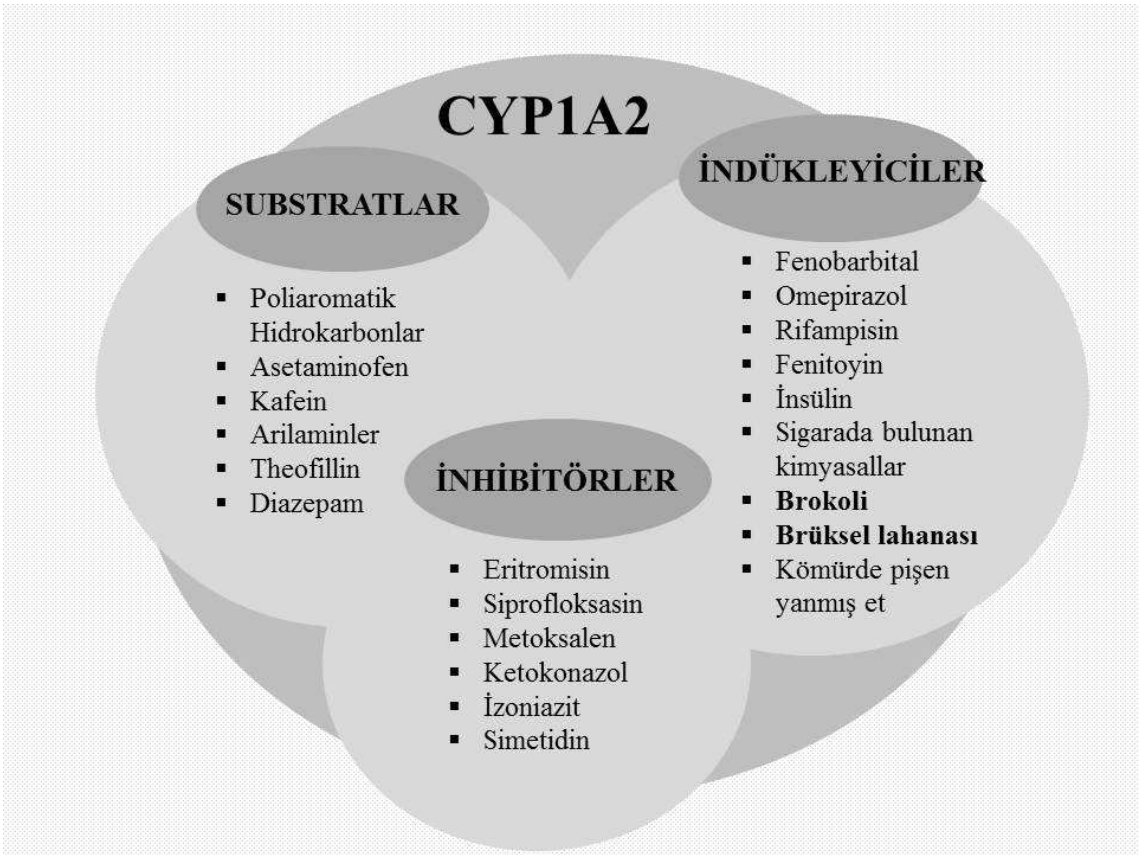
1.2.3. CYP1A2 izozimi

Karsinojen metabolizmasında önem teşkil eden CYP1A2 izozimi, hepatik bir enzim olup, insan karaciğerindeki total sitokrom P450 içeriğinin % 15'ini kapsar (Shimada ve ark., 1994; Tomaszewski ve ark., 2008). CYP1A2 enziminin substratları, inhibitörleri ve indükleyicileri Şekil 1.9'da verilmiştir (Tomaszewski ve ark., 2008).

Bu izozim, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlu bifeniller (PCB), dioksinler, aromatik aminler ve aflotoksinler gibi çevresel ve diyetsel prokarsinojenlerin aktivasyonunda ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Ayrıca bu izozimin

PAH/PCB türevi substratları, aril hidrokarbon reseptör aracılı bir mekanizmayla, enzimin ekspresyonunu mRNA seviyesinde indükler (Nebert, 1989). Dolayısıyla CYP1A2 protein miktarı ve enzim aktivitesi de artar. Bunun neticesinde PAH/PCB'lerin daha toksik ve karsinojenik metabolitlere çevrilmeleri artar. Bu döngü PAH/PCB maruziyeti söz konusu olduğu sürece artarak devam eder (Arınç ve Şen, 1999; Boyuneğmez-Tümer ve Arınç, 2006).

Yapılan çalışmalar CYP1A izozimlerinin, akciğer kanseri (Mc lemore ve ark., 1990), kolorektal kanser (Sivaraman ve ark., 1994) ve meme kanseri (Jefcoate ve ark., 2000) gibi karsinojenik oluşumlarda önemli rol oynadığını göstermiştir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada fitokimyasalların özellikle quercetin, genistein ve theofillinin, CYP1A izozimlerinin ekspresyonlarını inhibe ederek çeşitli kanser türlerinde önemli baskılayıcı etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (Henderson ve ark., 2000; Ioannides, 2002; Machala ve ark., 2001). Tam tersi olarak brokoli, brüksel lahanası gibi bazı bitkilerde bulunan glukorafanin ve glukobrassisin gibi fitokimyasallarda CYP1A2'yi indüklemektedir (Vang ve ark., 2001). Bu nedenle olası CYP1A2 fitokimyasal etkileşimi kimyasal karsinojenezde etkin rol alan CYP1A2'inin seviyesini/aktivitesini değiştireceğinden, bireylerin kimyasal karsinojenlere oluşturacağı cevap açısından önemlidir. Bunun yanı sıra, her ne kadar CYP1A2 geniş ölçüde çevresel ve diyetsel kimyasalların aktivasyonunda rol oynasada bazı ilaç moleküllerinin metabolizmasında da aktif rol almaktadır. Bu ilaçları asetaminofen, diazepam, naproksen, ketokonazol ve simetidin olarak sıralayabiliriz (Tomaszewski ve ark., 2008). Bu nedenle, olası bir fitokimyasal/diyetsel takviye-CYP1A2 etkileşimi bireylerin ilaç yanıtı açısından da oldukça önemlidir.



Şekil 1.9. CYP1A2 izoziminin bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri (Tomaszewki ve ark., 2008'den derlenmiştir).

1.2.4. CYP2E1 izozimi

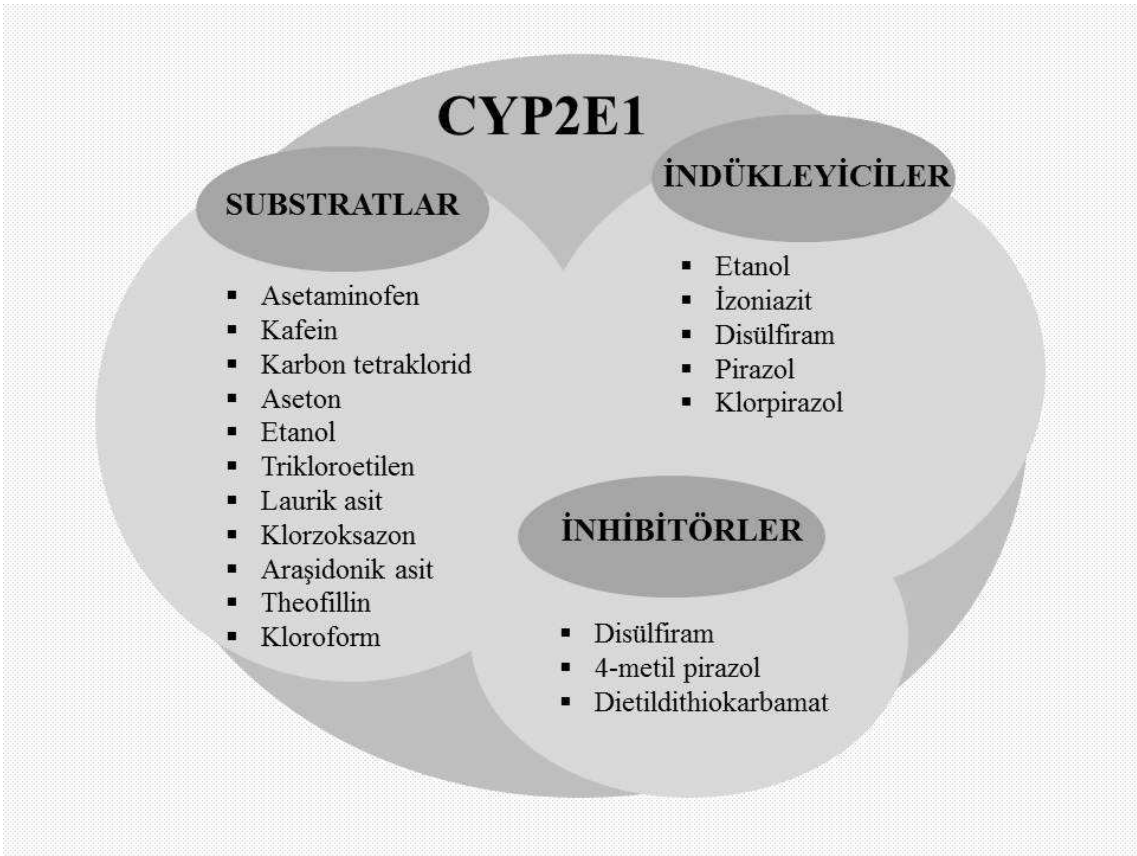
Ksenobiyotiklerin büyük bir kısmının metabolizmasında önemli rol oynayan CYP2E1 izozimi, karaciğerdeki total sitokrom P450 içeriğinin % 7' sini oluşturur (Shimada ve ark., 1994). Yoğun olarak karaciğerde bulunan bu izozim, başta karaciğer olmak üzere böbrek, akciğer, testis, ovaryum, iskelet kası ve dalak gibi dokularda da eksprese olur (Tomaszewski ve ark., 2008). Bu izozimin bilinen bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri Şekil 1.10'da verilmiştir.

CYP2E1 izozimi, aktif bölgesinin küçük olmasından dolayı özellikle düşük moleküler ağırlıklı prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonunda önemli rol oynar. CYP2E1'in metabolizmasında görev aldığı bileşikler, endüstriyel çözücüler (benzen, karbontetraklorid, kloroform, vinil klorid), zehirli kimyasal katkı maddeleri (akrilamid), halojenli anestetikler (halothan, sevafluoran, enfluoran, izofluoran), ilaçlar (asetaminofen, klorzoksazon, trimetadion) şeklinde sıralanabilir (Şekil 1.10), (Raucy ve ark., 1993; Garton ve ark., 1995; Kharasch ve Thummel, 1993). Bu bileşiklerin CYP2E1 tarafından metabolik aktivasyonu sonucu oluşan hepatotoksik veya karsinojenik metabolitlerinin, DNA'ya

bağlanarak mutasyonlara ve kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Ronis ve ark., 1996). Bu nedenle CYP2E1'de, CYP1A2 gibi kimyasal karsinojenezde önemli role sahip bir diğer CYP izozimidir. CYP2E1 aktivitesinde gözlenen bireyler arası genetik farklılıkların (polimorfizm kaynaklı) lösemi, akciğer ve göğüs kanseri gibi bazı kanser çeşitlerine yatkınlığı artırdığı ortaya koyulmuştur (Tümer ve ark., 2010; Le Marchand ve ark., 1998; Shields ve ark., 1996; Wu ve ark., 1998).

Kimyasal karsinojenezdeki önemli rolünün yanı sıra CYP2E1 izozimi, asetaminofen, izoniazid ve klorzoksazon gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda da rol alır. Bu enzim substratları vasıtasıyla ve bazı patofizyolojik durumlarla (diyabet, açlık vb.) indüklenmektedir. Ancak CYP2E1, CYP1A izozimlerinin aksine transkripsiyonel kontrolün yanısıra, posttranskripsiyonel olarak da kontrol edilen ve bu anlamda CYP izozimleri arasında farklılık gösteren bir enzimdir (Arınç ve ark., 2005; Arınç ve ark., 2007; Hong ve ark., 1987; Lucas ve ark., 1998).

CYP1A alt ailesindeki gibi, çeşitli fitokimyasalların CYP2E1 aktivitesini inhibe ederek ya da gen ifadesi/protein seviyesini baskılayarak nitrozamin gibi prokarsinojenik kimyasalların karsinojenik ve mutajenik etkilerini antagonize ettiği gösterilmiştir (Apostolides ve ark., 1997; Catteral ve ark., 2003; Shukla ve Taneja, 2002). Tüm bunlar göze alındığında, olası CYP2E1-fitokimyasal/diyetsel takviye etkileşimlerinin ortaya konulması hem toksikolojik hem de farmakolojik açıdan önemlidir.



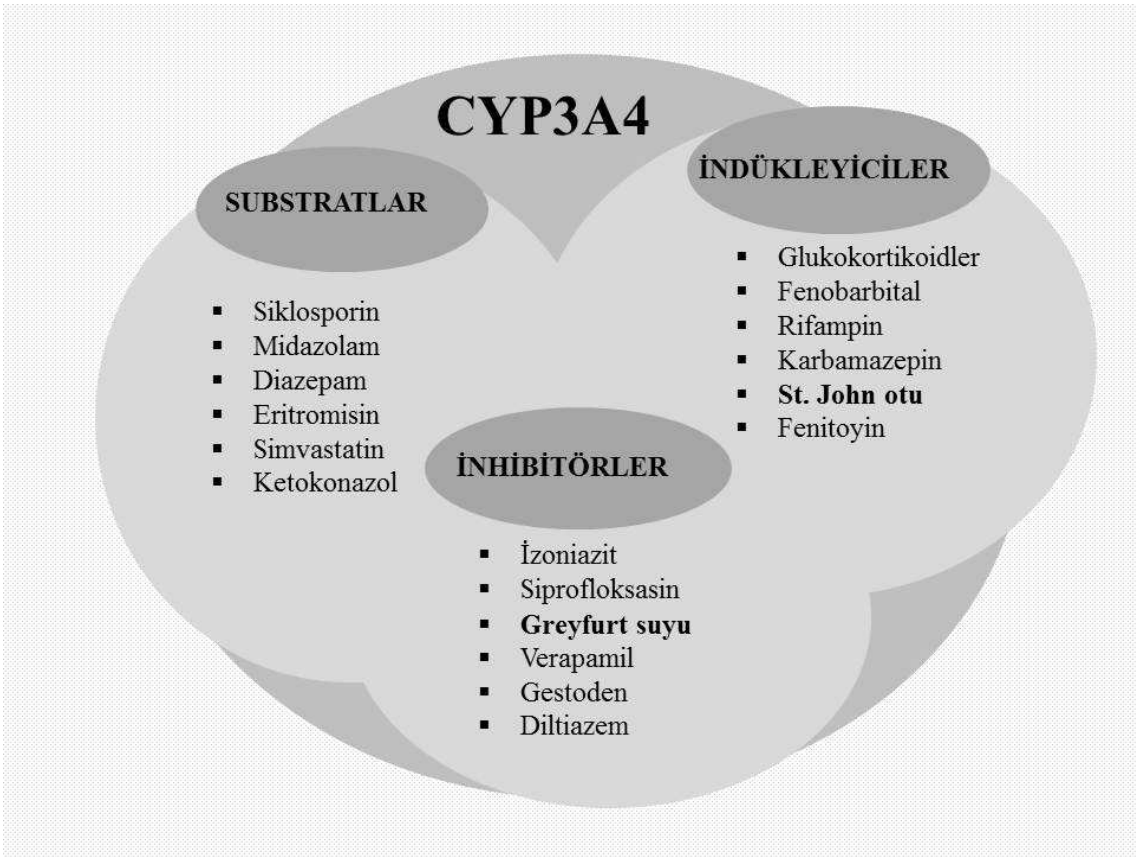
Şekil 1.10. CYP2E1 izoziminin bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri (Tomaszewki ve ark., 2008'den derlenmiştir).

1.2.5. CYP3A4 izozimi

İnsanda CYP3A4 olarak ekspres edilen bu enzimin, sıçanlardaki karşılığı CYP3A1'dir. Sitokrom P450 süper ailesinin insanda en fazla ifade edilen izozimi olan CYP3A4, bilinen terapötik ajanların % 50'sinden fazlasının metabolizmasında görev aldığından farmakolojik açıdan oldukça önemli bir CYP izozimidir (Shimada ve ark., 1994). Yoğun olarak karaciğer ve gastrointestinal sistemde olmak üzere böbrek, prostat, parankima hücreleri ile bağırsak mukoza hücrelerinde de eksprese edilir (Tomaszewki ve ark., 2008).

CYP3A4, antibiyotikler (eritromisin), yatıştırıcılar (midazolam), bağışıklık sistemi ayarlayıcıları (siklosporin), anti-viral ilaçlar (ritonavir and saquinavir), anti-histaminler (astemizole), kalsiyum kanal bloklayıcıları (nifedipine and verapamil), HMG-KoA redüktaz inhibitörleri (lovastatin), uyarıcılar gibi farklı birçok ilacı metabolize eder (Wrighton ve Stevens, 1992). Rifampin, fenobarbital, fenitoyin gibi bileşikler tarafından indüklendiği bilinen CYP3A4 izozimi tam tersi şekilde, izoniazit, ketokanozol, greyfurt suyunda bulunan bergamottin gibi bileşikler tarafından da inhibe olmaktadır (Chang ve

Kam, 1999). İlaç metabolizmasında aktif role sahip CYP3A4 izoziminin bilinen bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri Şekil 1.11'de verilmiştir.



Şekil 1.11. CYP3A4 izoziminin bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri (Tomaszewki ve ark., 2008'den derlenmiştir).

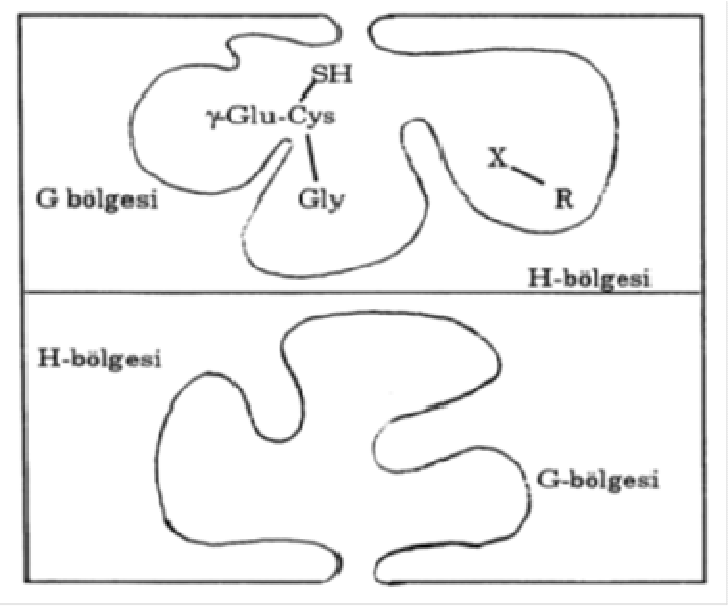
CYP3A4, klinik ilaçların yanı sıra, sigarada ve kömürde pişen yanmış etde bulunan norharman ve anilin heterosiklik bileşikler ile bazı mantar türlerince üretilen aflatoksin B1 gibi toksinlerin metabolizmasında da görev almaktadır. Bu bileşiklerin metabolik aktivasyonu sonucu oluşan reaktif ürünlerin, DNA ve proteinlere bağlanarak, toksisiteye ve mutasyonlara neden olduğu bilinmektedir (Guengerich, 2001; Levitt ve ark., 1977; Ueng ve ark., 1998). Bu nedenle, CYP3A4 toksikolojik açıdan da önem taşımaktadır.

Önceki bölümlerde bahsedildiği üzere yapılan çalışmalar, diyetsel flavonoidlerin CYP3A4 aktivitesini önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir (Bailey ve ark., 1998; He ve ark., 1998; Ioannides, 2002). Bu şekilde değişen CYP3A4 ekspresyonu tedavi sırasında, beklenmedik ilaç etkilerinin ortaya çıkmasına -terapötik etkide azalma ya da toksisite gibi- neden olabilir. Bu nedenle, piyasadaki klinik ilaçların Faz I metabolizmasında önemli

ölçüde rolü olan CYP3A4'ün, olası ilaç-fitokimyasal/diyetsel takviye etkileşimlerinin bilinmesi son derece önemlidir.

1.3. Glutatyon S-Transferaz Enzimleri

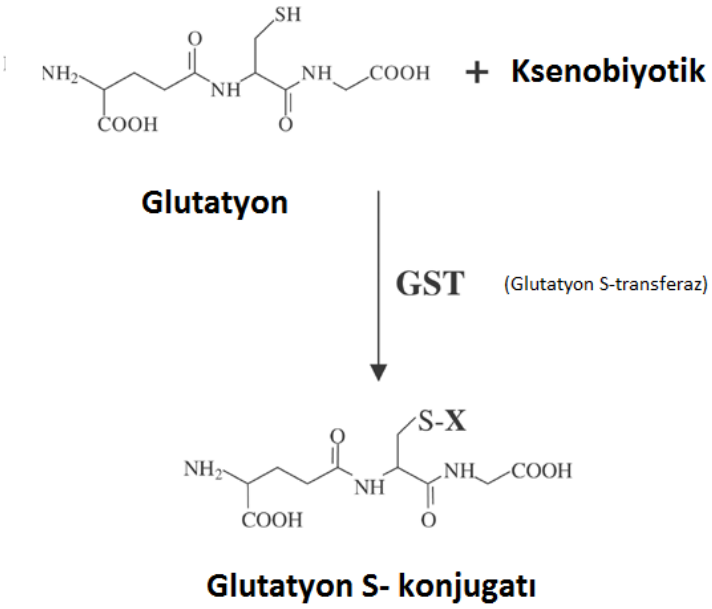
Ksenobiyotik metabolizmasında oldukça önemli role sahip bir diğer enzim ailesi GST' lar (glutatyon-S-transferaz) [E.C.2.5.1.18], ilaçların ve ksenobiyotiklerin büyük bir kısmının Faz II metabolizmasından sorumludur. Bu enzimler, çeşitli ekzojen veya endojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin, glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu sağlayarak vücuttan atılımlarını gerçekleştirir (Bulavin ve ark., 1996; Mosialou ve ark., 1993). Şekil 1.12'de görüldüğü gibi, dimerik bir yapıya sahip GST enziminin, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan glutatyon (γ-glutamil sistein glisin) kosubstratına özgül olan bir G bölgesi ile hidrofobik ve elektrofilik substratların bağlandığı H bölgesi vardır (Aliya ve ark., 2003; Armstrong, 1997).



Şekil 1.12. GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi (Aliya ve ark., 2003'den alınmıştır).

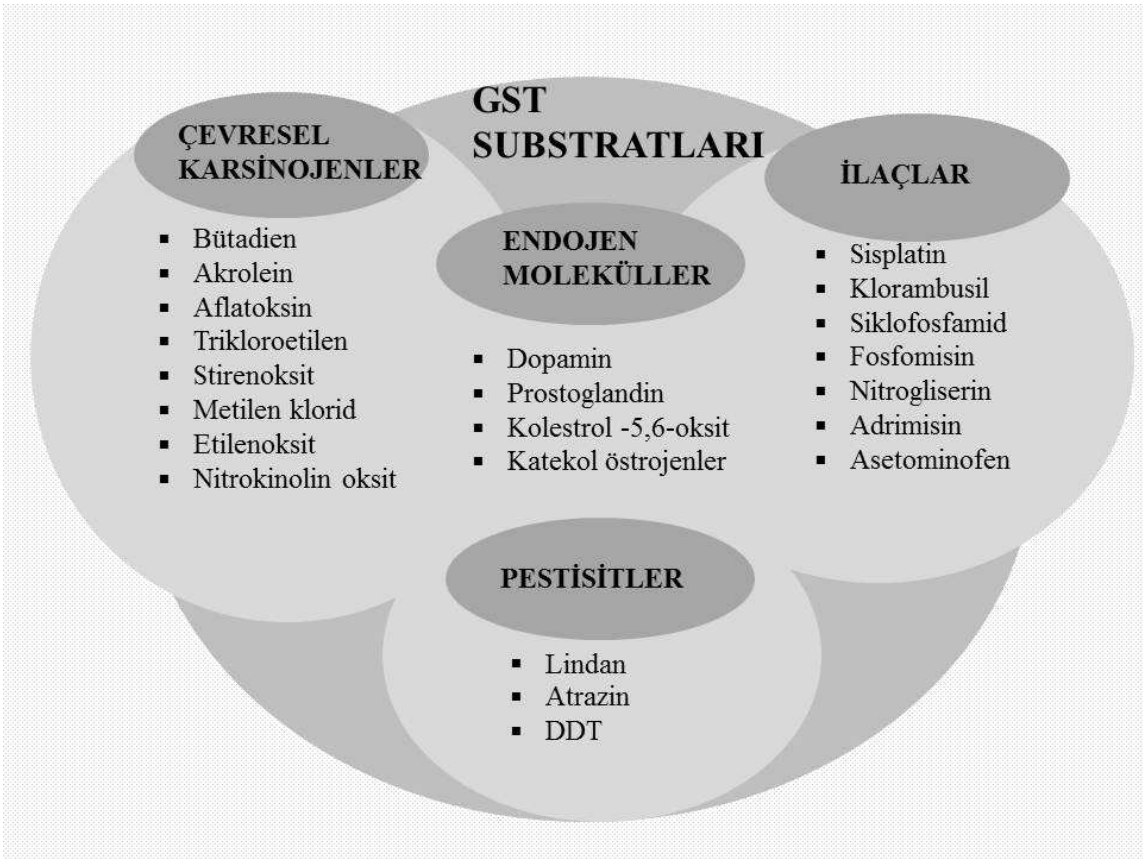
GST' lar, elektrofilik substratların, GSH'a nükleofilik ataklarını katalize eder dolayısıyla, bu substratların hücre içerisindeki makromoleküllere karşı reaktivitelerini azaltır (Armstrong, 1997). Şekil 1.13'de görüldüğü üzere bu enzimler, ksenobiyotikleri GSH'daki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder. Bu sayede oluşan GSH konjugatlarıyla bileşiğin daha fazla suda çözünür hale gelmesi sağlanır. Bu aşamanın ardından GSH'dan koparılan glutamat ve glisin, sisteinin

serbest amino grubu ile asetillenip, merkapturik asitlere dönüştürülür ve safra yolu ile vücuttan atılır. Bu şekilde, pekçok potansiyel kanserojen, sitotoksik ve genotoksik bileşiğin GSH ile konjugasyonu sonucu vücuttan atılımlarını sağlayan bu enzim ailesi, vücut için oldukça önem taşıyan enzim gruplarından biridir (Canuto ve ark.,1993; Listowsky ve ark.,1988; Onat ve Emerk, 1996; Thomas ve ark., 1989).



Şekil 1.13. GSH konjugatının oluşumu (Townsend ve Tew, 2003'den uyarlanmıştır).

Şekil 1.14'de verildiği üzere, GST'ların polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), nitrojenli ve halojenli bileşikler, organofosfatlar, α-β doymamış aldehitler ile lindan, atrazin, DDT gibi toksik pestisitler; bütadien, aklorein ve aflatoksin gibi çevresel karsinojenler; sisplatin, siklofosfamid, asetominofen gibi klinik ilaçları içeren ekzojen substratlarının yanı sıra, dopamin, prostoglandin, kolestrol 5-6 oksit gibi endojen substratları da vardır (Eaton ve Bammler, 1999; Hayes ve Pulford, 1995). Günlük hayatta, sigara kullanımıyla, diyetle, rutin ilaç tüketimi sonucu vücuda giren, potansiyel olarak karsinojen ve mutajen bu bileşiklerin GST enzimleri ile detoksifikiye olmaları son derece önemlidir (Hayes ve Pulford, 1995).



Şekil 1.14. GST enzimlerinin bazı substratları (Eaton ve Bammler, 1999; Hayes ve Pulford, 1995).

Yukarıda değinildiği gibi birçok hidrofobik ve elektrofilik substrata sahip bu enzimler, substrat spesifikliği, protein dizileri, izoelektrik noktaları ve immünolojik özellikleri gibi kriterlere göre 8 sınıfta toplanmıştır. Geniş bir aileye sahip bu enzimlerin memeliler, böcekler, balıklar, kuşlar, annelidler, molluskalar dahil yaşamın birçok formunda bulunduğu da bilinmektedir (Armstrong, 1997; Board ve ark., 1997; Clark, 1989; Habig ve ark., 1974; Keen ve ark., 1976; Meyer ve ark., 1991; Perez-Lopez ve ark., 2000; Rouimi ve ark., 1996). Bu enzimler, karaciğer sitozolü başta olmak üzere, incebağırsak, kalınbağırsak, böbrek, akciğer, meme, kas, dalak, testis ve plasenta gibi birçok organın sitozolü ve membranında lokalize olur. (Habig ve ark., 1974; Sijm ve Opperhuizen, 1989). İnsanda alfa, mu, pi, teta, mikrozomal GST sınıfları olarak ayrılan bu enzimlerin 4 tanesi (alfa, mu, pi, teta) sitozolde lokalize olurken, mikrozomal GST'lar membrana bağlı şekilde bulunur (Mannervik ve ark., 1992).

Şekil 1.14'de görüldüğü üzere bu enzimlerin, klinik amaçlı kullanılan ilaçlardan, toksik ve karsinojenik kimyasallara kadar geniş bir substrat spektrumuna sahip olmaları, onları hem farmakolojik hem de toksikolojik açıdan oldukça önemli kılmaktadır. Birçok potansiyel sitotoksik ve genotoksik bileşiğin detoksifikasyonunda rolü olan bu enzimlerin, çevresel ya da genetik faktörlerden dolayı ekspresyonlarında ve aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerin kanser gelişimi için de risk faktörü oluşturduğu bilinmektedir. Yıllardır yapılan birçok çalışma ile, GST süper ailesine ait GST Mu (gen delesyonu), GST Pi (Ile105Val) genlerinde var olan polimorfizmlerin, enzimin katalitik aktivitesinde yarattığı değişiklikler nedeniyle, meme kanseri (Egan ve ark., 2004), mide kanseri, safra kesesi ve prostat kanseri (Harries, 1997; Zendehlel ve ark., 2009), akciğer kanseri (Gervasini ve ark., 2010) gibi çeşitli kanser türlerine yatkınlığı artırdığı gösterilmiştir. Bu enzimlerin aktiviteleri, genlerde var olan polimorfizmler gibi genetik faktörlerin yanı sıra, diyet gibi çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Örneğin, karotenoid bakımından zengin sebzeler ve narenciyelerin içeriğindeki β-karoten, GST enzimlerinin seviyelerini ve aktivitelerini artırarak akciğer kanser riskini azaltmaktadır (Gervasini ve ark., 2010). Benzer şekilde, bu enzimlerin aktivitelerinin, diyet yoluyla alınan bitkisel preparatların içeriğinde bulunan çeşitli fitokimyasallara maruz kalma sonucu değişim gösterdiği yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Örneğin; *in vivo* olarak yapılan bir çalışmada, bilinen birçok iyileştirici etkisinden dolayı halk arasında yaygın şekilde kullanılan ısırgan otu özütünün, karaciğer GST aktivitesini önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir (Agus ve ark., 2009). Başka bir çalışmada ise, St. John otunun içeriğinde bulunan hiperisinin, plasental GST Pi aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür (Dalmızrak ve ark., 2012). Bu gibi örneklerin varlığından dolayı dünya çapında alternatif ve destekleyici tedavilerde kullanımı giderek artan bitkisel preparatların, detoksifikasyonda ve kimyasal karsinojenezde oldukça önem arz eden GST enzimleri gibi enzim grupları üzerine etkilerinin bilinmesi son derece önemlidir.

İçeriğinde yoğun şekilde aktif fitokimyasal bulunan Spirulina doğal preparatı son dönemlerde kullanımı giderek artan bitkisel preparatlardan biridir. Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi literatürde, Spirulina' nın terapötik etkilerini gösteren pek çok klinik çalışma vardır (Karkos ve ark., 2011). Bunlara ek olarak yapılan hayvan deneyleri ile Spirulina' nın doku harabiyetine ve kimyasallarla indüklenen genotoksisiteye karşı iyileştirici ve koruyucu etkisinin olduğu da bilinmektedir. (İsmail ve ark., 2009; Premkumar ve ark., 2004; Viswanadha ve ark., 2011). Fakat içerisinde yoğun olarak fitokimyasal bulunan bu preparatın, biyotransformasyonda rol alan, özellikle kansere yatkınlıkta önem arz eden GST Mu, GST Pi aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren

herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle Spirulina'nın, birçok potansiyel karsinojenik ve toksik bileşiğin detoksifikasyonunda rol alan bu enzimler üzerine etkilerinin aydınlatılması farmakolojik ve toksikolojik açıdan önemlidir.

1.4. Ksenobiyotik Metabolizmasında Görev Alan Enzimler ve Fitokimyasal Etkileşimleri

Son yıllarda oldukça ilgi gören ve içeriğinde yoğun olarak aktif fitokimyasallar bulunan bitkisel kaynaklı preparatların, alternatif ve tamamlayıcı tedavide kullanılması, terapötik amaçlı ilaçların ve kimyasalların Faz I ve Faz II metabolizmasında rol oynayan CYP450 ve GST enzimlerinin farmakokinetiğini değiştirebilmektedir (Ioannides, 2002; Moon ve ark., 2006). Bunun sonucunda antioksidatif, antikarsinojenik ve antimutajenik etkiler oluşabileceği gibi; düşük ya da yüksek ilaç cevabı, ilaç toksisitesi, zıt ilaç etkileşimi şeklinde etkiler de oluşabilir. Bitkisel preparatların içerisindeki aktif fitokimyasallar, bu enzimlerin substratı, indükleyicisi ya da inhibitörü olabilmekte ve ekspresyonlarını değiştirebilmektedir (Hodek ve Trefil, 2002; Moon ve ark., 2006). Bu etkileşimlere verilecek örneklerden biri; özellikle depresyon tedavisinde alternatif olarak kullanılan St. John otunun (sarı kantaron) içeriğinde bulunan aktif bileşenlerin, piyasadaki terapötik amaçlı ilaçların % 50'sinden fazlasının metabolizmasında önemli rol oynayan CYP3A4 enzimini güçlü şekilde indüklemesidir (Mannel, 2004). St.John otunun içerisinde bulunan fitokimyasallardan, antidepresan özelliğe sahip hiperforinin ilaç metabolizmasında önemli role sahip CYP3A4 ve CYP2B6 izozimlerinin ekspresyonunu regüle eden pregnane X reseptörüne (PXR) bağlanarak enzimin ekspresyonunu indüklediği yapılan *in vitro* çalışmalarla da gösterilmiştir (Eldermeier, 1998; Goodwin ve ark., 2001; Moore ve ark., 2000; Wentworth ve ark., 2000). Bu indüklenme sonucunda, terapötik amaçlı bir ilaç ile birlikte alınan St. John otu, ilacın plazmadan atılım süresini azaltarak ilacın biyoyararlamını düşürebilir. Örneğin; organ nakli yapılan bir hastaya bağışıklık sistemi baskılayıcısı olarak Siklosporin verilmeye başlanmıştır. Nakil işleminin ardından hasta hafif depresyon halinde olduğu için, siklosporin ile eş zamanlı olarak St. John otu takviyesi kullanmaya başlamıştır. Bir süre sonra hastada organ reddi ve karaciğer enzim seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Ardından hasta St. John otu takviyesi kullanmayı bırakmış, hastaya sadece Siklosporin verilmeye devam edilmiş, bunu takiben karaciğer enzim seviyeleri normale dönmüş ve organ reddi vakası yaşanmamıştır (Ruschitzka ve ark., 2000). Bu vakadan da anlaşıldığı üzere, ilacın metabolizmasında rol oynayan enzimler, diyet takviyeleri içerisinde bulunan aktif fitokimyasallar (hiperforin gibi) tarafından indüklenip, ilacın biyoyararlanımını azaltabilir.

Çeşitli bitkisel kaynaklı preparatların içeriğindeki bilinen bazı flavonoidler ise (diosmin, diosmetin, galangin), Aril hidrokarbon reseptörün (AhR) agonisti olduğu için, AhR ile regüle olan CYP1A ailesi enzimlerinin ekspresyonlarının artmasına neden olarak karsinojen aktivasyon kapasitesini artırabilmektedir (Ciolino ve ark., 1998; Ciolino ve Yeh, 1999). Bunun tam tersi şekilde; soya fasülyesinde bulunan diadzein ve genistein ile greyfurt suyunda bulunan naringin gibi aktif fitokimyasalların, CYP1A2 aktivitesini anlamlı derecede azalttığı yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Fuhr ve ark., 1993; Helsby ve ark., 1998; Peng ve ark., 2003; Tsyrlov ve ark., 1994). Bu şekilde, karsinojen aktivasyonunda görev alan CYP1A2 izoziminin, bazı flavonidler tarafından inhibisyonu, kimyasal karsinojenez riskini azaltarak yararlı etki sağlar. Başka bir deyişle, bitkisel preparatların kemopreventif etkiye sahip olması, bir ölçüye kadar karsinojen metabolizmasında aktif rol alan enzimleri inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır (Wargovich ve ark., 2001).

Benzer şekilde, aktif fitokimyasal bileşenlerine sahip bir başka gıda olan sarımsak, sahip olduğu kemopreventif, hipolipidemik, antihipertansif özelliklerinden dolayı bitkisel preparat olarak piyasada bulunmakta ve yaygın şekilde tüketilmektedir (Rahman, 2001; Spigelski ve Jonees, 2001). Sarımsakta var olan organosülfürlü bileşik dialil sülfitin (DAS), CYP2E1'in güçlü inhibitörü olması, CYP2E1'in karsinojen aktivasyon kapasitesini düşürerek, kimyasal karsinojenez riskini azaltmaktadır (Zhou ve ark., 2003).

Sitokrom P450 izozimlerinin yanı sıra, GST enzimlerinin aktivite/ekspresyon seviyelerinin, çeşitli fitokimyasallara maruz kalma sonucunda artma ya da azalma gösterdiği yapılan birçok çalışma ile ortaya koyulmuştur. Yeşil çay ve siyah çayda bulunan katekinlerin; soya fasülyesinde bulunan aktif fitokimyasallardan diadzein ve genisteinin; 'Milk Thistle' adıyla ticari preparat halinde piyasada bulunan deve dikeni bitkisinin içeriğindeki silimarinin GST aktivitesini önemli derecede artırdığı bilinmektedir (Ansell ve ark., 2004; Appelt ve Reicks, 1999; Kohno ve ark., 2002; Maliakal ve ark., 2001). Bunların dışında, kahvenin içeriğindeki antikarsinojenik özellik gösteren kahveol ve kafestol bileşenlerinin, GST Pi aktivitesi üzerinde geri dönüşümlü bir indüksiyon etkisi yarattığı ortaya koyulmuştur (Shilter ve ark., 1996). Tam tersi şekilde şifalı bir bitki olan Thonningia sanguinea' nın içeriğinde bulunan antioksidan thonningianin A (ThA) fitokimyasalının karaciğer sitozolik GST enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Gyamfi ve ark., 2004). Bahsedilen örneklerde olduğu gibi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda ve dolaylı olarak kansere yatkınlıkta önem arz eden GST enzimlerinin de, diyetle alınan bitkisel preparatların içeriğindeki fitokimyasallar ile olan etkileşimlerinin bilinmesi oldukça önemlidir.

1.5. Spirulina'nın Fitokimyasal Bileşenleri ile CYP450-GST Enzimlerinin Etkileşimi

Çizelge 1.1' de verildiği gibi; Spirulina doğal preparatının içeriğinde çok çeşitli ve yüksek oranda aktif fitokimyasal bulunmaktadır. Literatürde, Spirulina'nın içeriğinde bulunan aktif bileşenlerin bazılarının sitokrom P450 enzimlerinin seviyelerini değiştirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri olan alfa tokoferol'ün CYP3A4 seviyesini artırdığı, bunun da ilaç metabolizmasında artışa neden olarak bu izozim tarafından metabolize edilen ilaçların terapötik etkisini düşürdüğü bilinmektedir (Clarke ve ark., 2009). Yine, Spirulina'nın içeriğinde yoğun olarak bulunan retinol (vitamin A) ve prekürsör β-karoten, CYP2B ve CYP2E1 aktivitelerinde artışa neden olurken (Miranda ve Chhabra, 1981), CYP3A4 seviyesinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (Bray ve ark., 2001). Bunların yanı sıra bir başka çalışmada, Spirulina'nın içeriğinde yoğun olarak bulunan fikosiyanin pigmentinin sıçanlarda CYP2C6 (aminoantipiren N-demetilaz) aktivitesini ve total sitokrom P450 içeriğini azalttığı gösterilmiştir (Vadiraja ve ark., 1998).

Çizelge 1.1. Spirulina doğal preparatının bilinen fitokimyasal içeriği (http://www.cyanotech.com/spirulina/analysis.html)

Fitokimyasal	100 g Spirulina içindeki miktar
Zeaksantin	300 mg
Karotenoidler	500 mg
Klorofil	1 g
Fikosiyanin	8 g
Gamma Linolenik asit	1.06 g

Sitokrom P450 enzimlerinin yanı sıra, Spirulina'nın içeriğindeki aktif bileşenlerin GST enzimleri ile etkileşimlerini gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur. *İn vivo* olarak yapılan bir çalışmada, parasetamol ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, β-karoten uygulaması sonucu karaciğer GST enziminin aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2005). Bunun dışında bir diğer çalışmada, retinol eksikliğine bağlı olarak lipid peroksidasyonu oluşturulan ratlarda azalan karaciğer GST seviyesinin, β-karoten uygulaması sonucu arttığı bilinmektedir (Sangeetha ve Baskaran, 2010). Yine, Spirulina'da yoğun olarak bulunan fikosiyanin pigmentinin, sodyum oksalat ile böbrek

hasarı oluşturulan ratlarda azalan GST aktivitesini kontrol grubuna benzer seviyelere çektiği gösterilmiştir (Farooq ve ark., 2004).

Spirulina' nın içeriğinde bulunan retinol, β-karoten gibi aktif bileşenlerin CYP450 ve GST enzimlerinin üzerine etkisinin bilinmesi, insanlar tarafından bütün olarak alınan Spirulina biyokütlesinin olası etkilerini ortaya koymak için yeterli değildir. Tek tek alındıklarında farklı etkiye sahip olan fitokimyasallar, bir arada alındıklarında sinerjistik ve antagonistik olarak çok farklı etkileşimler gösterebilir. Bu nedenle, fitokimyasal içerikli doğal preparatların piyasaya sürülmeden önce, olası ilaç/ksenobiyotik etkileşimlerinin araştırılıp ortaya koyulması, klinik risklerin en aza indirgenmesi açısından gereklidir.

1.6. Spirulina –İlaç Etkileşimlerini Gösteren Klinik Vaka Raporları

Spirulina doğal preparatı, rutin olarak ilaç kullanan birçok hasta grubuna, farklı dozlarda (3-20 tablet) takviye olarak önerilmektedir. Fakat, bu preparatın ilaç biyotransformasyonunda önemli rol oynayan CYP450 ve GST izozimleri üzerine etkileri bilinmediğinden, bu durum farmakolojik açıdan önemli sonuçlar doğurabilmektedir. Literatürde bu duruma örnek verilebilecek Spirulina ilaç etkileşimlerini gösteren pek çok klinik vaka raporu yer almaktadır. Örneğin; Iwasa ve ark'larının ortaya koyduğu bir vakada, hipertansiyon, hiperlipidemi ve tip II diyabet için rutin ilaç kullanan 52 yaşındaki bir Japon hastada bu ilaçlarla birlikte Spirulina kullanmaya başladıktan sonra 2 hafta içerisinde çeşitli hepatotoksik semptomlar gözlemlenmiştir (Iwasa ve ark., 2002). Hastanın Spirulina kullanmaya devam etmesiyle 5. hafta sonunda tüm semptomlar ciddi oranda kötüleşmiş ve yapılan biyopsi sonuçlarında hastada karaciğer hasarı meydana geldiği görülmüştür (Iwasa ve ark., 2002).

Başka bir klinik vakaya göre, trombozis rahatsızlığından dolayı 11 günden beri acenocoumarol kullanan 48 yaşında bir bayan hasta, ilaç tedavisinin 5. gününde; günde 12 adet olacak şekilde Spirulina takviyesi almaya başlamış ve 11. günün sonunda hastanın protrombin zamanın kısaldığı, ilacın etkisinde düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Spirulina ilaç etkileşimi şüphesiyle ilaç dozu yükseltilip, Spirulina dozu azaltılmış ve protrombin zamanının normale döndüğü görülmüştür (Marles ve ark., 2011). Benzer şekilde, antidepresan Effexor-XR kullanan 50 yaşındaki bir bayan hastada, Spirulina' nın ilacın etkisini azalttığı rapor edilmiştir. Spirulina' nın ne kadar süre kullanıldığı, dozu vb. gibi konularda başka bir ayrıntı bulunmamaktadır (Marles ve ark., 2011). Bunun yanı sıra, Depo provera adlı 3 aylık gebelikten korunma iğnesi ile birlikte Spirulina içeren multivitamin kullanan bir hastada ise, karaciğer enzim seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Marles ve ark., 2011).

Görülen bu ilaç-Spirulina etkileşimlerinin metabolizma enzimlerinden kaynaklı olabileceği ihtimali yüksektir. Daha öncede belirtildiği gibi, literatürde, Spirulina' nın ilaçların Faz I metabolizmasında önemli rol oynayan sitokrom P450 izozimleri üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamışsada, bu fikri destekleyici bir çalışma mevcuttur. Mittal ve ark. (1999) gerçekleştirdiği bu çalışmada Spirulina' nın total sitokrom P450 seviyesine olan etkisi araştırılmıştır. Buna göre, 10 gün süreyle Spirulina (800 mg/kg) uygulanan farelerde total sitokrom P450 seviyesi yarıya inmiştir ($p<0.01$) (Mittal ve ark., 1999). Yine aynı çalışmada Spirulina' nın total GST aktivitesini artırdığı gösterilirken, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda ve dolaylı olarak kansere yatkınlıkta önem arz eden GST izozimleri üzerine etkilerinin gösterildiği bir çalışmaya da rastlanılmamıştır (Mittal ve ark., 1999).

1.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, içeriğinde çok sayıda aktif fitokimyasal bulunan Spirulina' nın, piyasada bulunan ilaçların ve binlerce ksenobiyotiğin metabolizmasında aktif rol oynayan başlıca sitokrom P450 ve GST izozimlerinin ekspresyon ve aktivite düzeylerine olan etkilerinin incelenmesidir. Bu çalışma ile Spirulina' nın ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında önem arz eden sitokrom P450 izozimlerinin (CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4) aktivitesi üzerine etkileri ilk defa belirlenmiş, inhibe veya aktive olan enzimlerin tanımlanması yapılmıştır. Bu enzimlerin gen ifade ve protein ifade düzeyleri de tespit edilmiş, böylelikle transkripsiyonel ve translasyonel kontrol ve etki mekanizmaları aydınlatılmıştır. Bunlarla beraber, Spirulina' nın kimyasalların Faz II metabolizmasında geniş ölçüde yer alan bazı GST izozimlerinin (total GST, GST Mu ve GST Pi) aktivitesi üzerine etkileri de aydınlatılmıştır. Tüm bu verilerin ışığında, Spirulina biyokütlesinin olası metabolizma kaynaklı ilaç-ilaç, ilaç-diyet, ilaç-kimyasal etkileşimlerinin bir kısmı aydınlatılmış halk sağlığı açısından önemli bulgular elde edilmiştir.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Literatürde Spirulina'nın sitokrom P450 enzimleri üzerine etkilerini araştıran sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır. Bu çalışmada genel olarak, Spirulina'nın total sitokrom P450 içeriğini azalttığı ortaya koyulurken, ksenobiyotik metabolizmasında önemli rol oynayan sitokrom P450 -CYP1A2,CYP2E1,CYP3A4- izozimleri üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bahsedilen çalışmada, Swiss albino farelere 10 gün süreyle 800 mg/kg dozunda oral olarak uygulanan Spirulina'nın, total hepatik sitokrom P450 içeriğini yarı yarıya azalttığı gösterilmiştir ($p<0.01$), (Mittal ve ark., 1999). Fakat, total sitokrom P450 seviyesinin azalmasının bilinmesi, farklı substrat özgüllüklerine sahip sitokrom P450 enzimlerinin bireysel değişimi ile ilgili bilgi vermemektedir. Çünkü, total fraksiyonda bazı izozimlerin seviyeleri azalırken, bazılarının artıyor olabilir. Dolayısıyla bahsedilen çalışma, olası ilaç etkileşimlerinin aydınlatılması açısından yeterli değildir. Her bir ilaç ya da ksenobiyotik farklı CYP izozimleri tarafından metabolize edildiğinden, Spirulina'nın CYP izozimlerinin aktivite/ekspresyon düzeylerine etkisini bilinmesi, olası Spirulina-ilaç/ksenobiyotik etkileşimlerinin önlenmesi açısından son derece önemlidir.

Literatürde, Spirulina'nın total GST aktivitesi üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmıştır. Mittal ve ark. (1999) yaptıkları bu çalışmada, Swiss albino farelere 800 mg/kg dozunda oral olarak uygulanan Spirulina'nın, Faz II enzimlerinden karaciğer glutatyon S-transferaz (GST) miktarını artırdığı gösterilmiştir. Bunun dışında Spirulina'nın kimyasallarla oluşturulan toksisiteye karşı koruyucu ve iyileştirici etkilerinin gösterildiği birkaç çalışma mevcuttur. Premkumar ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, farelere farklı dozlarda verilen (250, 500, 1000 mg/kg) Spirulina'nın, sisplatin ve üretan gibi toksik ve mutajenik kimyasalların uygulaması sonucu azalan GST enziminin aktivitesini, doza bağımlı olarak anlamlı derecede arttığı ve en yüksek dozda kontrol grubuna benzer seviyelere taşıdığı görülmüştür. Viswanadha ve ark. (2011) Wistar albino sıçanlar ile yaptıkları bir diğer çalışmada ise, 500 mg/kg dozunda oral olarak verilen Spirulina'nın, 4-nitroquinoline-1-oksit uygulamasıyla azalan GST aktivitesini, yalnızca Spirulina verilen gruba benzer seviyelere taşıdığı görülmüştür. Tez kapsamında yapılan çalışmaların literatürde bir benzeri bulunmamaktadır. Bu çalışma, Spirulina biyokütlesinin sitokrom P450 ve GST aracılı olası kimyasal/ilaç etkileşimlerinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA; EDT002), agaroz (AGA001.100), magnezyum klorür ($MgCl_2$; 105883), bakır sülfat ($CuSO_4$; CUS803), 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (Tris; TRS001), triton X- 100 (TRX777), sodyum dodesil sülfat (SDS; SDS001), glisin (GLN001), HEPES (HEP001.100), Tween-20 (TWN510.500), sükroz (SUC507.1), bromophenol blue (BRO222.1), BioShop Canada (Mainway, Burlington, Ontario) Firmasından satın alındı.

Sodyum-potasyum tartarat (108087), sodyum karbonat (Na_2CO_3; 106392), potasyum klorür (KCI; 104936), hidroklorik asit (HCI; 1003142), folin fenol reaktifi (109001), gliserol (104093), kloroform (102431), 2-propanol (100995), sodyum klorür (NaCl; 106404), sodyum hidroksit (NaOH; 106462), formaldehit (104002), perklorik asit (105192), glasiyal asetik asit (100056), asetil aseton (800023), fenol (100206), p-aminofenol (p-AP; 8451290), anilin (101261), trikloroasetik asit (TCA; 100807), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4; 104873), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4; 105101), dietanolamin (8003116), eritromisin (329815) E.Merck (Darmstadt, Germany) firmasından satın alındı.

Sığır serum albumin (BSA; SB.A2153), butil hidroksi toluen (BHT; W218405), amonyum asetat (A7262), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G7877), kafein (C0750), 4-dimetilaminoantipiren (D8015), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB; 237329), metanol (24229), N, N-metilenbisakrilamid (M7256), 1-2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB; 68800), etakrinik asit (E4754), N-N-dimetilformamid (15440), glutatyon indirgenmiş formu (GSH; G4251) Sigma-Aldrich Chemical (St Louis, Missouri, USA) firmasından satın alındı.

Tetrametil-etilen-diamin (TEMED; A1148), nitro blue tetrazolium klorid (NBT; A1243), fenazin metasülfat (PMS; A2212), 5-bromo-4-kloro-indolil-fosfataz (BCIP; A1117), ε-aminokaproik asit (ε-ACA; A2266), nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP; A1394), dietilpirokarbonat (DEPC; A0881), amonyum persülfat (APS; A1142) Applichem (Ottoweg, Darmstadt, Germany) firmasından satın alındı.

Fenil metan sulfonil florür (PMSF), akrilamid (O341), bisakrilamid (O172) Amresco Biochemicals (Parkway Cleveland, OH, ABD) firmasından satın alındı.

Yağsız süt tozu (sc-2324), Santa Cruz Biotechnology (Bergheimer, Heidelberg, Germany) firmasından temin edildi. Safe view (G108) ABM Biological Materials

(Canada) firmasından satın alındı. Alfazin, alfamin Alfasan International B.V. (Woerden, Holland) firmasından temin edildi. Glucose-6-phosphate (100312) MP Biomedicals (LLC, France) firmasından satın alındı.

Standardize edilmiş nitelikteki *Spirulina platensis* doğal preparatı toz halinde Cyanotech-Nutrex-Hawaii (Kailua-Kona, Hawaii USA) firmasından temin edildi.

3.1.2. Primerler ve antikorlar

Yarı kantitatif PZR yönteminde kullanılan primerler İnvitrogen (Carlsbad, California) firmasından sentezlettirildi. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar Millipore (Billerica, MA, USA) firmasından temin edildi.

3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Tez çalışmaları sırasında Shimadzu UV-1800 spektrofotometre (Schimadzu Co., Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan), Black Decker V2600 homojenizatör, Sigma 3K30 yüksek hızlı soğutmalı santrifüj (12156 rotor PO Box 1713, D-37507, Germany), Nüve soğutmalı santrifüj NF 800R, BioSan ısıtıcılı çalkalayıcı TS-100, Millipore saf su sistemi, Shimadzu ATX224 hassas terazi, Hanna Instruments HI2211 pH metre, Cleaver scientific yatay elektroforez sistemi, Thermo 300XL güç kaynağı, Thermo EC120 mini dikey elektroforez sistemi, Thermo OWL VEP2 elektroblotter, Vilber Lourmat Quantum ST4 jel görüntüleme sistemi kullanıldı.

3.2.Yöntem

3.2.1. Deney hayvanı çalışmaları

3.2.1.1. Spirulina doğal preparatının deney hayvanlarına uygulanması

Çalışmada kullanılan 2-3 aylık, erkek Wistar albino sıçanlar Ankara'dan sertifikalı bir deney hayvanları üretim tesisinden satın alındı ve aynı firma tarafından uygun koşullarda Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesinde bulunan deney hayvanları laboratuvarına getirildi. Ağırlıkları 200-230 gr arasında değişen erkek sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Hayvanların bulunduğu havalandırmalı laboratuvarın sıcaklığı 22±1°C derece olarak sabit tutuldu. Ortam ışığı, hayvanların günlük fotoperiyotlarına uygun olması için 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde ayarlandı. Beslenmeleri için günlük olarak ticari sıçan yemi ve su verildi (Ad libitum). Hayvanların laboratuvar şartlarına uyum sağlamaları için 5 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmadı. Adaptasyon periyodunun ardından hazır olarak toz preparat halinde, Cyanotech-Nutrex-Hawaii firmasından temin

edilen *Spirulina platensis* doğal preparatı distile su içerisinde çözülerek, 3 değişik dozda oral olarak gruplara verildi. Dozlar, literatürde Spirulina için belirtilen bir LD50 değeri bulunmadığı için daha önce yapılan çalışmalar taranarak ve insanlarda kullanılan dozlar dikkate alınarak belirlendi (Viswanadha ve ark., 2011; Mohan ve ark., 2006; Khan ve ark., 2006). Spirulina'nın uygulama protokolü Çizelge 3.1' de verildiği şekildedir.

Çizelge 3.1. Deney hayvanları uygulama protokolü

Grup	Denek sayısı (Sıçan)	Dozlar	Süresi
Kontrol Grubu	8	Distile Su	5 hafta (35 gün)
1. Doz Grubu	8	Spirulina (200 mg/kg)	5 hafta (35 gün)
2. Doz Grubu	7	Spirulina (500 mg/kg)	5 hafta (35 gün)
3. Doz Grubu	8	Spirulina (1000 mg/kg)	5 hafta (35 gün)

Hayvanlar gruplara rastgele olarak dağıtıldı ve grupların hepsi için uygulamalar aşağıda anlatıldığı şekilde yapıldı. Hayvanların günlük yem ve su tüketimleri ile haftalık vücut ağırlıkları ölçüldü. Beş haftanın sonunda son uygulamadan 24 saat sonra, 2/1 oranında hazırlanan Alfamin ve Alfazin karışımı bacak kasına enjeksiyon ile verilerek hayvanlar bayıltıldı ve servikal dislokasyon yapılarak disekte edildi.

Kontrol Grubu: Kontrol grubunda bulunan 8 adet sıçan deney süresince (5 hafta) diğer gruplarla aynı koşullarda tutuldu. Bu gruba Spirulina verilen gruplara verildiği gibi eşit hacimde distile su oral olarak verildi. Bu şekilde kontrol grubunda bulunan hayvanlarda, Spirulina verilen uygulama grubundaki hayvanlarda oluşan stres yaratılmaya çalışıldı.

1. Doz Grubu: Hazır olarak temin edilen Spirulina doğal preparatı her gün taze olarak distile su içerisinde çözüldü. 1. Doz grubunda bulunan 8 adet sıçana 200 mg/kg va (vücut ağırlığı) olacak şekilde oral olarak verildi.

2. Doz Grubu: Hazır olarak temin edilen Spirulina doğal preparatı her gün taze olarak distile su içerisinde çözüldü. 2. Doz grubunda bulunan 8 adet sıçana 500 mg/kg va (vücut ağırlığı) olacak şekilde oral olarak verildi. Bu grupta bulunan sıçanlardan bir tanesi çalışmanın 2. haftasında öldü. Bu grubun uygulamasına 7 adet sıçanla devam edildi.

3. Doz Grubu: Hazır olarak temin edilen Spirulina doğal preparatı her gün taze olarak distile su içerisinde çözüldü. 3. Doz grubunda bulunan 8 adet sıçana 1000 mg/kg va (vücut ağırlığı) olacak şekilde oral olarak verildi.

3.2.1.2. Dokuların temini

Tez çalışmasında kullanılan 2-3 aylık, 200-230 gr ağırlığındaki Wistar albino sıçanlar disekte edildikten sonra hızlı bir şekilde dokuların ağırlıkları tartıldı. Spirulina'nın sitokrom P450 izoenzimlerinin gen ifadeleri düzeylerine etkilerini saptamak amacıyla yapılacak olan yarı kantitatif RT-PZR yöntemi için dokulardan 50 mg ayrıldı ve sıvı azotta dondurularak -80°C'ye kaldırıldı. Geri kalan doku hızlı bir şekilde buzun üzerine alınarak ilk önce soğuk distile su ile daha sonra da soğuk % 1.15' lik KCl çözeltisi ile yıkandı. Enzim aktivitesi tayini ve Western Blot analizinde kullanılacak dokular, buzdolabı poşetlerine koyuldu. Daha sonra üzeri alüminyum folyo ile sarılıp etiketlenerek, mikrozomal ve sitozolik fraksiyonları hazırlamak üzere sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2.2. Sıçan karaciğer dokularından sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların hazırlanması

Sitozolik ve mikrozomal fraksiyonlar, Schenkman ve Cinti (1978) metodundan uyarlanan Şen ve Kırıkbakan (2004) prosedürü kullanılarak hazırlandı. Sıvı azotta dondurulan karaciğer dokuları hızlı bir şekilde tartıldı. Bu aşamadan sonraki bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Dokular buz içinde makas yardımıyla parçalanarak, üzerine doku ağırlığının üç katı olacak şekilde homojenizasyon solüsyonu (3 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.15 mM BHT, % 0.10 Triton X-100, 50 mM Tris-HCI pH 7.5, 0.3 mM ε-ACA, % 7 Gliserol) eklendi. Potter- Elvehjem cam-teflon homojenizatör yardımıyla 10 kez çok yavaş bir şekilde manual homojenizasyon yapıldı. Teflon çubuk cam tüp içinde yaklaşık 20 defa aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde çevrilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap (Black Decker, V2600) kullanılarak yapıldı. Manual homojenizasyondan sonra elde edilen homojenat 1.500xg' de 12 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Mitokondriyel fraksiyonu ve hücre kalıntılarını içeren pelet atıldıktan sonra, supernatant homojenizasyon solüsyonu ile dengelendi ve 12.000xg' de 20 dk santrifüj edilerek pelet uzaklaştırıldı. Yağ tabakasını uzaklaştırmak için supernatant gazlı bez ile filtre edildi ve hacmi ölçüldü. Üzerine hacminin 0.25 katı kadar 0.16 M $CaCI_2$ eklenen supernatant, homojenizasyon solüsyonu ile dengelenerek 30.000xg'de 25 dk 4°C'de santrifüj edildi. Bu aşamada GST izozimlerinin aktivite tayini için elde edilen sitozol fraksiyonundan 4x1 ml örnek alındı. Sitozolik fraksiyonların protein tayini için ise 0.4 ml örnek ayrıldı. Ardından pelet tüp hacminin % 70'ni dolduracak şekilde 1X homojenizasyon solüsyonu ve 0.16 M $CaCl_2$ ile 5-6 defa manual homojenizasyon yapılarak iyice çözüldü. Pelet çözüldükten sonra 30.000xg'de 25 dk 4°C'de santrifüj yapıldı. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelete

doku ağırlığı kadar süspansiyon solüsyonu (2 mM EDTA pH 7.5, % 10 Gliserol) eklendi ve 40-50 defa manual homojenizasyon yapıldı. Mikrozomal fraksiyonların protein tayini için elde edilen homojenattan 0.4 ml ayrıldı. Sitokrom P450 izozimleri aktivitelerinin belirlenmesi ve Western blot analizi için kullanılacak olan mikrozomlar eppendorflara eşit hacimlerde konularak ağızları azot gazından geçirildi. Sıvı azotta dondurularak -80 °C' ye kaldırıldı.

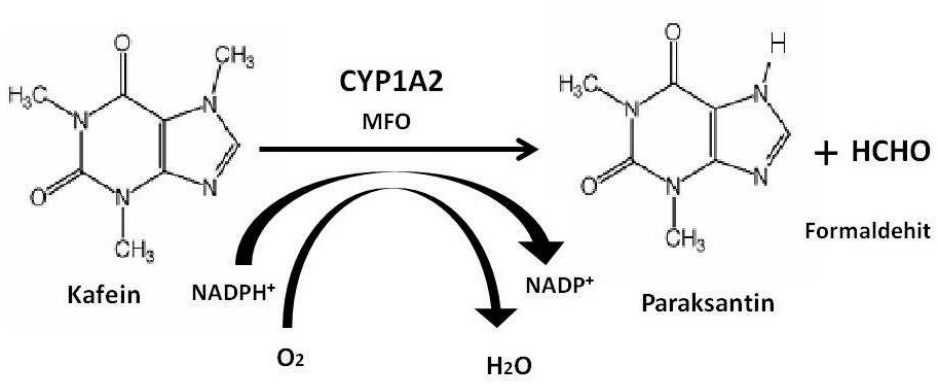
3.2.3. Sıçan karaciğer dokularından hazırlanan sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarı tayini

Wistar albino sıçanların karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal ve sitozolik fraksiyonların protein miktarı tayini BSA (sığır serum albumin) standardı kullanılarak Lowry ve ark. (1951) metoduyla yapıldı. BSA stok solüsyonu 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bu stoktan seri sulandırma yapılarak farklı konsantrasyonlarda (0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.05 mg/ml) 5 standart solüsyon hazırlandı ve 0.5 ml hacimlerde deney tüplerine koyuldu. 1:200 oranında seyreltilen mikrozomlar ve sitozoller, test tüplerine 0.1 ml, 0.25 ml, 0.5 ml hacimlerinde alındı ve son hacim 0.5 ml olacak şekilde deiyonize distile su ile tamamlandı. Alkali bakır reaktifi, taze olarak % 2'lik bakır sülfat, % 2'lik sodyum potasyum tartarat ve % 2'lik sodyum karbonat içeren 0.1 N NaOH'in 1:1:100 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Standartlar ile sitozolik ve mikrozomal fraksiyonları içeren test tüplerine 2.5 ml alkali bakır reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Sonrasında tüplerin üzerine 1 N 0.25 ml Folin reaktifinden (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) eklendi ve 50°C'de 10 dk inkübe edildi. Oluşan rengin absorbansı her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçüldü. Protein miktarları BSA standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.4. Spirulina'nın sitokrom P450 bağımlı enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin saptanması

3.2.4.1. Karaciğer mikrozomlarında kafein N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi

Sıçan karaciğer mikrozomlarında kafein N-demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından ortaya konulan yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi. Kafein N-demetilaz aktivitesi P450'ye bağımlı monooksijenazlardan CYP1A2 izoformu ile ilişkilidir (Berthou ve ark., 1992). Kafein N-demetilasyonuna ait kimyasal reaksiyon Şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.1. Kafein N-demetilasyonu.

Deney koşulları laboratuvar şartlarına göre optimize edildi. Kofaktör olarak kullanılan $NADPH,H^+$ üretim sistemi, laboratuvar ortamında Çizelge 3.2' de belirtilen bileşenlerle hazırlanmıştır. $NADPH,H^+$ üretim sistemi bileşenleri karıştırıldıktan sonra 37°C'de 5 dk çalkalamalı ısıtıcıda inkübe edildi ve buza alındı.

Çizelge 3.3' de verilen reaksiyon karışımları buz üzerindeki deney tüplerinde hazırlandı. Reaksiyonun başlaması için tüplere 0.075 ml $NADPH,H^+$ üretim sistemi eklendi. Tüpler ısıtıcılı çalkalayıcıda 37°C'de 25 dk boyunca orta şiddette çalkalanarak inkübe edildi (BioSan Thermo-Shaker TS-100). Sıfırıncı zaman körü tüplerine kofaktör eklenmeden önce 0.5 ml 0.75 N perklorik asit eklenerek reaksiyon gerçekleşmesi engellendi. İnkübasyonun ardından perklorik asit eklenmeyen reaksiyon tüplerine 0.5 ml 0.75 N perklorik asit eklenerek reaksiyon durduruldu.

Çizelge 3.2. NADPH, H^+ üretim sistemi reaksiyon karışımı

Bileşenler	Stok Konsantrasyon	Alınan Hacim (ml)	Son Konsantrasyon 1ml Reaksiyon Karışımı
G6P (Glukoz-6-Fosfat)	100 mM	0.025	2.5 mM
$MgCl_2$	100 mM	0.025	2.5 mM
HEPES Tamponu pH 7.8	200 mM	0.074	14.6 mM
$NADP^+$	20 mM	0.025	0.5 mM
G6PDH (Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz)	3840 U/ml	0.00013	0.5 U
Distile Su	-----	0.150'ye kadar	-----

Çizelge 3.3. Sıçan karaciğerinde kafein N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği

Bileşenler	Stok Solüsyon	Alınan Hacim (ml)	0.5 ml Reaksiyon Karışımı İçin Final Konsantrasyonu
HEPES Tamponu pH 7.8	400 mM	0.125	100 mM
Kafein	1 mM	0.015	30 μM
Sıçan Karaciğer Mikrozomal Proteini	---	Mikrozomlardaki Protein Konsantrasyonuna Bağlı	1.5 mg/ml
***NADPH Üretim Sistemi**	---	0.075	0.5 mM
Distile Su	---	0.5 ml 'ye Tamamlanır	---

*Kofaktör olarak kullanılan $NADPH,H^+$ üretim sistemi bileşenleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

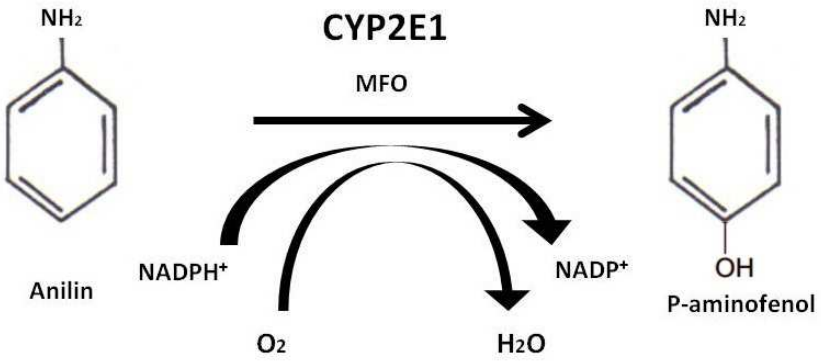
Reaksiyonun durdurulmasının ardından eppendorflara alınan reaksiyon karışımı içerisindeki denatüre olmuş proteinler, 14.000xg 15 dk 4°C'de santrifüj edilerek çöktürüldü (Nüve soğutmalı santrifüj NF 800R). Reaksiyon ürünü olarak ortaya çıkan formaldehiti içeren supernatant solusyonundan 0.5 ml yeni tüplere alındı. Tüplerin üzerine Nash reaktifinden 0.5 ml eklenip karıştırıldı. Reaksiyon karışımı çalkalamalı ısıtıcıda

50°C' de 10 dk inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan absorbans değişikliği 412 nm'de Schimadzu UV-1800 spektrofotometre ile ölçüldü (Schimadzu Co., Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan).

Standart olarak kullanılan 0.5 mM formaldehit solüsyonu taze olarak hazırlandı. Formaldehit standart eğrisi elde etmek amacıyla 4 farklı konsantrasyonda (12.5 nmol, 25 nmol, 50 nmol, 100 nmol) standart tüpleri hazırlandı ve reaksiyon tüpleriyle aynı koşullar altında tutuldu. Formaldehit standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

3.2.4.2. Karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin belirlenmesi

Sıçan karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktivitesi Imai ve ark. (1966) metoduna göre pAP (p-aminophenol)'un miktarı ölçülerek belirlenmiştir. Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi Sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenazlardan CYP2E1 izoformu ile ilişkilidir (Arınç ve ark., 2005). Anilin 4-hidroksilasyon reaksiyonu Şekil 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3.2. Anilin 4-hidroksilasyonu.

Kofaktör olarak kullanılan $NADPH,H^+$ üretim sistemi bileşenleri Çizelge 3.2' de verilmiştir. Çizelge 3.4' de verilen reaksiyon karışımları buz üzerindeki deney tüplerinde hazırlandı. Reaksiyonun başlaması için tüplere 0.15 ml $NADPH,H^+$ üretim sistemi eklendi. Tüpler ısıtıcılı çalkalayıcıda 37°C'de 25 dk boyunca orta şiddette çalkalanarak inkübe edildi. Sıfırıncı zaman körü tüplerine kofaktör eklenmeden önce 0.5 ml % 20 TCA (Trikloroasetik asit) eklenerek reaksiyon gerçekleşmesi engellendi. İnkübasyondan sonra

% 20 TCA eklenmeyen reaksiyon tüplerine, 0.5 ml % 20 TCA eklenerek reaksiyon durduruldu.

Reaksiyonun durdurulmasının ardından eppendorflara alınan reaksiyon karışımı içerisindeki denatüre olmuş proteinler, 14.000xg 15 dk 4°C'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Reaksiyon ürünü olarak ortaya çıkan p-aminofenolü içeren supernatant solüsyonundan 1 ml yeni tüplere alındı. Tüplerin üzerine 0.5 ml % 20 Na_2CO_3 ile % 4 fenol içeren 0.4 N NaOH eklenerek karıştırıldı ve 50°C'de 10 dk inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan absorbans değişikliği 630 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü.

Çizelge 3.4. Sıçan karaciğerinde anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği

Bileşenler	Stok Solüsyon	Alınan Hacim (ml)	1 ml Reaksiyon Karışımı için Final Konsantrasyonu
HEPES Tamponu pH 7.6	400 mM	0.250	100 mM
Anilin	100 mM	0.1	10 mM
Sıçan Karaciğer Mikrozomal Proteini	---	Mikrozomlardaki Protein Konsantrasyonuna Bağlı	3 mg/ml
***NADPH Üretim Sistemi**	---	0.150	0.5 mM
Distile Su	---	1ml 'ye tamamlanır	---

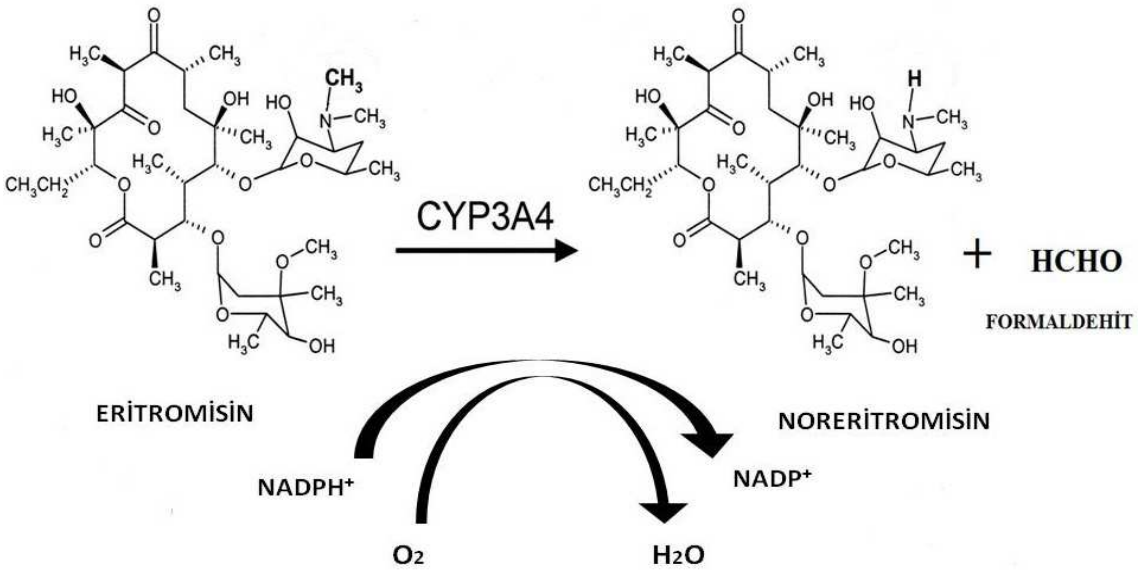
*Kofaktör olarak kullanılan $NADPH,H^+$ üretim sistemi bileşenleri Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Standart olarak kullanılan 0.5 mM p-aminofenol solüsyonu taze olarak hazırlandı. 5 farklı konsantrasyonda (2.5 nmol, 5 nmol, 12.5 nmol, 25 nmol, 37.5 nmol) hazırlanan p-aminofenol standartları reaksiyon karışımı ile aynı koşullar altında tutuldu. p-aminofenol standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

3.2.4.3. Karaciğer mikrozomlarında eritromisin N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi

Sıçan karaciğer mikrozomlarında eritromisin N-demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından ortaya konulan yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi. Eritromisin N-demetilaz aktivitesi Sitokrom P450' ye bağımlı monooksijenazlardan CYP3A1 izoformu ile ilişkilidir

(Combalbert ve ark., 1989; Wang ve ark., 1997). Eritromisin N-demetilasyonuna ait kimyasal reaksiyon Şekil 3.3' de verilmiştir.



Şekil 3.3. Eritromisin N-demetilasyonu.

Kofaktör olarak kullanılan NADPH,H^+ üretim sistemi bileşenleri daha önce Çizelge 3.2'de verildiği gibidir. Reaksiyon karışımları Çizelge 3.5' de verilen şekilde buz üzerindeki tüplerde hazırlandı.

Reaksiyonun başlaması için tüplere 0.075 ml NADPH,H^+ üretim sistemi eklendi. Tüpler ısıtıcılı çalkalayıcıda 37°C'de 25 dk boyunca orta şiddette çalkalanarak inkübe edildi. Sıfırıncı zaman körü tüplerine kofaktör eklenmeden önce 0.5 ml 0.75 N perklorik asit eklenerek reaksiyon gerçekleşmesi engellendi. İnkübasyondan sonra perklorik asit eklenmeyen reaksiyon tüplerine 0.5 ml, 0.75 N perklorik asit eklenerek reaksiyon durduruldu.

Çizelge 3.5. Sıçan karaciğerinde eritromisin N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği

Bileşenler	Stok solüsyon	Alınan Hacim (ml)	0.5 ml Reaksiyon Karışımı İçin Final Konsantrasyonu
HEPES Tamponu pH 7.8	400 mM	0.125	100 mM
Eritromisin	50 mM	0.015	1.5 mM
Sıçan Karaciğer Mikrozomal Proteini	---	Mikrozomlardaki Protein Konsantrasyonuna Bağlı	1.5 mg/ml
***NADPH Üretim Sistemi**	---	0.075	0.5 mM
Distile Su	---	0.5 ml 'ye tamamlanır	---

*Kofaktör olarak kullanılan $NADPH,H^+$ üretim sistemi bileşenleri Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Reaksiyonun durdurulmasının ardından eppendorflara alınan reaksiyon karışımı içerisindeki denatüre olmuş proteinler, 14.000xg 15 dk 4°C'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Reaksiyon ürünü olarak ortaya çıkan formaldehiti içeren supernatant solüsyonundan 0.5 ml yeni tüplere alındı. Tüplerin üzerine Nash reaktifinden 0.5 ml eklenip karıştırıldı. Karışım çalkalamalı ısıtıcıda 50°C'de 10 dk inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan absorbans değişikliği 412 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü.

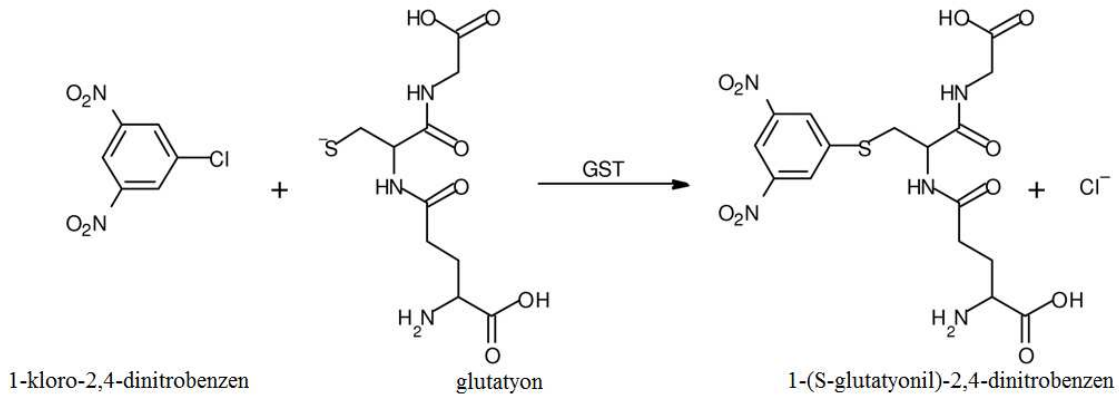
Standart olarak kullanılan 0.5 mM formaldehit solüsyonu taze olarak hazırlandı. Formaldehit standart eğrisi elde etmek amacıyla 4 farklı konsantrasyonda (12.5 nmol, 25 nmol, 50 nmol, 100 nmol) hazırlanan standart tüpleri, reaksiyon tüpleriyle aynı koşullar altında tutuldu. Formaldehit standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

3.2.5. Spirulina'nın sitozolik glutatyon S-transferaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerinin saptanması

3.2.5.1. Karaciğer sitozollerinde total glutatyon S-transferaz aktivitesinin belirlenmesi

Hazırlanan sitozolik fraksiyonlarda, total glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) spektrofotometrik metodundan uyarlanan, Şen ve Kırıkbakan'ın (2004) optimize ettiği

yöntem kullanılarak belirlendi. Habig metodu, GST' ın katalizlediği CDNB ile glutatyon (GSH) konjugasyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil glutatyon kompleksinin ışığı 340 nm'de absorplaması prensibine dayanmaktadır. GST izozimlerinin katalizlediği genel reaksiyon Şekil 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3.4. Glutatyon S-transferaz aktivitesi.

Reaksiyon karışımı için, 0.4 M potasyum fosfat (KPi) tamponu pH 7.5, 50 mM redükte glutatyon (GSH) ve 20 mM CDNB stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden Çizelge 3.6' da belirtilen miktarlarda alınarak, kuvartz küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma en son GSH ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve absorbans değişimi spektrofotometrede 340 nm' de 2 dk boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, dakikadaki absorbans değişimleri ve 9.6 $mM^{-1}.cm^{-1}$ olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 3.6. Sıçan karaciğer mikrozomlarında total GST aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
0.4 M KPi Tamponu pH 7.5	100 mM
50 mM Glutatyon (GSH)	1.5 mM
20 mM CDNB	1 mM
Sitozolik Protein	50-100 µg

3.2.5.2. Karaciğer sitozollerinde glutatyon S-transferaz Mu aktivitesinin belirlenmesi

Hazırlanan sitozolik fraksiyonlarda, GST Mu aktivitesi, 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) spektrofotometrik metoduyla tayin edildi. Bu metod, GST Mu izoziminin katalizlediği, DCNB ile GSH konjugasyonu sonucu oluşan tiyoether kompleksinin ışığı 345 nm'de absorplaması prensibine dayanmaktadır.

Reaksiyon karışımı için, 0.4 M potasyum fosfat (KPi) tamponu pH 7.5, 50 mM indirgenmiş glutatyon (GSH), 20 mM DCNB stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden Çizelge 3.7' de belirtilen miktarlarda alınarak, kuvartz küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son GSH ilave edilerek başlatıldı ve absorbans değişimi spektrofotometrede 345 nm'de 2 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, dakikadaki absorbans değişimleri ve 8.5 mM^{-1}. cm^{-1} olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 3.7. Sıçan karaciğer mikrozomlarında GST Mu aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
0.4 M KPi Tamponu pH 7.5	100 mM
50 mM Glutatyon (GSH)	1 mM
20 mM DCNB	1 mM
Sitozolik Protein	50-100 μg

3.2.5.3. Karaciğer sitozollerinde glutatyon S-transferaz Pi aktivitesinin belirlenmesi

Hazırlanan sitozolik fraksiyonlarda, GST Pi aktivitesi etakrinik asit (EA) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) tarafından tarif edilen spektrofotometrik metotla tayin edildi. Bu metod, GST'ın katalizlediği etakrinik asit ile GSH konjugasyonu sonucu oluşan tiyoether kompleksinin ışığı 270 nm'de absorplaması prensibine dayanmaktadır.

Reaksiyon karışımı için, 0.5 M Tris-HCl tamponu, pH 6.8, 50 mM redükte glutatyon (GSH), 4 mM etakrinik asit stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden Çizelge 3.8'de belirtilen miktarlarda alınarak, 1 ml kuvartz küvetinde reaksiyon karışımı hazırlandı.

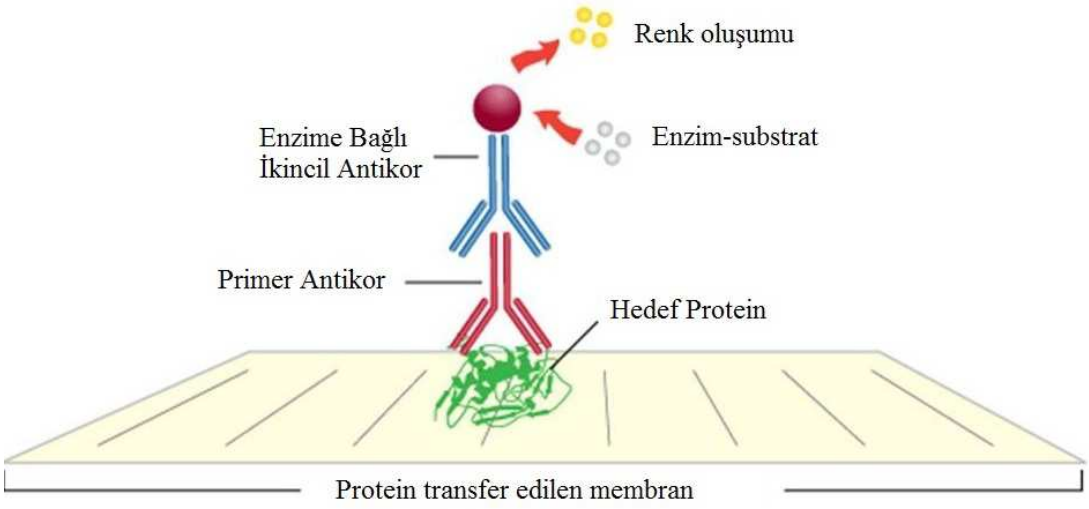
Reaksiyon en son GSH ilave edilerek başlatıldı ve absorbans değişimi spektrofotometrede 270 nm'de 2 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, dakikadaki absorbans değişimleri ve 5.0 $mM^{-1}.cm^{-1}$ olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 3.8. Sıçan karaciğer mikrozomlarında GST Pi aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
0.5 M Tris HCl pH 6.8	100 mM
50 mM Glutatyon (GSH)	2 mM
4 mM Etakrinik Asit	0.2 mM
Sitozolik Protein	50-100 µg

3.2.6. Spirulina'nın sitokrom P450 izozimlerinin protein düzeyinde ekspresyonları üzerine etkilerinin saptanması

Mikrozomal proteinler Laemmli (1970)' de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği ile SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi kullanılarak ayrıştırıldı. Her bir enzimin protein düzeyleri spesifik antikorlar kullanılarak Western Blot tekniği ile immünolojik olarak Towbin ve ark. (1979) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi Şekil 3.5' de şematize edilmiştir.



Şekil 3.5. Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi.
(http://www.leinco.com/general_wb' den uyarlanmıştır).

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili tampon sisteminde % 8.5' lik ayrıştırıcı ve % 4' lük sıkıştırma jellerinde yapıldı. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Çizelge 3.9' da belirtilen miktarlarda verilen sırayla karıştırılarak kullanımdan hemen önce hazırlandı.

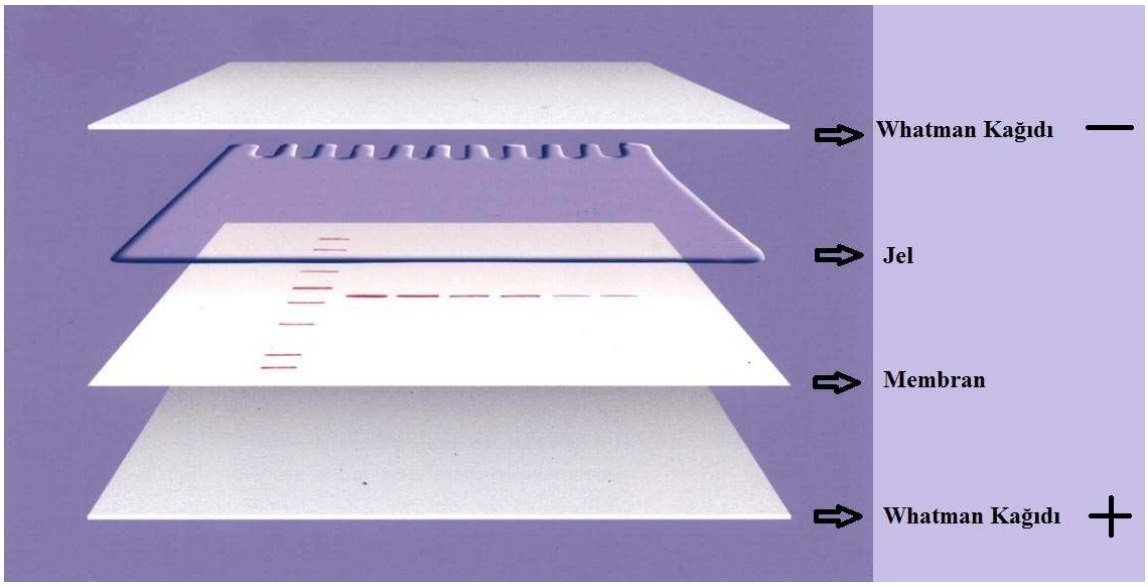
Çizelge 3.9. SDS-PAGE sıkıştırıcı ve ayrıştırıcı jellerin bileşenleri

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel (%8.5)	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel Çözeltisi (ml)	8.5	1.5
Distile Su (ml)	13.55	5.88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7.5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	2.5
% 10 SDS (ml)	0.4	0.16
% 10 APS (ml)	0.15	0.065
TEMED (ml)	0.015	0.012

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Thermo EC120 mini dikey elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak iki cam yüzey arasına 1mm boşluk kalacak şekilde spacer koyularak jelin dökületeceği alan hazırlanıp jel yürütme aparatına yerleştirildi. Hazırlanan jelin düz olmasını sağlamak amacıyla aparat % 1'lik agaroz jelin içine dikkatlice koyuldu. Bu işlemlerden sonra ilk olarak Çizelge 3.9' da belirtildiği gibi ayrıştırıcı jel solüsyonu hazırlandı. Proteinleri yüklediğimiz kuyucukları oluşturmak için kullanılan tarağın 1 cm altına kadar ayrıştırıcı jel solüsyonu döküldü. Jelin polimerizasyonunu sağlamak amacıyla hava ile olan temasını kesmek için şırınga yardımıyla bir miktar izopropanol koyuldu. Ayrıştırıcı jelin polimerleşmesinin hemen ardından, sıkıştırıcı jel solüsyonu Çizelge 3.9' da belirtildiği gibi hazırlandı ve ayrıştırıcı jelin üzerine koyulan izopropanol uzaklaştırıldı. Hazırlanan sıkıştırıcı jel cam yüzeylerin en üst seviyesine kadar döküldü ve 1 mm kalınlığında 15 kuyucuk oluşturan tarak yerleştirildi. Sıkıştırıcı jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Polimerleşmemiş jel kalıntıları ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için kuyucuklar şırınga yardımıyla elektrot yürütme çözeltisi (25 mM Tris, 192 mM glisin, % 0.1 SDS) ile yıkandı. Protein örnekleri 4X örnek sulandırma çözeltisi (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, % 8 SDS, % 40 gliserol, % 20 β-merkaptoetanol, % 1 bromophenol blue) ile 1:3 oranında sulandırıldı ve su banyosunda 2 dakika kaynatıldı. Sulandırılan protein örneklerinden 25

µg alınarak Hamilton şırıngası yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Yüklemeden sonra, tank jel yürütme aparatına yerleştirilerek, elektrot yürütme çözeltisi koyuldu. Elektroforez için Thermo 300XL güç kaynağı kullanıldı. Elektroforetik ayrıştırma için proteinler sıkıştırıcı jelde 15 mA, ayrıştırıcı jelde 25 mA'de yürütüldü. Yol gösterici boya tabana ulaştığında elektroforez işlemi sonlandırıldı. Jel, transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve % 20 metanol) içerisinde 10 dk süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

Bu sırada Western blot analizinde kullanılacak olan nitroselüloz membran ve Whatman filtre kağıdı kesilerek ve transfer tamponu içerisinde ıslatıldı. Blotlama sandiviçi Şekil 3.6' da gösterildiği gibi tabana önce nemlendirilmiş sünger sonra Whatman filtre kağıdı sonra jel, sonra tekrar Whatman filtre kağıdı ve sünger olacak şekilde hazırlandı. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkatlice yerleştirilerek, elektroforetik transfer sistemi içine koyuldu. Elektroforetik transfer Thermo OWL VEP2 electroblotter kullanılarak yapıldı. Elektroforetik transfer sistemi güç kaynağına bağlandı. Voltaj ve maksimum akım limiti 90 V ve 400 mA'e ayarlandı. 1.5 saat süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edildi. Süre sonunda güç kaynağı kapatıldı ve sistemin vidaları açıldı. Üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot' elde edildi.



Şekil 3.6. Western blot analizinde sandviç hazırlanması (http://news.thomasnet.com/fullstory/Membrane-Sandwiches-make-western-blotting' den uyarlanmıştır).

Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir kabın içine yerleştirildi. Membran, üzerinde protein olmayan boş alanlar ile gerçekleşebilecek spesifik olmayan bağlantıları ortadan kaldırmak amacıyla 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST-Tris

buffer saline tween 20: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl, % 0.05 Tween 20 içinde % 5'lik yağsız süt tozu) ile çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda blot önce 2 saat bloke çözeltisi içinde hazırlanan birincil antikorlar ile inkübe edildi. Birincil antikor olarak CYP1A2 rabbit anti-rat poliklonal antikor, CYP2E1 rabbit anti-rat poliklonal antikor ve CYP3A1 rabbit anti-rat poliklonal antikor kullanıldı. Daha sonra 1 saat işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit/anti-mouse IgG-ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla inkübe edildi. İnkübasyonun ardından blot, TBST solüsyonunda 3 defa 5 dk süre ile yıkandı. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan Çizelge 3.10'da belirtilen şekilde hazırlanan substrat çözeltisi ile 2 dk inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra blot havada kurutulup karanlıkta saklandı. Bantların densitometrik analizi Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlendi. Her bandın densitometrik analizi yapılarak protein seviyelerinin Spirulina uygulaması sonucu nasıl değiştiği belirlendi.

Çizelge 3.10. Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi için hazırlanan substrat solüsyonu

İmmunolojik belirleme için hazırlanan substrat solüsyonu	
Solüsyon A: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 1M NaCl 100 mM MgCl2 100 mM ZnCl2 Dietanolamin NBT Distile su	 2.67 ml 4.0 ml 0.82 ml 0.04 ml 0.096 ml 12.2 mg 40ml'ye tamamlanır
*Solüsyon hazırlandıktan sonra doymuş Tris ile pH 9.55'e ayarlanır. Daha sonra 40 ml'ye tamamlanır.	
Solüsyon B	2 mg/ml fenazin metosulfat
Solüsyon C	5.44 mg/0.136 ml N, N-dimetil formamid
*Substrat solüsyonu; A solüsyonunun tamamı, 0.268 ml B solüsyonu ve C solüsyonunun tamamı karıştırılarak hazırlanır.	

3.2.7. Spirulina'nın sitokrom P450 izozimlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonları üzerine etkilerinin saptanması

3.2.7.1. Sıçan karaciğer dokularından total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için ilk olarak çalışmada kullanılacak olan bütün malzemeler RNAaz aktivitesini engellemek amacıyla % 1 DEPC (Dietilpirokarbonat) içeren distile su ile yıkandı. % 1 DEPC ile muamele edilen bütün malzemeler, DEPC'nin uzaklaşmasını sağlamak için gece boyu çeker ocak altında bekletildi ve sonrasında otoklavlandı.

Total RNA izolasyonu, Trizol (Invitrogen®) solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği prosedür uygulanarak gerçekleştirildi. İlk olarak, -80°C'de muhafaza edilen sıçan karaciğer dokularından yaklaşık 50 µg doku sıvı azot içerisine alınarak öğütüldü. Öğütülen doku ependorf tüp içerisine alındı ve üzerine 600 µl Trizol solüsyonu eklenerek ve oda sıcaklığında düşük hızda karıştırıldı. Ardından 200 µl kloroform eklenip, alt üst edilerek karıştırıldı. Daha sonra karışım 5 dk oda sıcaklığında ve 5 dk buzda inkübe edilip, 13.000 rpm'de 15 dk 4°C' de santrifüj edildi. RNA içeren renksiz supernatant dikkatlice yeni steril eppendorfa alınıp üzerine eşit hacimde (V/V) soğuk saf izoprapanol eklendi. Tüpler oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra, 13.000 rpm'de, 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatantın uzaklaştırılmasının ardından pelet üzerine 1 ml % 75 soğuk etanol eklenip 7.500 rpm'de, 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılarak RNA içeren pelet alev çatısı altında kurutuldu ve 75 µl RNAaz free su içinde çözülerek -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.7.2. RNA konsantrasyonunun belirlenmesi

Karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla spektrofotometre ile 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Nükleik asitlerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu olan 260 nm'deki değerleri kullanılarak RNA miktarları hesaplandı. RNA için yaklaşık 1 optik yoğunluğun 40 µg/ml olduğu bilinmektedir. Buna dayanarak aşağıda verilen formüle göre RNA konsantrasyonları hesaplandı.

RNA konsantrasyonu (µg/ml) = OD260 x 40 µg/ml x Sulandırma Katsayısı

Konsantrasyonları belirlenen RNA'ların OD260/280 oranları hesaplanarak saflıkları belirlendi.

3.2.7.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi için -80°C'de saklanan RNA'lar çıkarılarak 60°C'de 2 dk inkübe edildi. cDNA sentezi için, elde edilen RNA'ların konsantrasyonlarına göre her tüpte 5 µg RNA olacak şekilde hesaplama yapıldı. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi, 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve ABM marka Easy Script Plus™ Revers Transkriptaz (G177) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. cDNA sentezi için 5 µg toplam RNA ve 0.5 µM oligo (dT) primeri, 4 µl 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$ ve 50 mM DDT) ve 1µl dNTP kullanıldı. Son olarak Easy Script Plus Revers Transkriptaz (100 ünite) eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlandı. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda karışım, Easy Script Plus Revers Transkriptaz enzimini inaktif hale getirmek için 85°C'de 5 dk bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, yarı-kantatif RT-PZR yönteminde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.7.4. Yarı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

Spirulina'nın sitokrom P450 izozimlerinden CYP1A2, CYP2E1, CYP3A1 gen ifadeleri düzeylerine etkisini saptamak için yarı kantitatif PZR (yarı kantitatif-polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği kullanıldı. GenBank/EMBL veri bankaları taranarak Çizelge 3.11' de verilen primer dizileri saptanıp, üretici firmaya sentezlettirildi (Minn ve ark., 2005).

Çizelge 3.11. Yarı kantitatif PZR yönteminde kullanılan sitokrom P450 izozimlerinin primer dizileri

Primer Adı*	**Primer Dizisi (5'→3')**	**Yapışma Sıcaklığı (°C)**
CYP1A2F	**CATCCCTCAGGAGAAGATTG**	**55**
CYP1A2R	**TGAACTCCAGCTGATGCA**	
CYP2E1F	**GTCTGAGGCTCATGAGTTTG**	**58**
CYP2E1R	**TCTGGAAACTCATGGCTG**	
CYP3A1F	**AATTCGATGTGGAGTGCCAT**	**55**
CYP3A1R	**CGGATAGGGCTGTATGAGATTC**	
****b-aktin F**	**TGCAGAAGGAGATTACTGCC**	**58**
****b-aktin R**	**CGCAGCTCAGTAACAGTCC**	
*** Primer adı CYP izoformunu tanımlamakta F(forward) R(reverse) primerleri simgelemektedir.**		
****Kontrol amaçlı kullanılan b-aktin primerleri**		

Yarı-kantatif RT-PZR protokolü Çizelge 3.12' de verilmektedir. Her bir tüp için 1X reaksiyon tampon çözeltisi (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, % 50 gliserol, % 1 Triton X-100), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 25 pmol/µl ileri (F) ve geri (R) primer, 2.5 U/ µl HotStart Taq polimeraz enzimi kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.12. cDNA amplifikasyonu için hazırlanan PZR karışımı

Bileşenler	Stok Konsantrasyon	Alınan Hacim	Son Konsantrasyon
Reaksiyon Tamponu	10X	2.5µl	1X
MgCl2	25mM	2µl	2mM
İleri Primer (F)	10pmol	2.5µl	25pmol
Geri Primer (R)	10pmol	2.5µl	25pmol
dNTP	10mM	0.5µl	0.2mM
Taq polimeraz	5U/µl	0.25µl	2.5U/µl
cDNA	-	2µl	-
Ultra Saf Su	-	12.75µl	-
Son Hacim	-	25µl	

Karışım hazırlandıktan sonra PZR tüpleri Techne TC 512 termal döngü cihazına yerleştirildi ve uygun döngü şartları kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Tüm genler için PZR döngüsü aşağıdaki gibidir:

Ön Denatürasyon

1 döngü: 94°C 3 dakika

PZR Döngüsü

25- 35 döngü: 94°C 30 saniye (Denatürasyon)

55-58°C 30 saniye (Yapışma) (Çizelge 3.11)

72°C 45 saniye (Uzama)

Final Uzama

1 döngü: 72°C 5 dakika

PZR ürününün 10 µl'si % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında Safe View boyamayla bantlar gözlemlendi. Bantların densitometrik analizi Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlendi. Her band'ın densitometrik analizi house-keeping gen olan beta-aktin'in densitometrik analizi ile karşılaştırıldı. Böylece sözkonusu genlerin mRNA seviyelerinin Spirulina uygulaması sonucu nasıl değiştiği belirlendi.

3.2.8. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler, SPSS (Statical Package for Social Sciences) 16.0 programı kullanılarak yapıldı. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler ortalama± standart hata olarak ifade edilmiştir. Karşılaştırılan her parametre normallik hipotezine göre test edildi. Verilerin analizinde normal dağılım görüldüğü durumlarda parametrik student t-test, normal dağılım görülmediği durumlarda ise nonparametrik Mann Whitney U test kullanıldı. α -anlamlılık düzeyi $p< 0.05$ olarak belirlendi.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Deney hayvanı çalışmaları

Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan deneklerin ve kontrol grubunun uygulama öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları ile diseksiyon aşamasının ardından ölçülen doku ağırlıkları Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının vücut ve doku ağırlıkları

Grup	Denek No	Vücut Ağırlığı (gr)		Karaciğer Doku Ağırlığı (gr)
		Uygulama öncesi	Uygulama Sonrası	
DOZ 1 (200mg/ml Spirulina)	**D1**	223	248	8.16
	D2	203	239	7.26
	D3	218	285	8.75
	D4	221	277	9.5
	D5	212	264	7.68
	D6	225	270	9.46
	D7	215	260	8.23
	D8	226	268	7.07
ORTALAMA		**217**	**263**	**8.26**
DOZ 2 (500mg/ml Spirulina)	**D9**	215	247	7.68
	D10	218	280	9.02
	D11	228	242	9.55
	D12	206	267	10.44
	D13	230	262	7.71
	D14	230	**öldü**	**öldü**
	D15	220	264	8.98
	D16	222	250	7.73
ORTALAMA		**221**	**258**	**8.35**
DOZ 3 (1000mg/ml Spirulina)	**D17**	215	255	6.03
	D18	226	251	6.6
	D19	208	235	7.69
	D20	201	241	6.35
	D21	206	249	9
	D22	205	232	7.32
	D23	202	242	8.36
	D24	203	264	8.25
ORTALAMA		**208**	**246**	**7.45**
KONTROL GRUBU	**K25**	227	289	12.04
	K26	236	275	9.05
	K27	218	285	8.4
	K28	221	322	10.01
	K29	223	278	8.06
	K30	220	247	7.83
	K31	226	269	8.39
	K32	218	253	7.89
ORTALAMA		**223**	**277**	**8.95**

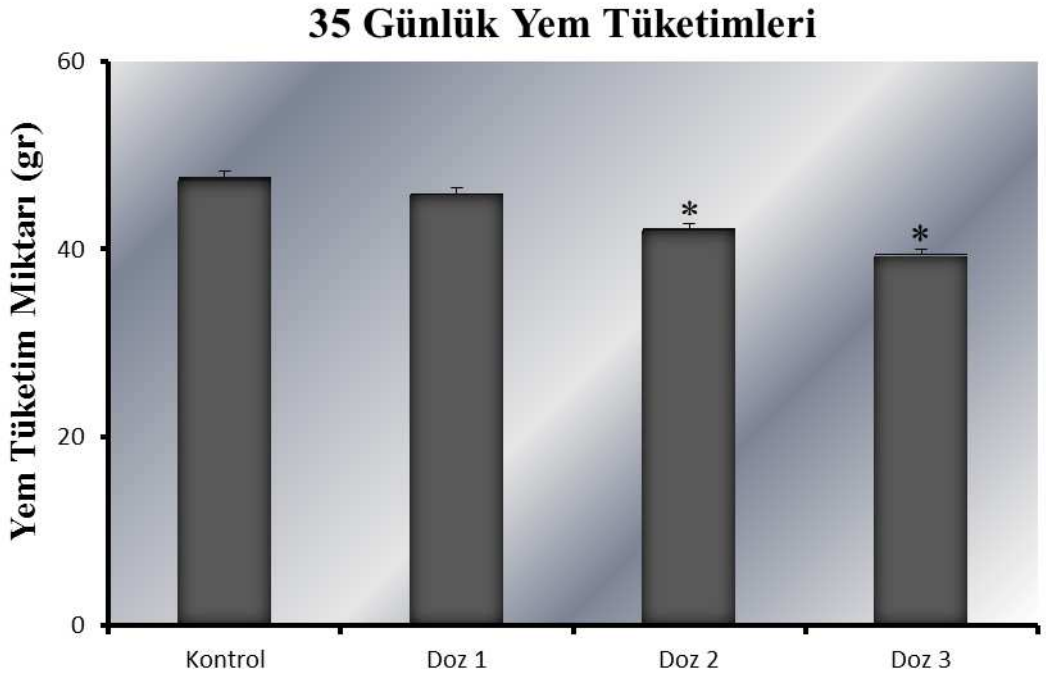
4.1.2. Deneklerin su ve yem tüketimleri

35 gün süreyle Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının deney süresince su ve yem tüketimleri ölçülmüştür. Çizelge 4.2' de görüldüğü üzere, Spirulina uygulaması yapılan deneklerin deney süresince günlük yem tüketimleri, tüm doz gruplarında azalmıştır. Deneklerin yem tüketimlerinin doz gruplarında karşılaştırılması Şekil 4.1' de verilmiştir. Buna göre, 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarında Spirulina uygulaması yapılan 2.ve 3. Doz gruplarında günlük yem tüketimlerinin kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 12 ve % 17 oranında azaldığı görülmüştür. Bu azalma istatiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı iken, 200 mg/kg spirulina verilen 1. Doz grubunda bu şekilde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının 35 günlük yem tüketimleri

Günler	Günlük Ortalama Yem Tüketimleri			
	Doz 1 (gr)	Doz 2 (gr)	Doz 3 (gr)	Kontrol Grubu (gr)
1	58.5	54.5	48.25	60.5
2	49.5	48.75	43.5	54
3	49.5	44.5	38	51
4	48.25	42.75	43.75	48.5
5	44.25	41.5	44	48
6	46.75	41.5	44.75	49
7	47	45.25	43	50
8	44.25	42.75	39	48.25
9	46.5	43.75	40	47
10	45	42.25	37	46.25
11	43	41	40	44.75
12	41.25	43.5	38.5	40.75
13	46.5	42.75	40	42
14	41	41	39	42.5
15	44.5	38	38.75	44
16	42.75	37.75	39.75	43.25
17	43.25	40.75	38.25	49.75
18	40.75	41	39.25	46.25
19	43	39.5	36.25	43.5
20	45.75	40	37.5	44.5
21	41.5	39.75	37.5	44.5
22	43.75	40	40.5	43.75
23	46.5	43.5	37.75	48

24	48	44.75	38.5	48.5
25	45.5	43.5	37	50.75
26	46.25	40.5	36.5	45.5
27	47	39.25	36.25	48.25
28	47.5	39.25	36.25	43.25
29	45.75	41.75	36	45.75
30	45.75	36.75	38	46
31	49.75	38.75	40	54
32	44.25	41.75	35.75	50.5
33	51	49	36.75	50.25
34	43.25	39.75	41.75	44.5
35	45.75	41	39.25	50.5
ORTALAMA	**45.77± 3.44**	**42.03±3.46**	**39.32±2.93**	**47.34±4.00**



* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0.05$).

Şekil 4.1. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının 35 günlük yem tüketimlerinin karşılaştırılması.

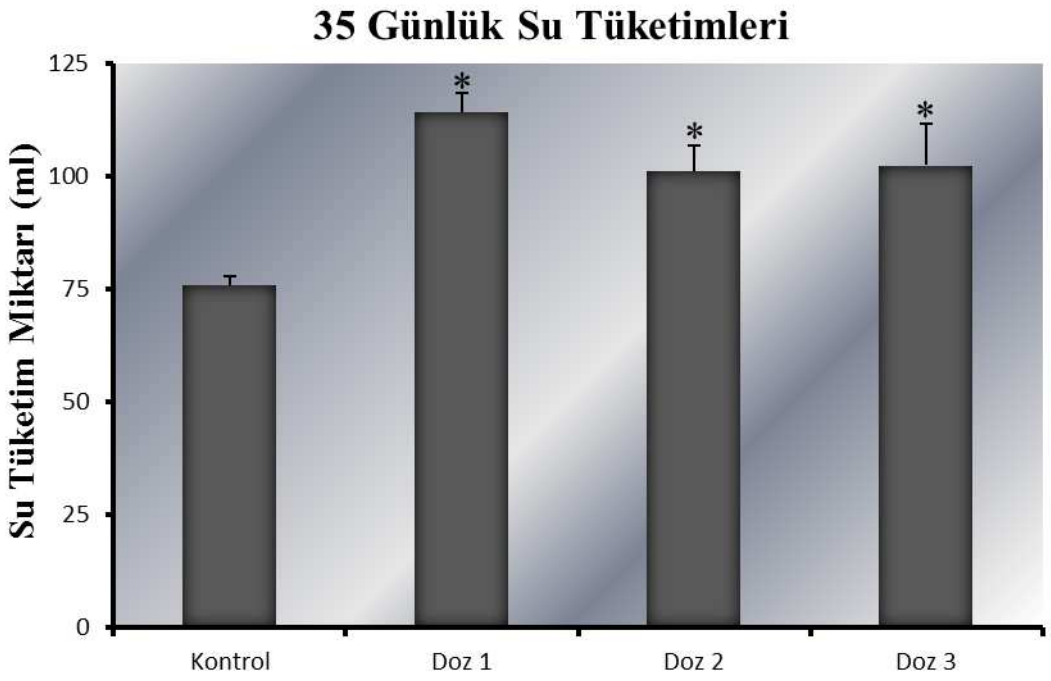
Çizelge 4.3' de görüldüğü üzere Spirulina uygulaması yapılan deneklerin deney süresince günlük su tüketimleri tüm doz gruplarında artmıştır. Deneklerin su tüketimlerinin doz gruplarında karşılaştırılması Şekil 4.2' de verilmiştir. Buna göre, Spirulina uygulaması

yapılan deneklerin su tüketimlerinin kontrol grubuna kıyasla, 1. Doz grubunda % 35; 2. Doz grubunda % 15; 3. Doz grubunda % 17 oranında arttığı görülmüştür. Tüm doz gruplarında görülen bu artış istatiksel olarak da ($p<0.05$) anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının 35 günlük su tüketimleri

Günler	Günlük Ortalama Su Tüketimleri			
	Doz 1 (ml)	Doz 2 (ml)	Doz 3 (ml)	Kontrol Grubu (ml)
1	92.5	97.5	82.5	87.5
2	162.5	92.5	67.5	57.5
3	145	67.5	92.5	80
4	117.5	110	105	75
5	105	122.5	165	82.5
6	180	160	127.5	82.5
7	195	175	87.5	92.5
8	147.5	117.5	55	57.5
9	115	80	107.5	72.5
10	82.5	142.5	137.5	62.5
11	157.5	165	127.5	77.5
12	205	185	112.5	75
13	230	147.5	97.5	77.5
14	247.5	140	107.5	72.5
15	237.5	100	75	75
16	105	65	97.5	60
17	67.5	75	100	60
18	82.5	62.5	105	75
19	57.5	75	60	62.5
20	70	117.5	110	70
21	67.5	85	152.5	35
22	92.5	100	130	70
23	87.5	87.5	117.5	77.5
24	82.5	80	80	70
25	77.5	70	87.5	72.5
26	82.5	82.5	72.5	80
27	77.5	67.5	102.5	75
28	65	82.5	102.5	85
29	65	82.5	97.5	72.5
30	75	75	97.5	77.5
31	77.5	85	92.5	82.5

32	95	77.5	102.5	95
33	90	95	105	82.5
34	95	82.5	112.5	72.5
35	57.5	80	102.5	72.5
ORTALAMA	**114 ± 54.79**	**100.85± 33.72**	**102.13±23.86**	**73.57±11.21**



* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p< 0.05).

Şekil 4.2. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının 35 günlük su tüketimlerinin karşılaştırılması.

4.1.3. Karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal ve sitozolik fraksiyonların protein değerleri

Wistar albino sıçanların karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal ve sitozolik fraksiyonların protein miktarı tayini BSA (sığır serum albumin) standardı kullanılarak Lowry ve ark. (1951) metoduyla yapıldı. Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının karaciğer dokusundan elde edilen mikrozomal ve sitozolik fraksiyonların protein değerleri sırasıyla Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal fraksiyonların protein değerleri

MİKROZOMAL FRAKSİYONLARIN PROTEİN DEĞERLERİ							
Denek No	***Kontrol Grubu** (mg/ml)	**Denek No**	***1. Doz Grubu** (mg/ml)	**Denek No**	***2. Doz Grubu** (mg/ml)	**Denek No**	***3. Doz Grubu** (mg/ml)
K25	17.87	**D1**	17.61	**D9**	22.4	**D17**	27.69
K26	17.5	**D2**	17.85	**D10**	22.97	**D18**	30.07
K27	17.66	**D3**	17.91	**D11**	19.8	**D19**	20.27
K28	22.53	**D4**	31.08	**D12**	27.1	**D20**	29.71
K29	25.22	**D5**	19.64	**D13**	22.66	**D21**	19.87
K30	18.32	**D6**	20.09	**D15**	26.07	**D22**	21.51
K31	22.79	**D7**	23.07	**D16**	29.38	**D23**	28.11
K32	23.15	**D8**	24.11			**D24**	28.56

*Her bir protein değeri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

Çizelge 4.5. Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının karaciğer dokularından elde edilen sitozolik fraksiyonların protein değerleri

SİTOZOLİK FRAKSİYONLARIN PROTEİN DEĞERLERİ							
Denek No	***Kontrol Grubu** (mg/ml)	**Denek No**	***1. Doz Grubu** (mg/ml)	**Denek No**	***2. Doz Grubu** (mg/ml)	**Denek No**	***3. Doz Grubu** (mg/ml)
K25	32.27	**D1**	16.95	**D9**	19.01	**D17**	14.63
K26	14.13	**D2**	17.91	**D10**	23.82	**D18**	22.56
K27	32.57	**D3**	15.41	**D11**	17.66	**D19**	17.44
K28	18.47	**D4**	21.11	**D12**	24.73	**D20**	17.9
K29	19.09	**D5**	21.67	**D13**	14.7	**D21**	16.89
K30	19.55	**D6**	20.13	**D15**	18.86	**D22**	21.65
K31	21.91	**D7**	20.19	**D16**	21.14	**D23**	20.5
K32	21.65	**D8**	17.89			**D24**	18.11

*Her bir protein değeri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

4.1.4. Spirulina'nın sitokrom P450 bağımlı enzim aktiviteleri üzerine etkileri

4.1.4.1. Spirulina'nın kafein N-demetilaz (KND) aktivitesi üzerine etkileri

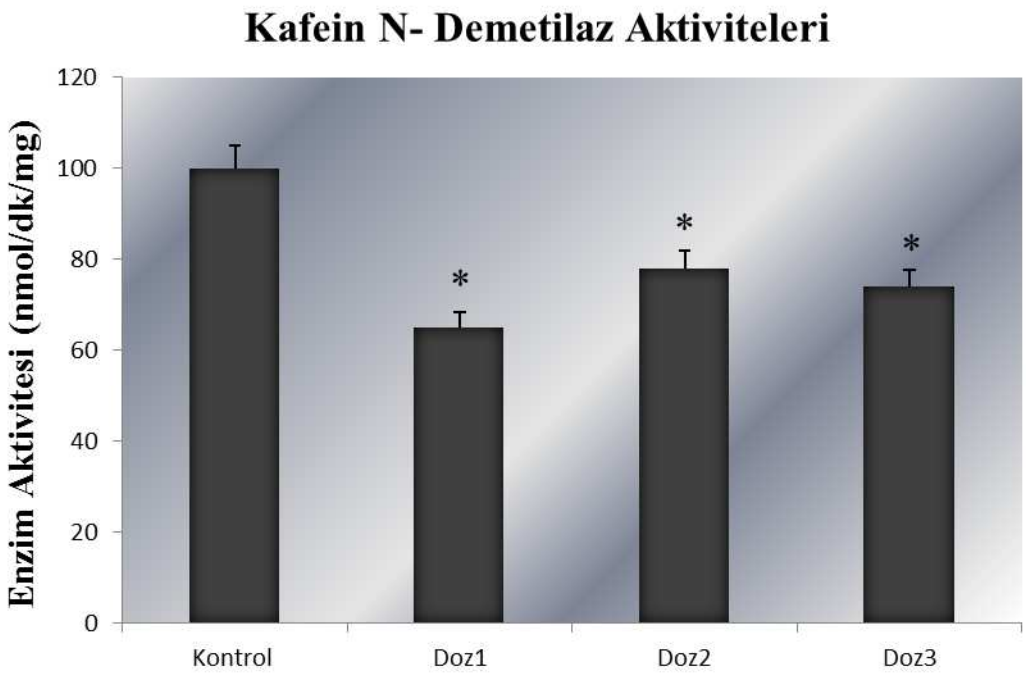
Spirulina doğal preparatı verilen sıçanların karaciğer mikrozomlarında kafein N-demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Farklı dozlarda Spirulina uygulanan doz gruplarında ve kontrol grubundaki her bir sıçan karaciğerinden elde edilen mikrozomal fraksiyonların CYP1A2'ye bağlı kafein N-demetilaz (KND) spesifik aktivite değerleri nmol/dk/protein olarak Çizelge 4.6 'da verilmiştir. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın kafein N-demetilaz aktivitesi üzerine olan etkileri Şekil 4.3' de karşılaştırılmıştır. Buna göre, CYP1A2'ye bağlı KND aktivitesi kontrol grubuyla kıyaslandığında, 1. Doz grubunda % 35; 2. Doz grubunda % 22; 3. Doz grubunda % 26 oranında azalmıştır. Görülen bu azalma, tüm doz grupları için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.6. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku mikrozomlarındaki kafein N-demetilaz spesifik aktiviteleri

KAFEİN N-DEMETİLAZ AKTİVİTELERİ											
KONTROL GRUBU			1. DOZ GRUBU (200 mg/kg)			2. DOZ GRUBU (500 mg/kg)			3. DOZ GRUBU (1000 mg/kg)		
Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite
K25	0.151- 0.169	0.160	D1	0.090 – 0.090	0.09	D9	0.078 - 0.084	0.081	D17	0.090 - 0.096	0.093
K26	0.151 - 0.151	0.151	D2	0.096 - 0 090	0.093	D10	0.109 - 0.121	0.115	D18	0.084 - 0.096	0.090
K27	0.187 - 0.175	0.181	D3	0.090 - 0.090	0.09	D11	0.109 - 0.109	0.109	D19	0.115 - 0.109	0.112
K28	0.121 - 0.133	0.127	D4	0.084 - 0.090	0.087	D12	0.115 - 0.109	0.112	D20	0.090 - 0.109	0.995
K29	0.133 - 0.133	0.127	D5	0.096 - 0.096	0.096	D13	0.096 - 0.096	0.096	D21	0.115 - 0.115	0.115
K30	0.127 - 0.127	0.127	D6	0.096 - 0.096	0.096	D15	0.133 - 0.133	0.133	D22	0.115 - 0.115	0.115
K31	0.133 - 0.121	0.145	D7	0.102- 0.102	0.102	D16	0.139 - 0.139	0.139	D23	0.121 - 0.127	0.124
K32	0.139 - 0.151	0.133	D8	0.096- 0.096	0.096				D24	0.102 - 0.121	0.111
ORT		0.143±0.006	ORT		0.093±0.001	ORT		0.112±0.007	ORT		0.107±0.004

*Ortalama aktivite değerleri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p< 0.05$).

Şekil 4.3. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer mikrozomlarında kafein N- demetilaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki CYP1A2 aktivitelerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.4.2. Spirulina'nın anilin 4-hidroksilaz (ANH) aktivitesi üzerine etkileri

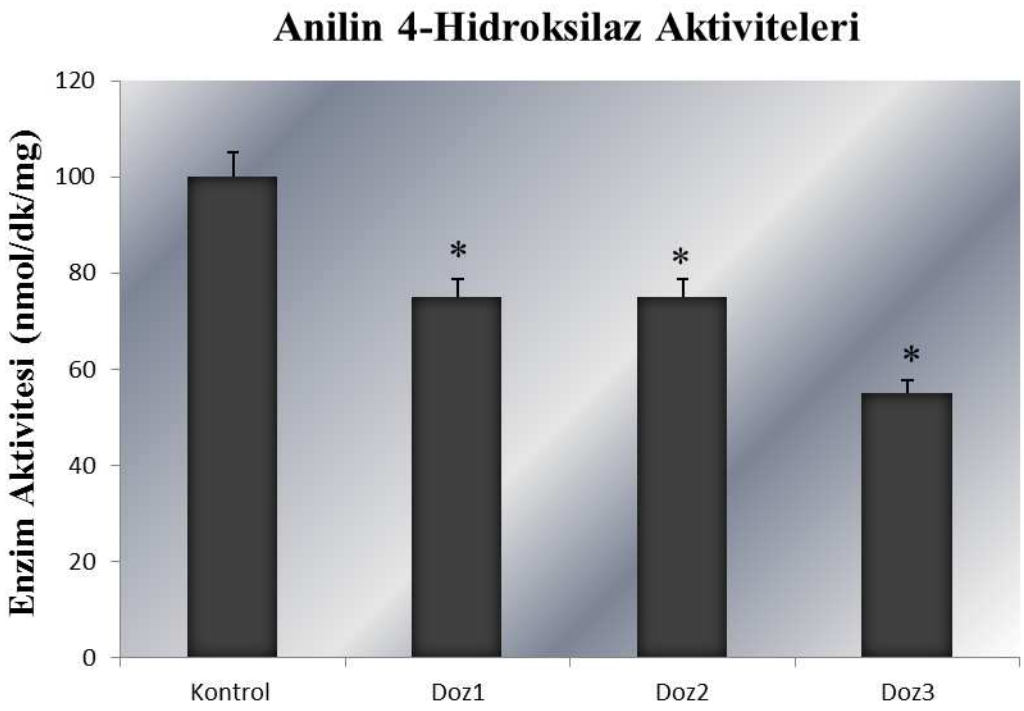
Spirulina doğal preparatı verilen sıçanların karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktivitesi Imai ve ark. (1966) metoduna göre pAP (p-aminophenol)'un miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Spirulina uygulanan doz gruplarında ve kontrol grubundaki her bir sıçan karaciğerinden elde edilen mikrozomal fraksiyonların CYP2E1'e bağlı anilin 4-hidroksilaz (ANH) aktivitedeğerleri nmol/dk/protein olarak Çizelge 4.7' de verilmiştir. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın anilin 4-hidroksilaz aktivitesi üzerine olan etkileri Şekil 4.4' de karşılaştırılmıştır. Buna göre, CYP2E1'e bağlı ANH aktivitesi kontrol grubuyla kıyaslandığında 1. ve 2. Doz grubunda % 25 azalırken, 3. Doz grubunda % 45 azalmıştır. Tüm doz gruplarında görülen bu azalma istatiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.7. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz spesifik aktiviteleri

ANİLİN 4-HİDROKSİLAZ AKTİVİTELERİ												
KONTROL GRUBU			1. DOZ GRUBU (200 mg/kg)			2. DOZ GRUBU (500 mg/kg)			3. DOZ GRUBU (1000 mg/kg)			
Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite
K25	0.328 - 0.333	0.3305	D1	0.250 - 0.264	0.257	D9	0.260 - 0.266	0.263	D17	0.188 - 0.182	0.185
K26	0.240 - 0.257	0.2485	D2	0.224 - 0.228	0.226	D10	0.286 - 0.242	0.264	D18	0.146 - 0.160	0.153
K27	0.413 - 0.420	0.4165	D3	0.151 - 0.144	0.1475	D11	0.237 - 0.228	0.2325	D19	0.100 - 0.111	0.1055
K28	0.260 - 0.273	0.2665	D4	0.235 - 0.246	0.2405	D12	0.240 - 0.215	0.2275	D20	0.155 - 0.168	0.1615
K29	0.308 - 0.320	0.314	D5	0.111 - 0.135	0.123	D13	0.131 - 0.142	0.1365	D21	0.162 - 0.173	0.1675
K30	0.306 - 0.317	0.3115	D6	0.220 - 0.237	0.2285	D15	0.200 - 0.217	0.2085	D22	0.186 - 0.173	0.1795
K31	0.208 - 0.220	0.214	D7	0.284 - 0.302	0.293	D16	0.248 - 0.204	0.226	D23	0.175 - 0.182	0.1785
K32	0.220 - 0.242	0.231	D8	0.237 - 0.248	0.2425				D24	0.155 - 0.168	0.1615
ORT		0.291±0.023	ORT		0.219±0.019	ORT		0.221±0.014	ORT		0.161±0.010

*Ortalama aktivite değerleri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0.05$).

Şekil 4.4. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki CYP2E1 aktivitelerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.4.3. Spirulina'nın eritromisin N-demetilaz (END) aktivitesi üzerine etkileri

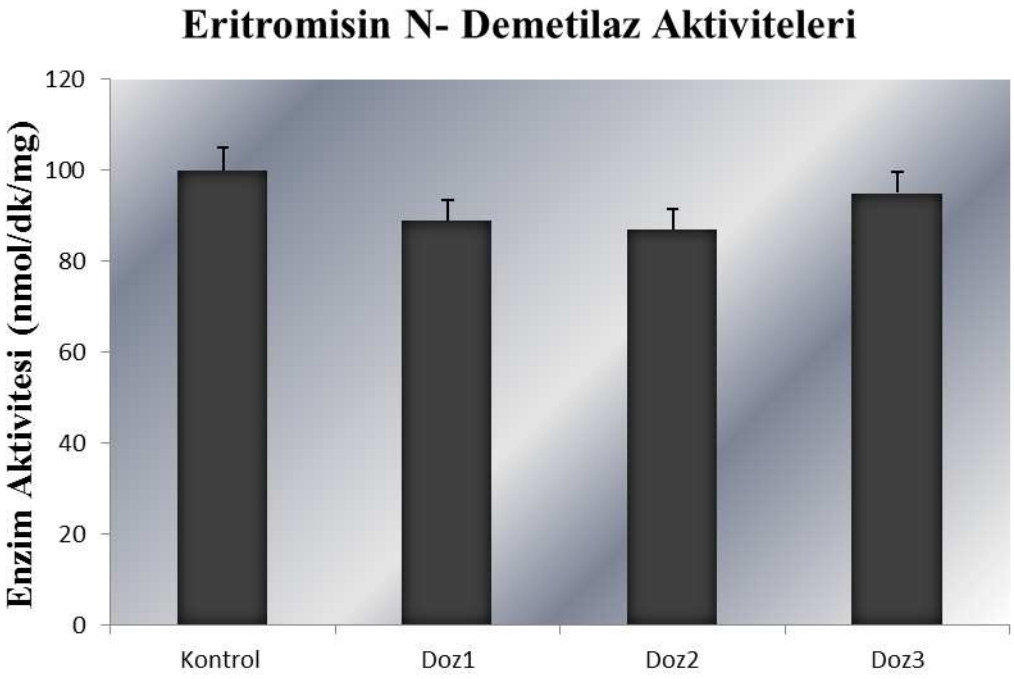
Spirulina doğal preparatı verilen sıçanların karaciğer mikrozomlarında eritromisin N-demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Spirulina uygulanan doz gruplarının ve kontrol grubundaki her bir sıçan karaciğerinden elde edilen mikrozomal fraksiyonların CYP3A1'e bağlı eritromisin N-demetilaz (END) spesifik aktivite değerleri nmol/dk/protein olarak Çizelge 4.8' de verilmiştir. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın eritromisin N-demetilaz aktivitesi üzerine olan etkileri Şekil 4.5' de karşılaştırılmıştır. CYP3A1'e bağlı END aktiviteleri için tüm doz gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Çizelge 4.8. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku mikrozomlarındaki eritromisin N-demetilaz spesifik aktiviteleri

ERİTROMİSİN N-DEMETİLAZ AKTİVİTELERİ											
KONTROL GRUBU			1. DOZ GRUBU (200 mg/kg)			2. DOZ GRUBU (500 mg/kg)			3. DOZ GRUBU (1000 mg/kg)		
Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite	Denek No	Aktivite (nmol/dk/mg)	*Ortalama Aktivite
K25	0.084 - 0.090	0.09	D1	0.066 - 0.066	0.066	D9	0.048 - 0.036	0.042	D17	0.066 - 0.054	0.06
K26	0.048 - 0.054	0.054	D2	0.054 - 0.042	0.048	D10	0.060 - 0.060	0.06	D18	0.060 - 0.066	0.063
K27	0.078 - 0.078	0.078	D3	0.060 - 0.060	0.060	D11	0.060 - 0.066	0.063	D19	0.054 - 0.048	0.051
K28	0.048 - 0.048	0.048	D4	0.072 - 0.066	0.069	D12	0.060 - 0.048	0.054	D20	0.066 - 0.048	0.057
K29	0.048 - 0.054	0.054	D5	0.036 - 0.042	0.039	D13	0.048 - 0.054	0.051	D21	0.048 - 0.054	0.051
K30	0.084 - 0.078	0.081	D6	0.078 - 0.066	0.072	D15	0.054 - 0.048	0.051	D22	0.054 - 0.048	0.051
K31	0.054 - 0.060	0.06	D7	0.060 - 0.042	0.051	D16	0.066 - 0.078	0.072	D23	0.078 - 0.090	0.084
K32	0.066 - 0.054	0.054	D8	0.054 - 0.060	0.057				D24	0.072 – 0.072	0.072
ORT		0.064±0.005	ORT		0.057±0.003	ORT		0.056±0.003	ORT		0.061±0.004

*Ortalama aktivite değerleri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.5. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer mikrozomlarında eritromisin N- demetilaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki CYP3A1 aktivitelerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.5. Spirulina' nın GST enzim aktiviteleri üzerine etkileri

4.1.5.1. Spirulina' nın total GST aktivitesi üzerine etkileri

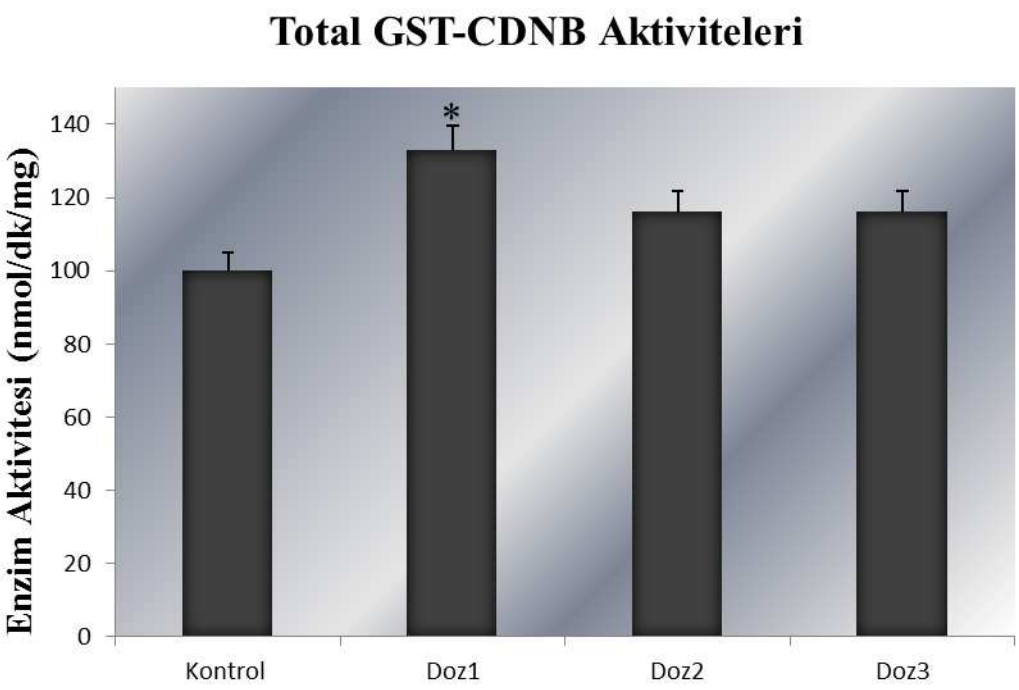
Spirulina doğal preparatı verilen sıçanların karaciğer sitozolik fraksiyonlarda, total Glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı ile, Habig ve ark. (1974) spektrofotometrik metodundan uyarlanan Şen ve Kırıkbakan'ın optimize ettiği şartlar kullanılarak belirlendi.

Spirulina doğal preparatı verilen doz gruplarında ve kontrol grubundaki her bir sıçan karaciğerinden elde edilen sitozolik fraksiyonların total GST-CDNB aktivite değerleri nmol/dk/protein olarak Çizelge 4.9' da verilmiştir. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın total GST-CDNB aktivitesi üzerine olan etkileri Şekil 4.6' da karşılaştırılmıştır. Buna göre, total GST- CDNB aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla 1. Doz grubunda % 33 oranında bir artış görülmüştür. Görülen bu artış istatiksel olarak anlamlı iken ($p < 0.05$), 2. ve 3. Doz gruplarında bu şekilde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Çizelge 4.9. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku sitozollerinde total GST-CDNB aktiviteleri

TOTAL GST-CDNB AKTİVİTELERİ							
KONTROL GRUBU		**1. DOZ GRUBU (200 mg/kg)**		**2. DOZ GRUBU (500 mg/kg)**		**3. DOZ GRUBU (1000 mg/kg)**	
Denek No	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**
K25	182.29	**D1**	429.68	**D9**	312.5	**D17**	416.66
K26	372.02	**D2**	390.68	**D10**	255.68	**D18**	284.09
K27	169.27	**D3**	431.54	**D11**	390.62	**D19**	338.54
K28	370.37	**D4**	291.66	**D12**	286.45	**D20**	351.56
K29	277.77	**D5**	431.54	**D13**	401.78	**D21**	351.56
K30	312.5	**D6**	291.66	**D15**	358.79	**D22**	291.66
K31	333.33	**D7**	390.68	**D16**	343.75	**D23**	322.91
K32	291.66	**D8**	429.68			**D24**	335.64
ORT	**288.65±27.34**	**ORT**	**385.88±21.46**	**ORT**	**335.65±20.32**	**ORT**	**336.58±14.53**

*Ortalama aktivite değerleri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p< 0.05).

Şekil 4.6. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer sitozollerinde total GST- CDNB aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki total GST aktivitelerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.5.2. Spirulina' nın GST Mu aktivitesi üzerine etkileri

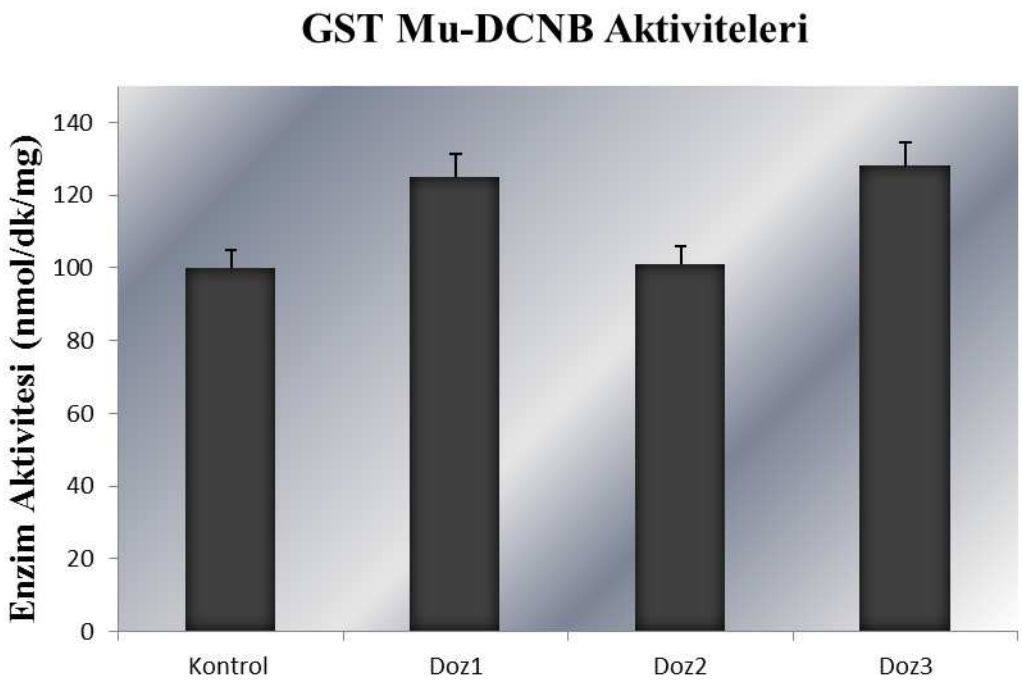
Spirulina doğal preparatı verilen sıçanların karaciğer sitozolik fraksiyonlarında GST Mu aktivitesi, 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) substratı ile, Habig ve ark. (1974) spektrofotometrik metodundan uyarlanan, Şen ve Kırıkbakan'ın optimize ettiği şartlar kullanılarak belirlendi.

Spirulina doğal preparatı verilen doz gruplarında ve kontrol grubundaki her bir sıçan karaciğerinden elde edilen sitozolik fraksiyonların GST Mu-DCNB aktivite değerleri nmol/dk/protein olarak Çizelge 4.10' da verilmiştir. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın GST Mu-DCNB aktivitesi üzerine olan etkileri ise Şekil 4.7' de karşılaştırılmıştır. GST Mu-DCNB aktiviteleri için, tüm doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Çizelge 4.10. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku sitozollerinde GST Mu-DCNB aktiviteleri

GST Mu-DCNB AKTİVİTELERİ							
KONTROL GRUBU		**1. DOZ GRUBU (200 mg/kg)**		**2. DOZ GRUBU (500 mg/kg)**		**3. DOZ GRUBU (1000 mg/kg)**	
Denek No	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**
K25	1.31	**D1**	1.66	**D9**	3.21	**D17**	1.93
K26	2.34	**D2**	2.36	**D10**	1.58	**D18**	1.46
K27	1.99	**D3**	4.58	**D11**	2.41	**D19**	2.96
K28	2.8	**D4**	2.82	**D12**	1.33	**D20**	4.73
K29	2.46	**D5**	1.66	**D13**	3.52	**D21**	2.78
K30	2.16	**D6**	2.82	**D15**	1.74	**D22**	2.6
K31	2.79	**D7**	4.58	**D16**	2.45	**D23**	3.67
K32	2.39	**D8**	2.36			**D24**	3.64
ORT	**2.28±0.16**	**ORT**	**2.85±0.40**	**ORT**	**2.32±0.31**	**ORT**	**2.97±0.36**

*Ortalama aktivite değerleri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.7. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer sitozollerinde GST Mu-DCNB aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki GST Mu aktivitelerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.5.3. Spirulina' nın GST Pi aktivitesi üzerine etkileri

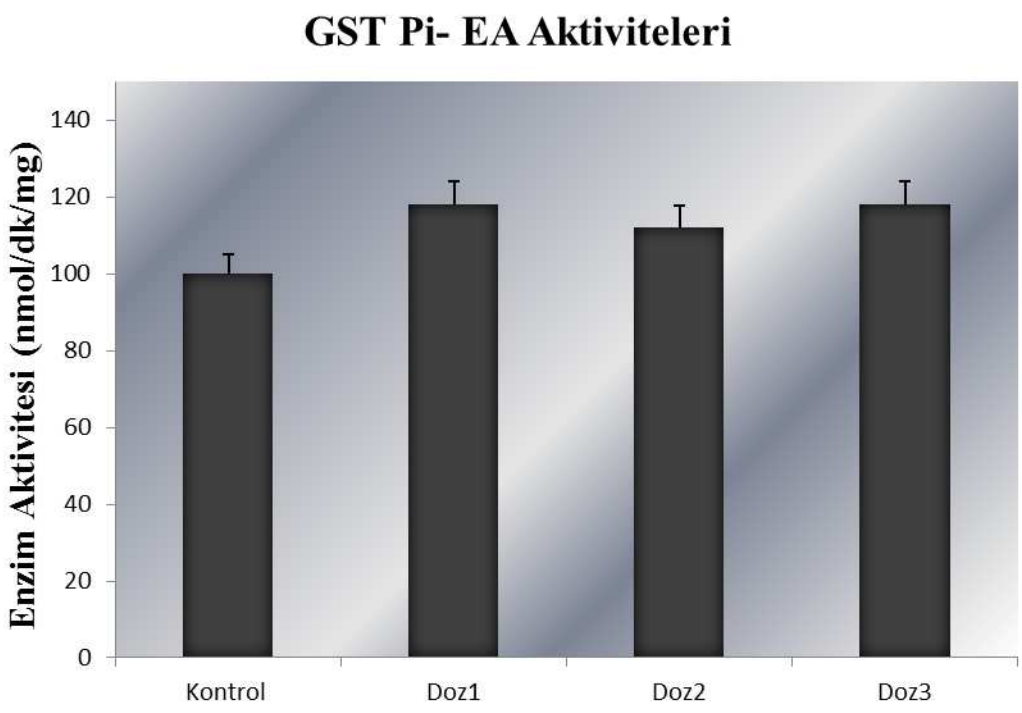
Spirulina doğal preparatı verilen sıçanların karaciğer sitozolik fraksiyonlarında GST Pi aktivitesi, etakrinik asit (EA) substratı ile, Habig ve arkadaşlarının (1974) spektrofotometrik metodundan uyarlanan Şen ve Kırıkbakan'ın optimize ettiği şartlar kullanılarak belirlendi.

Spirulina doğal preparatı verilen doz gruplarında ve kontrol grubundaki her bir sıçan karaciğerinden elde edilen sitozolik fraksiyonların GST Pi-EA aktivite değerleri nmol/dk/protein olarak Çizelge 4.11' de verilmiştir. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın GST Pi-EA aktivitesi üzerine olan etkileri Şekil 4.8' de karşılaştırılmıştır. GST Pi-EA aktiviteleri için tüm doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Çizelge 4.11. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku sitozollerinde GST Pi-EA aktiviteleri

GST Pi-EA AKTİVİTELERİ							
KONTROL GRUBU		**1. DOZ GRUBU (200 mg/kg)**		**2. DOZ GRUBU (500 mg/kg)**		**3. DOZ GRUBU (1000 mg/kg)**	
Denek No	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**	**Denek No**	***Ortalama Aktivite (nmol/dk/mg)**
K25	27.32	**D1**	54.76	**D9**	46.31	**D17**	54.79
K26	69.71	**D2**	47.19	**D10**	42.01	**D18**	42.85
K27	28.39	**D3**	54.54	**D11**	52.27	**D19**	66.66
K28	45.65	**D4**	37.03	**D12**	39.02	**D20**	42.69
K29	44.21	**D5**	47.19	**D13**	54.79	**D21**	52.38
K30	41.23	**D6**	54.54	**D15**	46.8	**D22**	48.14
K31	44.03	**D7**	37.03	**D16**	40	**D23**	39.21
K32	44.44	**D8**	54.76			**D24**	40
ORT	**40.80±2.99**	**ORT**	**48.38±2.73**	**ORT**	**45.88±2.27**	**ORT**	**48.34±3.29**

*Ortalama aktivite değerleri, en az duplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



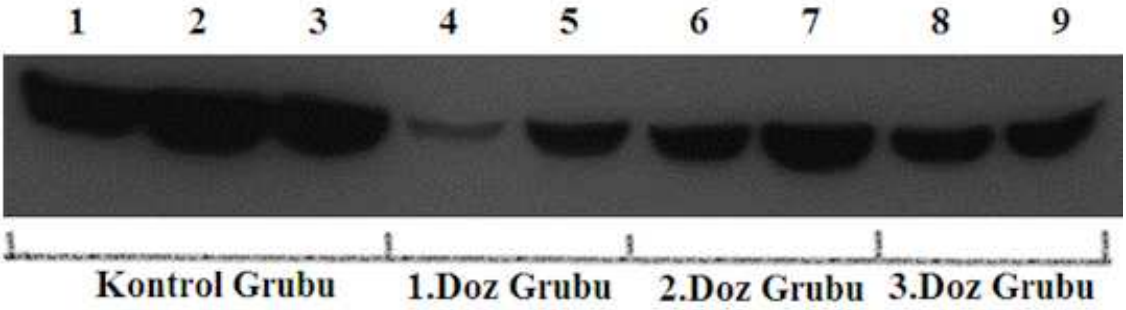
Şekil 4.8. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer sitozollerinde GST Pi-EA aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki GST Pi aktivitelerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.6. Spirulina'nın sitokrom P450 izozimlerinin protein düzeyinde ekspresyonları üzerine etkileri

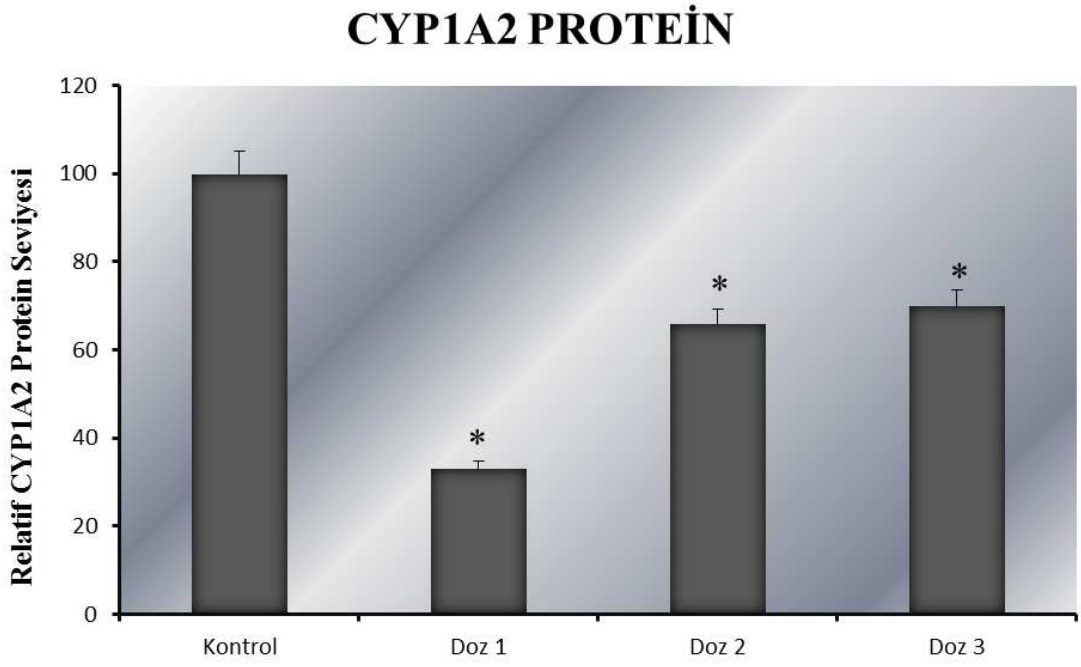
Çalışmada 5 hafta süreyle (35 gün) 3 farklı dozda Spirulina uygulanan sıçanların karaciğerinden elde edilen mikrozomal fraksiyonlarda, Spirulina' nın sitokrom P450 izozimlerinin protein ekspresyon düzeylerine olan etkileri spesifik primer antikorlar kullanılarak Western blot metodu ile belirlendi.

4.1.6.1. Spirulina' nın CYP1A2 izoziminin protein düzeyinde ekspresyonu üzerine etkileri

Spirulina'nın CYP1A2 protein seviyesine olan etkisi Şekil 4.9' da verilmektedir. Protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda Spirulina' nın CYP1A2 izoziminin protein seviyesini kontrol grubuna kıyasla 1. Doz grubunda % 67; 2. Doz grubunda % 30; 3. Doz grubunda ise % 44 oranında baskıladığı görülmüştür (Şekil 4.10). Görülen bu farklılık istatiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p< 0.05$).



Şekil 4.9. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın CYP1A2 izoziminin protein düzeyine olan etkileri. Hat 1-3: Kontrol grubu, hat 4-5: 1. Doz (200 mg/kg), hat 6-7: 2. Doz (500 mg/kg), hat 8-9: 3. Doz (1000 mg/kg).

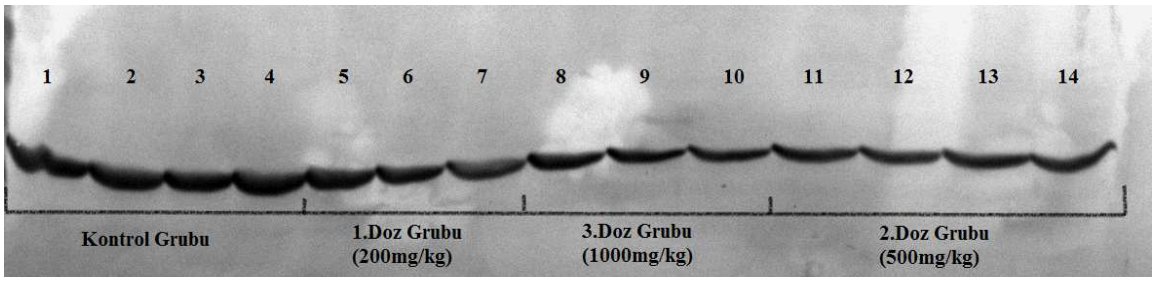


*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

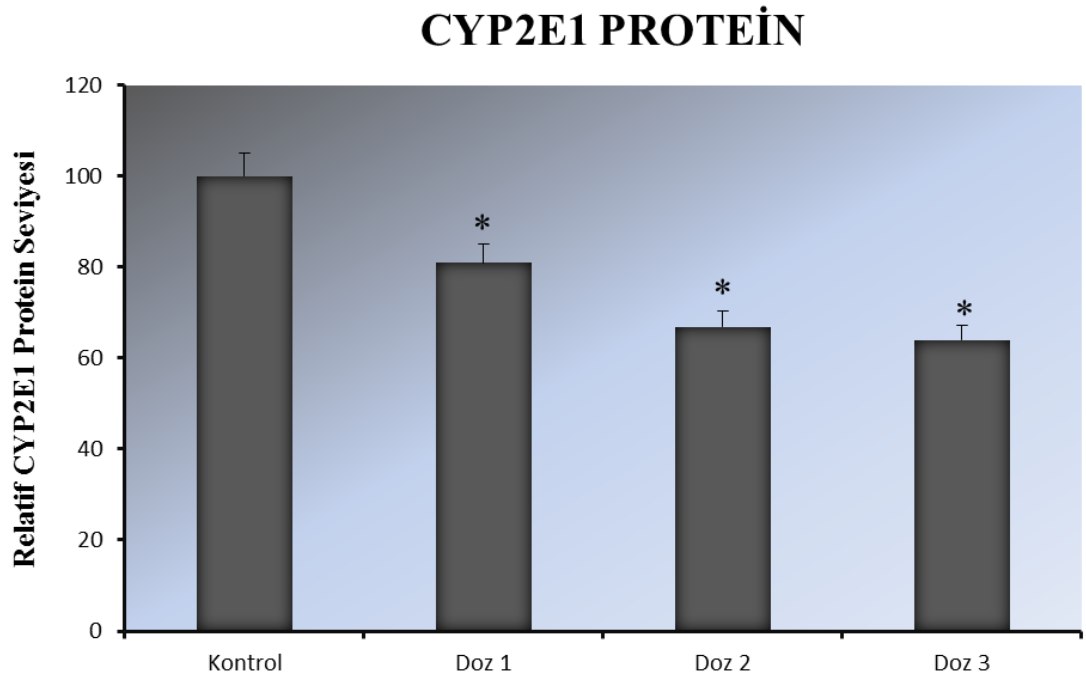
Şekil 4.10. Spirulina'nın CYP1A2 izoziminin protein düzeyine olan etkilerinin karşılaştırılması. Bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Veriler iki kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir. Kontrol grubunda bulunan tüm bantların densitometrik analizlerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.6.2. Spirulina'nın CYP2E1 izoziminin protein düzeyinde ekspresyonu üzerine etkileri

Değişik konsantrasyonlarda uygulanan Spirulina'nın sıçan karaciğer mikrozomal fraksiyonlarda bulunan CYP2E1 protein seviyesi üzerine olan etkisi Western Blot analizi ile belirlendi (Şekil 4.11). Protein bantlarının densitometrik analiz sonuçlarına göre Spirulina'nın CYP2E1 izoziminin protein seviyesini kontrol grubuna kıyasla 1. Doz grubunda % 19; 2. ve 3. Doz gruplarında ortalama % 35 oranında baskıladığı görülmüştür (Şekil 4.12). Uygulama grupları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında görülen bu farklılık istatiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.11. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın CYP2E1 izoziminin protein düzeyine olan etkileri. Hat 1-4: Kontrol grubu, hat 5-7: 1. Doz (200 mg/kg), hat 8-10: 3. Doz (1000 mg/kg), hat11-14: 2. Doz (500 mg/kg).

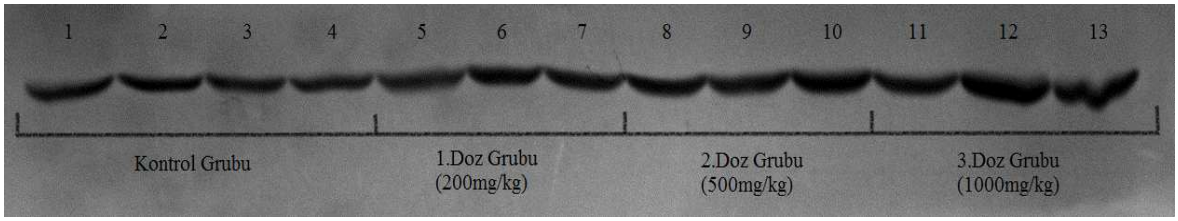


*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

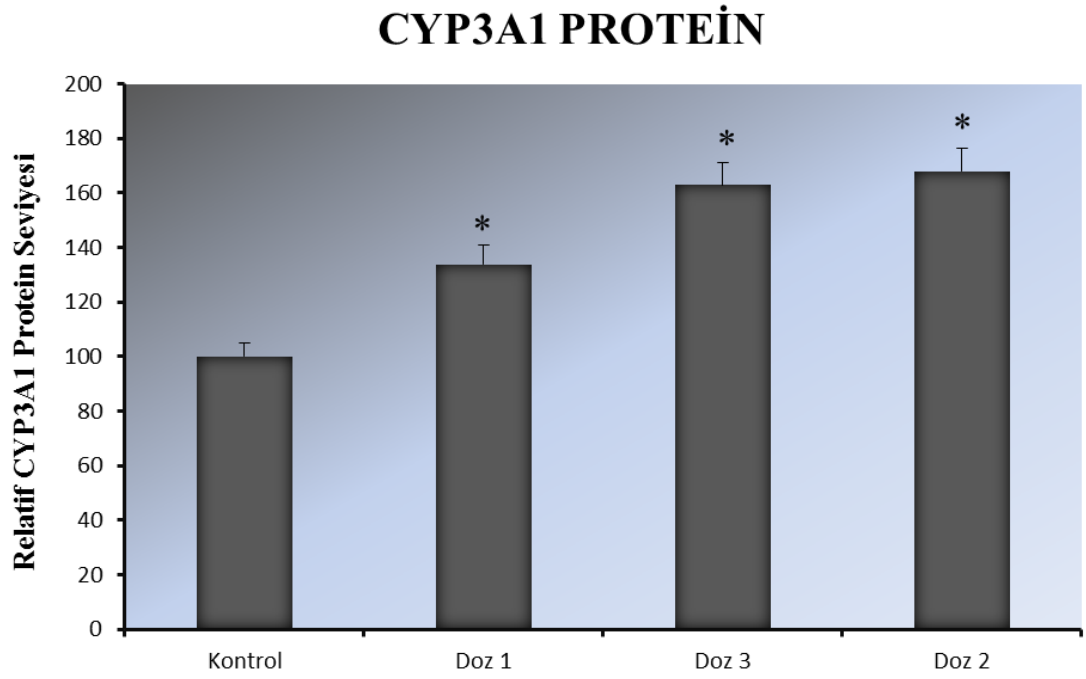
Şekil 4.12. Spirulina'nın CYP2E1 izoziminin protein düzeyine olan etkilerinin karşılaştırılması. Bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Veriler iki kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir. Kontrol grubunda bulunan tüm bantların densitometrik analizlerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

4.1.6.3. Spirulina' nın CYP3A1 izoziminin protein düzeyinde ekspresyonu üzerine etkileri

Spirulina uygulamasının CYP3A1 izozimi protein seviyesini tüm doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Protein bantlarının densitometrik analiz sonuçlarına göre Spirulina'nın CYP3A1 izoziminin protein seviyesini kontrol grubuna kıyasla 1. Doz grubunda % 34; 2. Doz grubunda % 63; 3. Doz grubunda ise % 68 artırdığı görülmüştür (Şekil 4.14). Uygulama grupları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında görülen bu farklılık istatiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.13. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın CYP3A1 izoziminin protein düzeyine olan etkileri. Hat 1-4: Kontrol grubu, hat 5-7: 1. Doz (200 mg/kg), hat 8-10: 2. Doz (500 mg/kg), hat 11-13: 3. Doz (1000 mg/kg).



*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

Şekil 4.14. Spirulina'nın CYP3A1 izoziminin protein düzeyine olan etkilerinin karşılaştırılması. Bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Veriler iki kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir. Kontrol grubunda bulunan tüm bantların densitometrik analizlerinin ortalama değerleri % 100 olarak kabul edildi. Doz grupları için hesaplanan değerler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi gösterecek şekilde ifade edilmiştir.

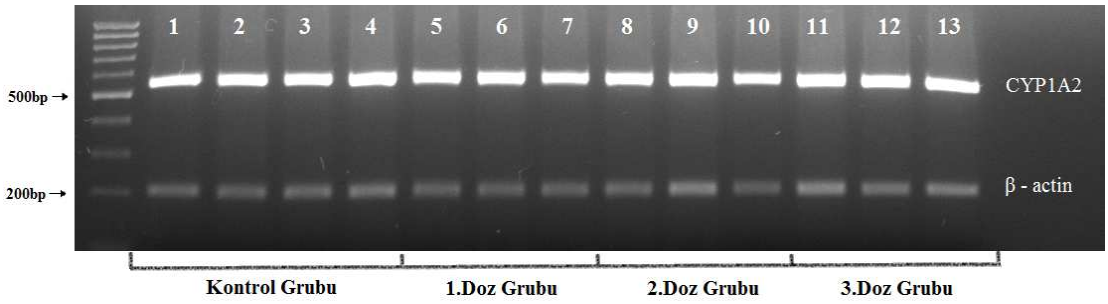
4.1.7. Spirulina'nın mRNA seviyesinde sitokrom P450 izozimlerinin ekspresyonları üzerine etkileri

Spirulina'nın sitokrom P450 izozimlerinden CYP1A2, CYP2E1, CYP3A1'in gen ifadeleri düzeylerine etkileri uygun primer dizileri kullanılarak yarı kantitatif PZR yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla ilk önce tüm izozimler için amplifikasyon sırasında kullanılacak olan döngü sayısı ve yapışma sıcaklığı için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

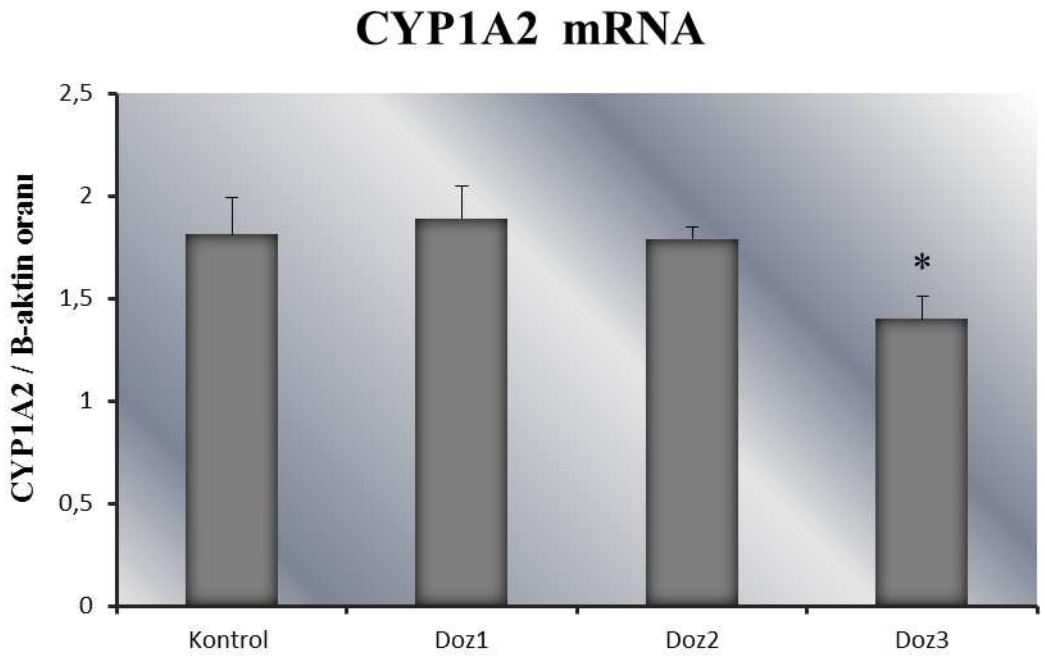
4.1.7.1. Spirulina'nın mRNA seviyesinde CYP1A2 izoziminin ekspresyonu üzerine etkileri

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu CYP1A2 izozimi için amplifikasyon sırasında kullanılan döngü sayısı ve yapışma sıcaklığı 27 döngü ve 55 °C olarak belirlendi.

Spirulina'nın sıçan karaciğer CYP1A2 izoziminin mRNA seviyesi üzerine olan etkisine baktığımızda, 1. ve 2. Doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla herhangi bir farklılık görülmezken, 3. Doz grubunda bir azalış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Bantların densitometrik analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.16), Spirulina CYP1A2 izoziminin mRNA seviyesini kontrol grubuna kıyasla 1. ve 2. Doz grubunda değiştirmezken, 3. Doz grubunda % 23 oranında azaltmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.15. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP1A2 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkileri. PZR ürünleri (10 µl CYP1A2 + 10 µl β-aktin) % 2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR reaksiyonu sonucunda CYP1A2 için 542 bp, β-aktin için 220 bp uzunluğunda bantlar elde edildi. Hat 1-4: Kontrol grubu, hat 5-7: 1. Doz (200 mg/kg), hat 8-10: 2. Doz (500 mg/kg), hat11-13: 3. Doz (1000 mg/kg).

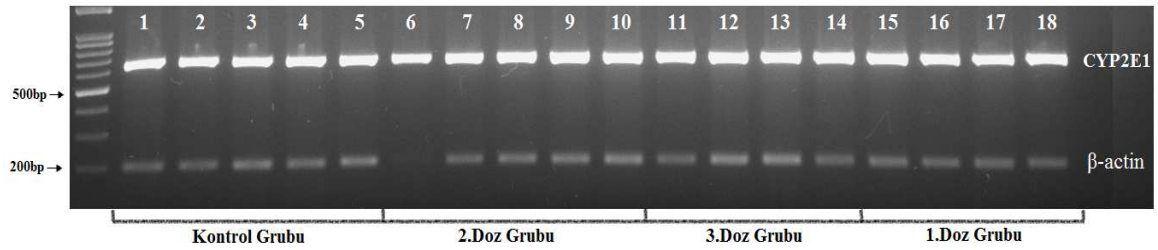


*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

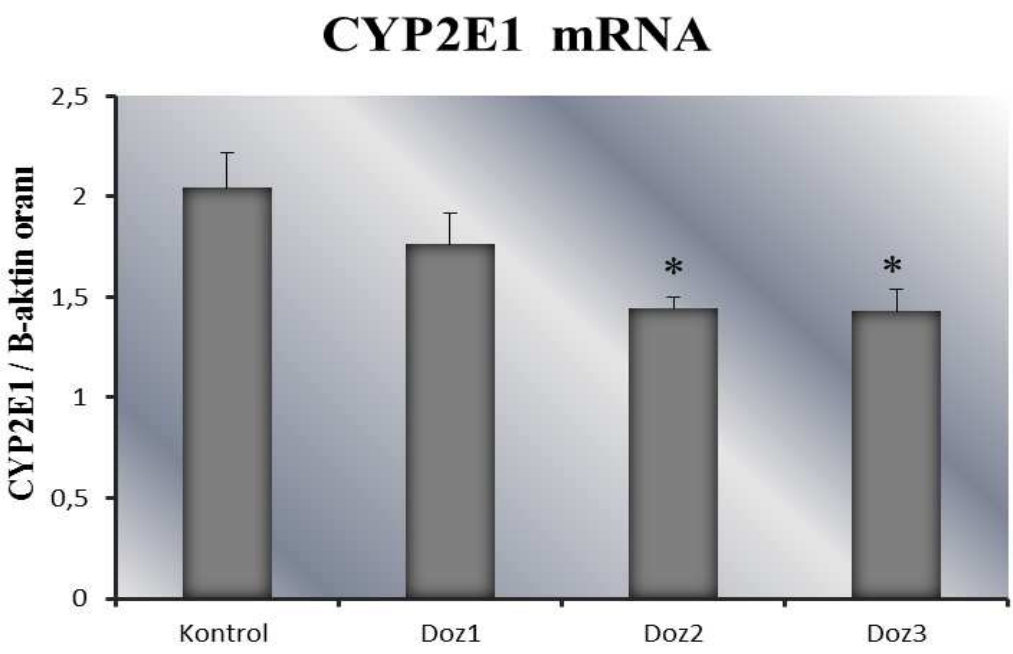
Şekil 4.16. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP1A2 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkisinin uygulama grupları ve kontrol arasında karşılaştırılması. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve β-aktin (housekeeping gen) ile normalize edildi. Veriler iki kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir.

4.1.7.2. Spirulina'nın mRNA seviyesinde CYP2E1 izoziminin ekspresyonu üzerine etkileri

CYP2E1 izozimi için amplifikasyon sırasında kullanılan döngü sayısı ve yapışma sıcaklığı 25 döngü ve 58 °C olarak belirlendi. Spirulina'nın sıçan karaciğer CYP2E1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine olan etkisine baktığımızda, 1.Doz grubunda bir farklılık görülmezken, 2. ve 3. Doz gruplarında azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.17). Bantların densitometrik analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.18) Spirulina, CYP2E1 izoziminin mRNA seviyesini kontrol grubuna kıyasla 1. Doz grubunda değiştirmezken, 2. ve 3. Doz gruplarının her ikisinde de % 30 oranında azaltmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.17. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP2E1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkileri. PZR ürünleri (10 µl CYP2E1 + 10 µlβ-aktin) % 2' lik agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR reaksiyonu sonucunda CYP2E1 için 628 bp, β-aktin için 220 bp uzunluğunda bantlar elde edildi. Hat 1-5: Kontrol grubu, hat 6-10: 2. Doz (500 mg/kg), hat 11-14: 3. Doz (1000 mg/kg), hat15-18: 1. Doz (200 mg/kg).

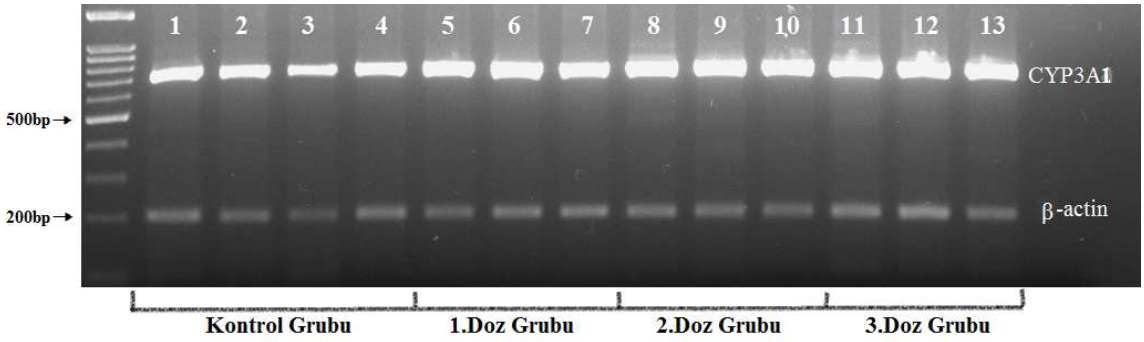


*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

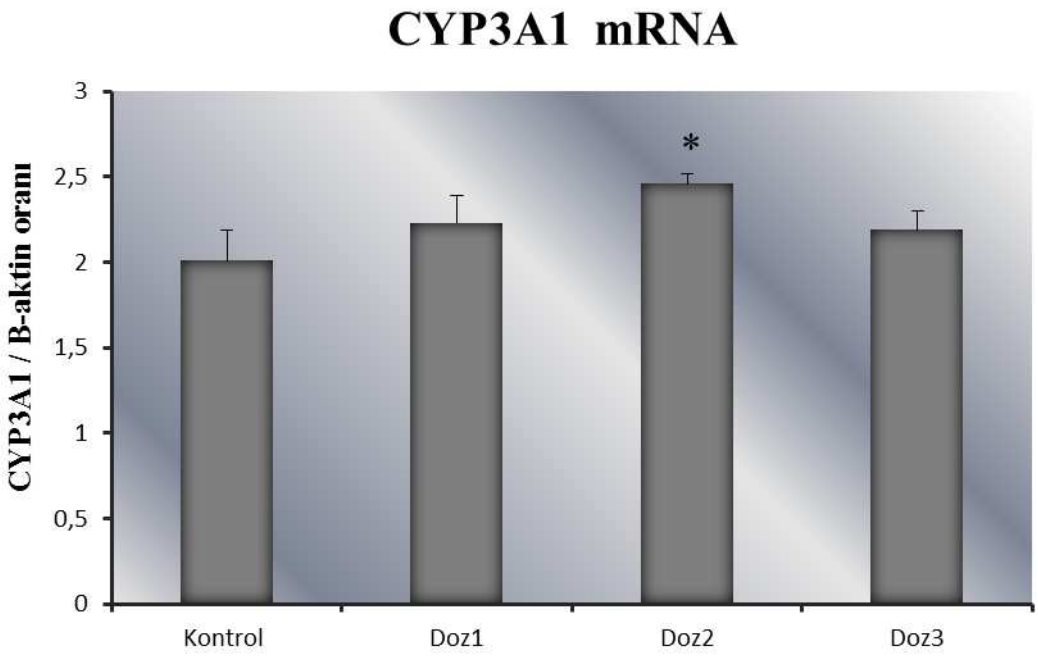
Şekil 4.18. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP2E1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkisinin uygulama grupları ve kontrol arasında karşılaştırılması. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve β-aktin (housekeeping gen) ile normalize edildi. Veriler iki kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir.

4.1.7.3. Spirulina'nın mRNA seviyesinde CYP3A1 izoziminin ekspresyonu üzerine etkileri

CYP3A1 izozimi için amplifikasyon sırasında kullanılan döngü sayısı ve yapışma sıcaklığı 28 döngü ve 55°C olarak belirlendi. Spirulina'nın sıçan karaciğer CYP3A1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine olan etkisine baktığımızda, 1. ve 3. Doz gruplarında önemli bir farklılık görülmezken, 2. Doz grubunda bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19). Bantların densitometrik analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.20), Spirulina CYP3A1 izoziminin mRNA seviyesini kontrol grubuna kıyasla 1. ve 3. Doz grubunda değiştirmezken, 2. Doz grubunda % 22 oranında arttırmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.19. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP3A1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkileri. PZR ürünleri (10 µl CYP3A1 + 10 µl β-aktin) % 2' lik agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR reaksiyonu sonucunda CYP3A1 için 702 bp, β-aktin için 220 bp uzunluğunda bantlar elde edildi. Hat 1-4: Kontrol grubu, hat 5-7: 1. Doz (200 mg/kg), hat 8-10: 2. Doz (500 mg/kg), hat11-13: 3. Doz (1000 mg/kg).



*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

Şekil 4.20. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP3A1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkisinin uygulama grupları ve kontrol arasında karşılaştırılması. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve β-aktin (housekeeping gen) ile normalize edildi. Veriler iki kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir.

4.2. Tartışma

Son zamanlarda içeriğinde çok çeşitli aktif fitokimyasal bulunan doğal kaynaklı bitkisel preparatlar dünya genelinde pek çok birey tarafından tercih edilmektedir. Bireylerin yaşam standartlarını artırmaları amacıyla alternatif olarak kullanılan bu preparatlar aynı zamanda rutin ilaç kullanan farklı hasta grupları tarafından destekleyici ve tamamlayıcı amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Gerek medyada gerekse web sitelerinde üretici firmalar tarafından yapılan reklamlar, reçetesiz olarak piyasada bulunan bu preparatlara ilgiyi artırmaktadır.

Bahsedilen preparatlardan biri olan Spirulina doğal preparatı, içeriğinde bulunan zengin besin maddeleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilen bir üründür. Bu ürün üzerine yapılan klinik ve *in vivo-in vitro* çalışmaların her geçen gün artmasıyla da Spirulina' nın birçok terapötik özelliği ortaya çıkarılmaktadır. Bu zamana kadar yapılan klinik araştırmalarla, Spirulina'nın viral ve kardiyovasküler hastalıkların, hipergliseminin, hiperlipideminin ve bağışıklık sistemi yetersizliği tedavisinde son derece etkili olduğu gösterilmiştir (Karkos ve ark., 2011). Ayrıca, Spirulina' nın günümüzün en yaygın hastalığı haline gelen kansere karşı koruyucu, önleyici ve tedavi edici olduğunu gösteren klinik ve *in vivo* çalışmalarda mevcuttur (Dasgupta ve ark., 2001; Mathew ve ark., 1995; Mishima ve ark., 1998). Son dönemlerde ise, ilaç ve kimyasalların neden olduğu doku hasarlarında Spirulina' nın koruyucu ve iyileştirici etkilerini göstermeye yönelik *in vivo* hayvan deneyleri artarak devam etmektedir.

Bahsedildiği üzere, literatürde yer alan çalışmaların büyük kısmı Spirulina' nın rutin ilaç alan hastalarda tedaviyi destekleyici ve tamamlayıcı olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra bazı çalışmalar da, ilaç kullanımına bağlı ya da kimyasal maruziyetler sonucu oluşan doku hasarlarında Spirulina' nın koruyucu ve iyileştirici amaçlı kullanılmasını tavsiye etmektedir. Ancak, doğal preparatların yapısında bulunan pek çok fitokimyasalın, ilaçların ve günlük hayatta maruz kaldığımız kimyasalların matabolizmasında, dolayısıyla vücuttan eleminasyonunda aktif rol oynayan sitokrom P450 enzimlerinin aktivite ve ifade düzeylerini değiştirdiği bilimsel bir gerçektir. Bu değişiklikler kısa vadede ciddi ilaç yan etkileri, ilaç cevabına yetersizlikler, toksik reaksiyonlar oluşturabileceği gibi, uzun vadede de kimyasalların aktivasyon/deaktivasyon dengesini değiştireceğinden kimyasal karsinojenez, ağır doku tahribatı gibi oldukça ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Buna rağmen, Spirulina' nın ilaç ve kimyasal metabolizmasında önemli role sahip sitokrom P450 ve GST izozimleri üzerine etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında,

Spirulina'nın, birçok toksik ve karsinojenik kimyasalın bununla beraber binlerce ilaç maddesinin metabolizmasında aktif rol oynayan 3 çeşit sitokrom P450 izoziminin - CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4- aktivite/ekspresyon düzeyine etkileri ile total GST, GST Mu ve GST Pi aktiviteleri üzerine etkileri ilk defa aydınlatılmıştır.

Spirulina'nın içeriğinde yüksek oranda bulunan aktif fitokimyasallardan bazılarının sitokrom P450 ve GST enzimlerinin aktivitesinde değişiklikler meydana getirdiği bilinmektedir (Bray ve ark., 2001; Clarke ve ark., 2009; Farooq ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2005; Miranda ve Chhabra, 1981; Sangeetha ve Baskaran, 2010; Vadiraja ve ark., 1998). Fakat bu veriler, insanlar tarafından bütün olarak alınan Spirulina biyokütlesinin olası etkilerini ortaya koymak için yeterli değildir. Bu çalışmada, Spirulina'nın içeriğindeki aktif bileşenlerden ziyade, Spirulina biyokütlesinin olduğu gibi alındığındaki etkiler değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım iki nedenden dolayı önemlidir: Birincisi, insanların Spirulina preparatının bileşenlerini izole halde değil bir bütün halinde almaları; ikincisi ise, tek tek alındıklarında farklı etkiye sahip olan fitokimyasalların, bir arada karışım halinde alındıklarında antagonistik ve sinerjistik olarak çok farklı etkileşimler gösterebilmesidir. Dolayısıyla, bu çalışmadan elde edilen veriler, Spirulina preparatıyla eş zamanlı olarak alınan klinik ilaçlar arasındaki potansiyel etkileşimlerin en aza indirgenmesi açısından önem taşımaktadır.

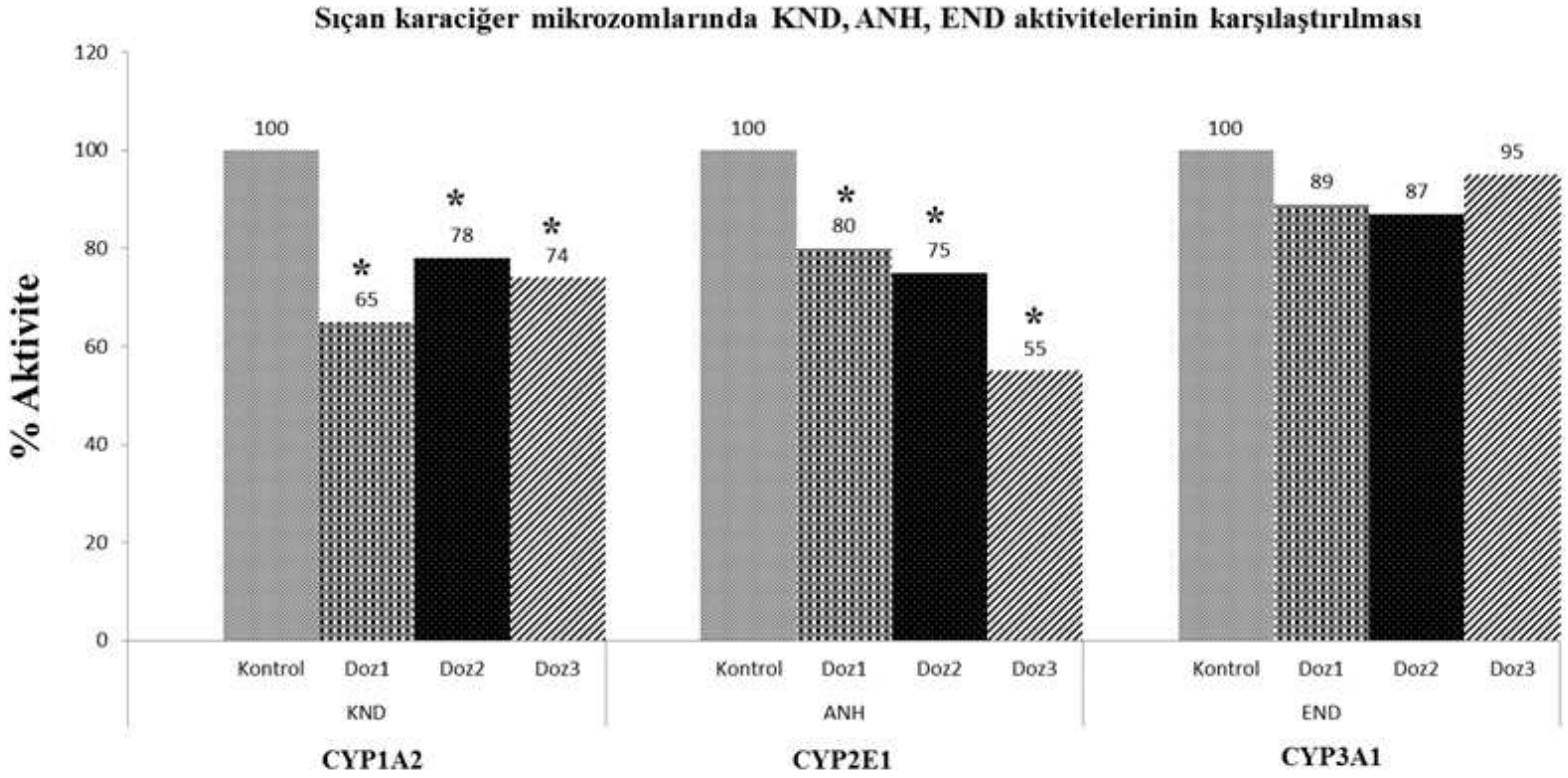
Tez çalışmasında CYP1A2 izozimi için elde edilen verilere bakıldığında, Spirulina uygulaması yapılan 1. ve 2. Doz gruplarının karaciğer dokusu mRNA verilerinde anlamlı bir değişiklik görülmezken, 3. Doz grubunda (en yüksek doz) CYP1A2 mRNA seviyesi kontrol grubuna kıyasla % 23 oranında azalmıştır. CYP1A2 izoziminin protein düzeyine baktığımızda ise, tüm doz gruplarında %30-%67 arası istatiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür. mRNA ve protein seviyesinde görülen azalmalar, CYP1A2 aktivitelerinde de gözlemlenmiştir. CYP1A2 aktiviteleri tüm doz gruplarında %22 -%35 arası oranlarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.21). Bu veriler, Spirulina uygulaması sonucunda, CYP1A2 izoziminin her üç düzeyde de (mRNA, protein ve aktivite seviyesinde) anlamlı miktarlarda azaldığını göstermektedir (Çizelge 4.12). Tez konusu kapsamında çalışılan CYP izozimlerinin mRNA, protein ve enzim aktivitesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan tüm değişiklikler Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. CYP1A2, CYP2E1, CYP3A1 izozimleri için mRNA, protein ve enzim aktivitesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan tüm değişiklikler

CYP450 ENZİMLERİ	mRNA	PROTEİN	ENZİM AKTİVİTESİ
CYP1A2	% 23 ↓ (3. Doz)	% 30-% 67 ↓ (Tüm Dozlar)	% 22-% 35 ↓ (Tüm Dozlar)
CYP2E1	% 30 ↓ (2. ve 3. Doz)	% 19-% 36 ↓ (Tüm Dozlar)	% 25-% 45 ↓ (Tüm Dozlar)
CYP3A1	% 22 ↑ (2. Doz)	% 34-% 68 ↑ (Tüm Dozlar)	-

CYP1A2 izozimi, sitokrom P450'ler tarafından gerçekleştirilen metabolik aktivasyon reaksiyonlarının % 17' sinden sorumludur (Rendic ve Guengerich, 2012). Bu izozim, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlu bifeniller (PCB), dioksinler, aromatik aminler ve aflotoksinler gibi çevresel ve diyetsel prekarsinojenlerin aktivasyonunda ve biotransformasyonunda önemli rol oynar (Nebert, 1989). Bu çalışma, Spirulina' nın CYP1A2 izoziminin aktivite/gen ifade seviyesini etkilediğini gösteren ilk çalışmadır. Bu izozimin Spirulina ile inhibe olması/baskılanması, benzo(a)piren, aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonlar gibi günlük hayatta sıklıkla maruz kaldığımız çoğu prekarsinojenik ve premutajenik olan kimyasalların metabolik aktivasyonunu baskılayarak sonuçta oluşacak reaktif ara ürünlerin miktarını azaltacaktır. Dolayısıyla bu durum, Spirulina kullanırken çeşitli şekillerde (sigara kullanımı, mesleki maruziyet, kirli şehir havası, kömürde pişen yanmış et ürünleri vs.) bu kimyasalara maruz kalan insanların karaciğerinde ve diğer bazı organlarında gelişebilecek toksisite, mutajenite ve kimyasal karsinojenez riskine karşı koruyucu olabilir. Literatürde Spirulina' nın aflatoksin ve 5-fluorourasil tarafından indüklenen lipit peroksidasyonunda ve 4-nitroquinoline-1-oksit tarafından indüklenen hepato-nefrotoksisitede koruyucu etkisinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur (Hassan ve ark., 2012; Ray ve ark., 2007; Viswanadha ve ark., 2011). Bahsedilen kimyasalların metabolik aktivasyonları CYP1A2 tarafından gerçekleşmektedir. CYP1A2'nin inhibe olması/baskılanması, bu bileşiklerin metabolizmaları sonucu oluşan reaktif ara ürünlerin miktarını azaltacak dolayısıyla bu durum lipit peroksidasyonu ve hepato-nefrotoksisite riskine karşı koruyucu etki sağlayacaktır.

Toksikolojik açıdan önem arz eden CYP1A2, klinik amaçlı kullanılan asetaminofen, diazepam, naproksen, ketokonazol, simetidin gibi bazı ilaçlarında metabolizmasında rol aldığından farmakolojik açıdan da önemlidir. Spirulina' nın CYP1A2 izoziminin aktivitesinde yarattığı bu düşüş, eş zamanlı olarak alınan yukarıda bahsedilen ilaçların farmakokinetiğini değiştirerek, ilacın doğasına bağlı olarak artan ya da azalan ilaç yanıtı ile ilaç toksisitesi gibi ciddi sonuçlar doğurabilir. Bunların yanı sıra, Spirulina' nın Aril hidrokarbon reseptörü (AhR) ile regüle olan CYP1A2 izoziminin regülasyonunu değiştirebileceği de düşünülmüştür. CYP1A2' nin, Spirulina uygulaması sonucu mRNA seviyesinde meydana gelen azalışı, AhR reseptörünün azalışından kaynaklı olabilir. Fakat bunu kesin olarak ifade etmek mümkün değildir. CYP1A2' ye benzer şekilde, AhR' de mRNA ve protein seviyesinde analiz edilerek kesin bilgiye ulaşılabilir.



*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

Şekil 4.21. Sıçan karaciğer mikrozomlarında KND, ANH, END aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki aktiviteler % 100 olarak alındı. Diğer gruplardaki aktiviteler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi göstermektedir.

Tez konusu kapsamında çalışılan bir diğer izozim olan CYP2E1 için elde edilen verilere baktığımızda, karaciğer dokusu CYP2E1 mRNA seviyelerinin tüm doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmüştür. 2. ve 3. Doz grubunda ortalama % 30 oranında görülen bu azalmalar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.12). mRNA seviyesine paralel olarak, protein seviyesinde de doza bağımlı olarak tüm doz gruplarında %19-%36 arasında azalış görülmüştür ($p<0.05$). mRNA ve protein seviyesinde gözlemlenen istatistiksel olarak anlamlı bu azalışlar enzim aktivitelerinde en yüksek şekilde gözlemlenmiştir. Özellikle 3. Doz grubundaki CYP2E1 aktivitesinde % 45'e varan azalış görülmüştür (Şekil 4.12). Bu çalışma, Spirulina' nın CYP2E1 izoziminin aktivite/gen ifade seviyesini anlamlı derecede düşürdüğünü gösteren ilk çalışmadır.

CYP2E1 izozimi, sitokrom P450'ler tarafından gerçekleştirilen tüm metabolik aktivasyon reaksiyonlarının % 11' inden sorumludur (Rendic ve Guengerich, 2012). Ksenobiyotiklerin önemli bir kısmının metabolizmasında rol oynayan CYP2E1 özellikle benzen, akrilamid, karbon tetraklorür, stiren gibi küçük moleküler ağırlıklı prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonunda rol almaktadır. CYP2E1'in Spirulina ile inhibe olması/baskılanması, özellikle benzen ve akrilamid gibi günlük hayatta sıklıkla maruz kaldığımız prekarsinojenik kimyasalların metabolik aktivasyonunu baskılayarak daha az reaktif ara ürün meydana gelmesine neden olacaktır. Dolayısıyla bu durum, Spirulina kullanırken bu kimyasallardan kaynaklı meydana gelebilecek kanser oluşma ve hepatotoksisite riski azalmasına yardımcı olabilir. Literatürde Spirulina'nın üretan tarafından indüklenen genotoksisite, karbontetraklorid tarafından indüklenen hepatotoksisite ve sisplatin tarafından indüklenen genotoksisitede koruyucu etkisi olduğunu gösteren *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır (Kuriakose ve Kurup, 2011; Mohan ve ark., 2006; Premkumar ve ark., 2004). Bu kimyasallar CYP2E1 tarafından aktif metabolitlere dönüştürülmektedir. CYP2E1'in baskılanması sonucunda daha az reaktif metabolit oluşacaktır. Bu etki Spirulina' nın kimyasallar tarafından indüklenen doku hasarlarında ortaya koyduğu koruyucu etkinin mekanizmalarından birini oluşturmaktadır. CYP1A2 izozimine benzer şekilde, toksikolojik açıdan önem arz eden CYP2E1 izozimi, farmakolojik açıdan da önemli bir CYP izozimidir. Pek çok kimyasalın yanı sıra, asetaminofen, izoniazid ve klorzoksazon gibi yaygın olarak kullanılan bazı klinik ilaçların biyotransformasyonunda da rol oynamaktadır. CYP2E1'in Spirulina uygulaması sonucunda enzimin aktivitesinin ve seviyesinin değişimi ilaçların farmakokinetiğinde değişimler yaratarak klinik ilaç toksisitesine ve beklenmedik ilaç yanıtına neden olabilir. Spirulina'nın CYP2E1'in regülasyonu üzerine etkisine baktığımızda ise; Spirulina

uygulaması sonucunda azalan CYP2E1 seviyesi (mRNA ve protein) ve paralelinde azalan enzim aktivitesi, mRNA sentezinin baskılanmasından (transkripsiyonel) ya da mRNA degredasyonunun artmasından (post-transkripsiyonel) kaynaklı olabilir. CYP2E1 regülasyonunda bu iki mekanizmada rol oynamaktadır fakat CYP2E1 regülasyonu diğer tüm CYP izozimlerinden çok daha karmaşıktır ve henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

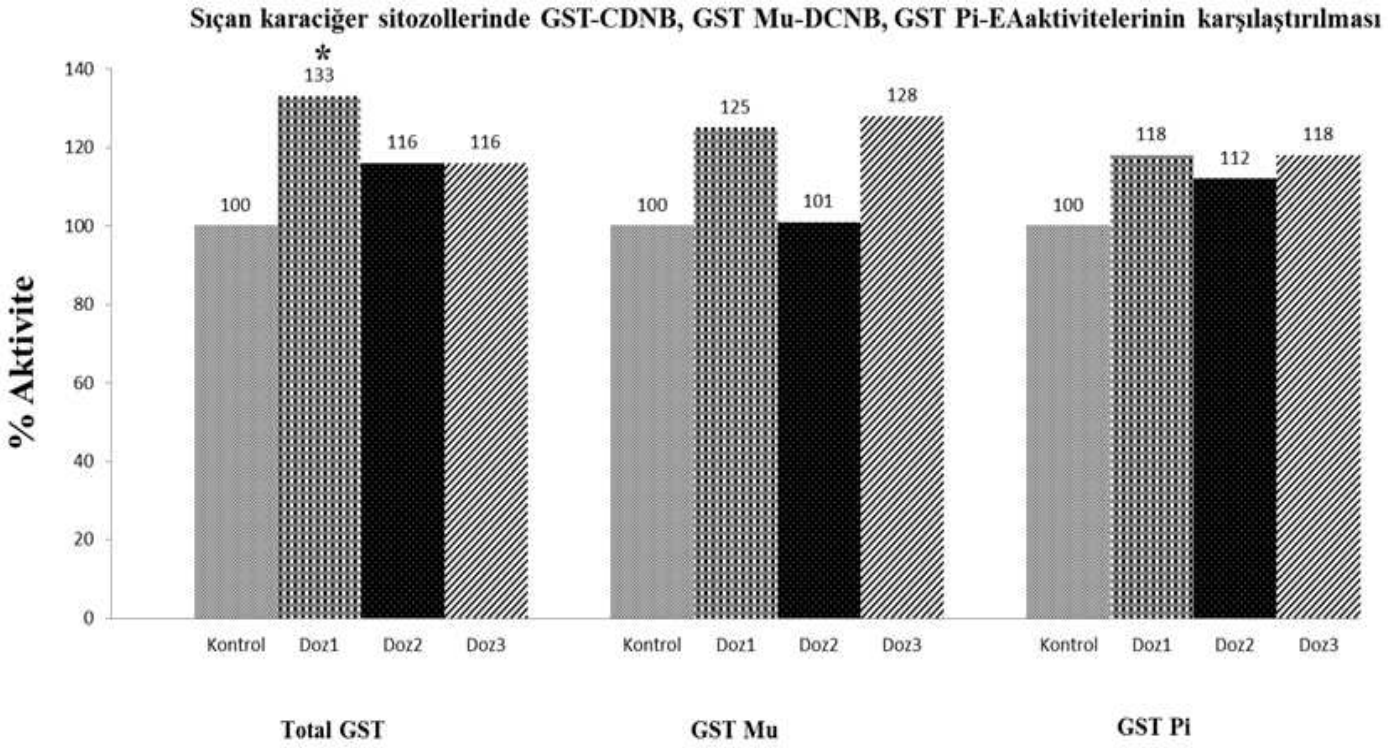
Önceki çalışmalar kısmında ayrıntılı şekilde bahsedildiği üzere, literatürde Spirulina' nın total sitokrom P450 seviyesini yarı yarıya azalttığını gösteren bir çalışma bulunmaktadır (Mittal ve ark., 1999) Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre, Spirulina' nın CYP450 izozimlerinin -CYP1A2, CYP2E1- seviyesinde yarattığı azalış, Mittal ve ark. (1999) çalışmasından elde edilen verileri doğrulamaktadır.

Tez çalışmasında CYP1A2 ve CYP2E1 enzimlerinin yanı sıra, Spirulina' nın CYP3A1 (insanda CYP3A4) enzimi üzerine etkileride belirlenmiştir. Bu çalışma, Spirulina' nın ilaç metabolizmasında oldukça önemli rol oynayan CYP3A1 izozimi üzerine etkilerinin belirlendiği ilk çalışmadır. Spirulina uygulaması, CYP3A1 izoziminin mRNA ve protein seviyelerini değiştirmiştir. CYP3A1 mRNA (% 22) ve protein seviyelerinde (%34-%68) kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışlar görülmüştür (Çizelge 4.12). CYP3A1 izoziminin mRNA ve protein seviyesinde meydana gelen bu artışların enzim aktivitesi seviyesine yansıması beklenirken, böyle bir değişim görülmemiş, hatta 1. ve 2. Doz grubunda az miktarda düşüş gözlemlenmiştir. Diğer bir deyişle, Spirulina uygulanan sıçan karaciğerinde CYP3A1 izoziminin regülasyonunda çift yönlü bir etki gözlemlenmiştir: mRNA ve protein seviyesi indüklenirken, enzim aktivitesinde azalma görülmüş fakat bu azalmalar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç, Spirulina'nın içeriğinde bulunan bazı bileşenlerin enzimi mRNA ve protein seviyesinde indükleyerek aktif proteini artırmasına neden olurken, bazı bileşenlerin ise enzim inhibisyonuna neden olarak katalitik aktiviteyi kontrol grubunda gözlenen değerlerin yakınına çekmiş olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Spirulina gibi yaygın kullanılan bir preparatın, piyasada bulunan antibiyotikler, kalsiyum kanal blokerleri, sedatifler ve immün sistem düzenleyicileri gibi pek çok klinik ilacın % 50'sinin metabolizmasından sorumlu CYP3A4'ün aktivitesi üzerine etkisinin bilinmesi, olası zıt ilaç etkileşimlerinin en aza indirgenmesi açısından son derece önemlidir (Tomaszewski ve ark., 2008). Bu nedenle, ilerleyen çalışmalarda rekombinant ve saf enzim sistemleri kullanılarak Spirulina' nın CYP3A4 aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisi olup olmadığı daha ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

Tez çalışmasında CYP izozimlerinin yanı sıra, Spirulina' nın total GST, GST Mu ve GST Pi enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri de belirlenmiştir. Buna göre, Spirulina uygulaması, total GST aktivitesini tüm doz gruplarında artırmıştır. Fakat, yalnızca 1. Doz grubunda % 33 oranında görülen artış istatiksel olarak anlamlı bulunurken, 2. ve 3. Doz gruplarında bu şekilde anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 4.22). Spirulina' nın, günlük hayatta maruz kalınan birtakım toksik ve mutajenik kimyasalların ve ilaçların meydana getirdikleri doku harabiyetinde GST seviyesini artırarak iyileştirici ve koruyucu etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Viswanadha ve ark., 2011; İsmail ve ark., 2009; Lu ve ark., 2010, Khan ve ark., 2005). Bu çalışmalarda, yalnızca Spirulina verilen grubun GST aktivitelerinde kontrol grubuna benzer değerler gözlemlenirken, kimyasallarla oluşturulan toksisitede Spirulina' nın azalan GST aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Spirulina'nın tek başına verildiğinde elde edilen GST aktivite değerleri, bu çalışmadan elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. GST' lar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), nitrojenli ve halojenli bileşikler, organofosfatlar, α-β doymamış aldehitler ile lindan, atrazin, DDT gibi toksik pestisitler; bütadien, aklorein ve aflatoksin gibi çevresel karsinojenler; sisplatin, siklofosfamid, asetominofen gibi klinik ilaçları içeren pek çok ekzojen bileşiğin Faz II metabolizmasında önemli rol oynamaları nedeniyle hayati fonksiyon üstlenen enzim gruplarından biridir (Eaton ve Bammler, 1999; Hayes ve Pulford, 1995). Bu nedenle, Spirulina gibi yaygın şekilde kullanılan bir preparatın bu enzim grubu üzerine etkisinin bilinmesi son derece önemlidir. GST'ların aktivitesinde meydana gelen artışlar, bu maddelerin metabolizmaları sonucu oluşan toksik ve karsinojenik metabolitlerin detoksifikiye edilmelerini hızlandırır. Dolayısıyla vücut için koruyucu niteliktedir.

Spirulina uygulamasının GST Mu ve GST Pi aktiviteleri üzerine etkilerine bakıldığında, tüm doz gruplarında değişen oranlarda artışlar gözlemlenmiştir. Fakat Spirulina' nın GST izozimlerinin aktivitelerinde meydana getirdiği bu artışlar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.22).

Tez çalışması kapsamında ortaya konulan tüm veriler dikkate alındığında, Spirulina tüketiminin günlük hayatta maruz kalınan bazı kimyasalların oluşturdukları doku hasarlarına karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir. Ancak, özellikle rutin ilaç kullanan hasta gruplarının Spirulina kullanırken, bazı ilaçlar ile Spirulina arasındaki etkileşim potansiyelini göz ardı etmemeleri gerekmektedir. Diğer bir deyişle, Spirulina tüketiminin faydalarının yanı sıra zararlarınında olabileceği düşünülerek, dikkatli bir şekilde ve doğru dozlarda tüketilmesinin daha uygun olacağı önerilmektedir.



*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel larak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).

Şekil 4.22. Sıçan karaciğer mikrozomlarında total GST, GST Mu, GST Pi aktivitelerinin karşılaştırılması. Kontrol grubundaki aktiviteler % 100 olarak alındı. Diğer gruplardaki aktiviteler kontrol grubuna kıyasla yüzde değişimi göstermektedir.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, alternatif ve tamamlayıcı bir diyetsel takviye ürünü olarak piyasada bulunan Spirulina' nın, günlük hayatta maruz kalınan kimyasallar ile tedavi amaçlı kullanılan klinik ilaçların büyük bir kısmının metabolik aktivasyon ve detoksifikasyonunda rol alan CYP450 ve GST izozimleri üzerine etkilerini ortaya koyan ilk çalışmadır.

Elde edilen verilere göre, Spirulina' nın kimyasal karsinojenezde önemli rol oynayan CYP1A2 ve CYP2E1 izozimlerinin gen ifade düzeyini ve aktivitesini anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Bu durum, Spirulina kullanırken çeşitli şekillerde (sigara kullanımı, mesleki maruziyet, kirli şehir havası vs.) bu kimyasalara maruz kalan insanların karaciğerinde ve diğer bazı organlarında gelişebilecek toksisite, mutajenite ve kimyasal karsinojenez riskine karşı koruyucu olabilir. Bu yaklaşım, bireylerin yaşam standartlarını artırmaları amacıyla Spirulina doğal preparatını takviye olarak kullanmaları açısından oldukça olumludur. Ancak, Spirulina'nın daha önce ayrıntılı olarak bahsedilen klinik etkilerinden dolayı özellikle rutin ilaç kullanan hastalar tarafından tercih edilmesi, ilaçların farmakokinetiğinde değişimler yaratarak klinik ilaç toksisitesine ve beklenmedik ilaç yanıtına neden olabilir. Bu nedenle, Spirulina ile eş zamanlı olarak bazı klinik ilaçları kullanan bireylerin bu ürün ile ilaçlar arasındaki etkileşim potansiyelini göz önünde bulundurması gerekmektedir.

Tez çalışması kapsamında, Spirulina' nın metabolizma enzimlerinden sitokrom P450-GST kaynaklı olası ilaç/kimyasal etkileşimlerine dair önemli veriler elde edilmiştir. Bu veriler dikkatlice değerlendirilip, özellikle rutin ilaç alan hastalarda uygun dozlarda kullanılması konusunda tüketiciler bilinçlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

Agus H.H., Tekin P., Bayav M., Semiz A. ve Şen A., 2009. Drug Interaction Potential of the Seed Extract of Urtica urens L. (dwarf nettle). *Phytother Res.*, 23(12): 1763-1770.

Aliya S., Reddanna P. ve Thyagaraju K., 2003. Does Glutathione S-Transferase Pi (GST-Pi) a Marker Protein for Cancer. *Mol Cell Biochem.*, 253(1-2): 319-327.

Ansell P.J., Espinosa-Nicholas C., Curran E.M., Judy B.M., Philips B.J., Hannink M. ve Lubahn D.B., 2004. *In vitro* and *In vivo* Regulation of Antioxidant Response Element-Dependent Gene Expression by Estrogens. *Endocrinology*, 145: 311–317.

Apostolides Z., Balentine D.A., Harbowy M.E., Hara Y. ve Weisburger J.H., 1997. Inhibition of PhIP Mutagenicity by Catechins, and by Theaflavins and Gallate Esters. *Mutat. Res.*, 389: 167-172.

Appelt L.C. ve Reicks M.M., 1999. Soy Induces Phase II Enzymes but Does Not Inhibit Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Carcinogenesis in Female Rats. *J. Nutr.*, 129: 1820-1826.

Arınç E. ve Şen A., 1999. Hepatic Cytochrome P4501A and 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase Induction in Mullet and Common Sole as an Indicator of Toxic Organic Pollution in İzmir Bay, Turkey. *Mar. Environ. Res.*, 48: 147-160.

Arınç E., 2010. The Role of Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes in Drug Design, Development and Drug Interactions with a Special Emphasis on Phenotyping. *Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic*, 64: 120-122.

Arınç E., Arslan S. ve Adali O., 2005. Differential Effects of Diabetes on CYP2E1 and CYP2B4 Proteins and Associated Drug Metabolizing Enzyme Activities in Rabbit Liver. *Arch Toxicol.*, 79: 427–433.

Arınç E., Arslan S., Bozcaarmutlu A. ve Adali O., 2007. Effects of Diabetes on Rabbit Kidney and Lung CYP2E1 and CYP2B4 Expression and Drug Metabolism and Potentiation of Carcinogenic Activity of N-Nitrosodimethylamine in Kidney and Lung. *Food Chem Toxicol.*, 45: 107–118.

Armstrong R.N., 1997. Glutathione Transferases. In: Guengerich, F. P., Ed. *Comprehensive Toxicology*, Biotransformation 3. Elsevier Science, Oxford. 307-327.

Bailey D.G., Malcolm J., Arnold O. ve Spence J.D., 1998. Grapefruit Juice-Drug Interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 58(7): 831-840.

Bailey D.G., Spence J.D., Munoz C. ve Arnold J.M., 1991. Interaction of Citrus Juices with Felodipine and Nifedipine. *Lancet*, 337(8736): 268-269.

Belay A., 2002. The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *JANA*, 5 (2): 27-48.

Bernauer U., Vieth B., Ellrich R., Heinrich-Hirsch B., Jänig G.R. ve Gundert-Remy U., 1999. CYP2E1-Dependent Benzene Toxicity: The Role of Extrahepatic Benzene Metabolism. *Arch Toxicol.*,73(4-5): 189-196.

Berthou F., Guillois B., Riche C., Dreano Y., Jacqz-Aigrain E. ve Beaune P.H., 1992. Interspecies Variations in Caffeine Metabolism Related to Cytochrome P4501A Enzymes. *Xenobiotica.*, 22 (6): 671-680.

Board P. G., Baker R. T., Chelvanayagam G., Jermiin L. S. ve Zeta A., 1997. Novel Class of Glutathione Transferases in a Range of Species from Plants to Humans. *Biochem*., 328: 929-935.

Boyuneğmez-Tümer T. ve Arınç E., 2006. Screening of PAH/PCB Type Pollution Along Izmir Bay by CYP1A Levels and EROD Activities of Three Different Fish Species. *The FEBS Journal*, 273(Suppl 1): 292.

Bray B.J., Goodin M.G., Inder R.E. ve Rosengren R.J., 2001. The Effect of Retinol on Hepatic and Renal Drug-Metabolising Enzymes. *Food Chem Toxicol*., 39(1): 1-9.

Buhler D.R. ve Williams D.E., 1989. Enzymes Involved in Metabolism of PAHs in Fishes and Other Aquatic Animals. Metabolism of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. In U. Varanasi. CRC Press, New York. 151-184.

Bulavin D. V., Korpishchenko A. I., Gubanov A. L. ve Rechetov A. V., 1996. Glutathione-S-transferase PI-1 in Normal and Cancerous Lung Tissue: Properties, Function, and Possible Mechanisms for Regulating Activity. *Biokhimiia.*, 61: 1015-1027.

Canuto R.A., Muzio G., Maggiora M., Biocca M.E. ve Dianzani M.U., 1993. Glutathione-S-Transferase, Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Activities During Diethylnitrosamine-Carsinogenesis in Rat Liver. *Cancer Letters*, 68: 177-183.

Cardini G. ve Jurtshuk P., 1968. CytochromeP-450 Involvement in the Oxidation of N-Octaneby Cell-Free Extracts of Corynebacterium sp. Strain 7E1C. *J. Biol. Chem*., 243: 6070-6072.

Catterall F., McArdle N.J., Mitchell L., Papayanni A., Clifford M.N. ve Ioannides C., 2003. Hepatic and Intestinal Cytochrome P450 and Conjugase Activities in Rats

Treated with Black Tea Theafulvins and Theaflavins. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 1141-1147.

Chamorro G., Perez-Albiter M., Serrano-Garcıa N., Mares-Samano J.J. ve Rojas P., 2006. Spirulina maxima Partially Protects Against 1-methyl-4-phenyl-1.2.3.6-Tetrahydropyridine Neurotoxicity. *Nutr. Neurosci.*, 9 (5–6): 207–212.

Chang G.W. ve Kam P.C., 1999. The Physiological and Pharmacological Roles of Cytochrome P450 Isoenzymes. *Anaesthesia*, 54(1): 42-50.

Ciferri O. ve Tiboni O., 1985. The Biochemistry and Industrial Potential of Spirulina. *Annual Review of Microbiology*, 39: 503-526.

Cingi C., Conk-Dalay M., Cakli H. ve Bal C., 2008. The Effects of Spirulina on Allergic Rhinitis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 265(10): 1219-1223.

Ciolino H. P. ve Yeh G. C., 1999. The Flavonoid Galangin is an Inhibitor of CYP1A1 Activity and Agonist/Antagonist of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Br. J. Cancer*, 79: 1340–1346.

Ciolino H. P., Wang T. T. Y. ve Yeh G. C., 1998. Diosmin and Diosmetin are Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor that Differentially Affect Cytochrome P450 1A1 Activity. *Cancer Res.*, 58: 2754–2760.

Clark A. G., 1989. The Comparative Enzymology of the Glutathione S-Transferases from Non-Vertebrate Organisms. *Comp. Biochem. Physiol*., 926: 419-446.

Clarke M.W., Burnett J.R., Wu J.H., Hodgson J.M., Ledowski T., Puddey I.B. ve Croft K.D., 2009. Vitamin E Supplementation and Hepatic Drug Metabolism in Humans. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 54(6): 491-496.

Cochin J. ve Axelrod J., 1959. Biochemical and Pharmacological Changes in the Rat Following Chronic Administiration of Morphine, Nalorphine and Normorphine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 125: 105-110.

Coleman M., 2005. *Human drug metabolism.* An Introduction, Wiley, Hoboken. 5-286.

Combalbert J., Fabre I., Fabre G., Dalet I., Derancourt J., Cano J.P. ve Maurel P., 1989. Metabolism of Cyclosporin A. IV. Purification and Identification of the Rifampicin-Inducible Human Liver Cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a Product of P450IIIA Gene Subfamily. *Drug Metab. Dispos.*, 17(2): 197-207.

Conney A.H., Miller E.C. ve Miller J.A., 1956. The Metabolism of Methylated Aminoazo Dyes. V. Evidence for Induction of Enzyme Synthesis in the Rat by 3-Methylcholanthrene. *Cancer Res.*, 16(5): 450-459.

Dalmizrak O., Kulaksiz-Erkmen G. ve Ozer N., 2012. Evaluation of the *In vitro* Inhibitory Impact of Hypericin on Placental Glutathione S-transferase Pi. *Protein J.*, 31(7):

544-549.

Dasgupta T., Banejee S., Yadav P.K. ve Rao A.R., 2001. Chemomodulation of Carcinogen Metabolising Enzymes, Antioxidant Profiles and Skin and Forestomach Papillomagenesis by Spirulina platensis. *MolCell Biochem.,* 226(1-2): 27-38.

Dillon J.C., Phuc A.P. ve Dubacq J. P., 1995. Nutritional Value of the Alga Spirulina. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 77: 32–46.

Eaton D.L. ve Bammler T.K., 1999. Concise Review of the Glutathione S-Transferases and their Significance to Toxicology. *Toxicol Sci.*, 49(2): 156-164.

Egan K.M., Cai Q., Shu X.O., Jin F., Zhu T.L., Dai Q., Gao Y.T. ve Zheng W., 2004. Genetic Polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the Risk for Breast Cancer: Results from the Shanghai Breast Cancer Study and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13(2): 197-204.

Erdelmeier C.A.J., 1998. Hyperforin, Possibly the Major Non-nitrogenous Secondary Metabolite of Hypericum perforatum L. *Pharmacopsychiatry*, 1: 2–6.

Ernst E., 2002. The Risk-Benefit Profile of Commonly Used Herbal Therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. *Ann Intern Med.*, 136(1): 42-53.

Estabrook R.W., 2003. A Passion for P450s (Rememberances of the Early History of Research on Cytochrome P450). *Drug metabolism dispos.*, 31: 1461-1473.

Estabrook R.W., Hildebrandt A., Remmer H.L., Schenkman J.B., Rosenthal O. ve Cooper D.Y., 1968. Hess B., Staudinger H., Eds. The Role of Cytochrome P-450 in Microsomal Mixed Function Oxidation Reactions. *In Biochemie des Sauerstoffs*. Springer, Verlag, Berlin, 142-177.

Evans W.E. ve Relling M.V., 1999. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science*, 286(5439): 487-491.

Ey P.L. ve Ashman L.K., 1986. The Use of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Immunoglobulin and Immunoblotsfor Determining the Specificity of Monoclonal Antibodies to Protein Mixtures. *Method in Enzimology*., 121: 497-509.

Farooq S.M., Asokan D., Sakthivel R., Kalaiselvi P. ve Varalakshmi P., 2004. Salubrious Effect of C-Phycocyanin Against Oxalate-Mediated Renal Cell Injury. *Clin Chim Acta.*, 348(12): 199-205.

Ferris J.P., Fasco M.J., Styliano-Poulou F.L., Jerina D.M., Daly J.W. ve Jeffrey A.M., 1973. Monooxygenase Activity in Cunninghamella bainieri: Evidence for a Fungal System Similar to Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 156: 97–

103.

Fuhr U., Klittich K. ve Staib A.H., 1993. Inhibitory Effect of Grapefruitjuice and Its Bitter Principal, Naringenin on CYP1A2 Dependent Metabolism of Caffeine in Man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 35: 431–436.

Garton K.J., Yuen P., Meinwald J., Thummel K.E. ve Kharasch E.D., 1995. Stereoselective Metabolism of Enflurane by Human Liver Cytochrome P4502E1. *Drug Metab Dispos.*, 23(12): 1426-1430.

Gervasini G., San Jose C., Carrillo J.A., Benitez J. ve Cabanillas A., 2010. GST Polymorphisms Interact with Dietary Factors to Modulate Lung Cancer Risk: Study in a High-Incidence Area. *Nutr Cancer.*, 62(6): 750-758.

Gonzalez F.J., 1989. The Molecular Biology of Cytochromes P450s. *Pharmacological Reviews,* 40: 243–288.

Goodwin B., Moore L.B., Stoltz C. M., McKee D.D. ve Kliewer S.A., 2001. Regulation of the Human CYP2B6 Gene by the Nuclear Pregnane X Receptor. *Mol. Pharmacol.*, 60: 427–431.

Guengerich F.P., 1984. Effects of Nutritive Factors on Metabolic Processes Involving Bioactivation and Detoxication of Chemicals. *Annu. Rev. Nutr.*, 4: 207-231.

Guengerich F.P., 1977. Separation and Purification of Multiple Forms of Microsomal Cytochrome P-450, Activities of Different Forms of Cytochrome P-450 towards Several Compounds of Environmental Interest. *J. Biol. Chem.*, 252: 3970–3979.

Guengerich F.P., 2005. Human Cytochrome P450 Enzymes. *In Cytochrome P450*, Ortiz de Montellano, P. R., Ed. *Structure, Mechanism, and Biochhemistry* (3rd ed.). Kluwer Academic-Plenum Press, New York. 377−530.

Guengerich F.P.,1992. Characterization of Human Cytochrome P450 Enzymes. *FASEB Journal (Bethesda, MD)*, 6: 745–748.

Guengerich F.P., 2001. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 14(6): 611-650.

Guengerich F.P., 2006. Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity. *AAPS J.*, 8(1): E101-E111.

Gyamfi M.A., Ohtani I.I., Shinno E. ve Aniya Y., 2004. Inhibition of Glutathione-S-transferases by Thonningianin A, Isolated from the African Medicinal Herb, Thonningia sanguinea, *In vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 42(9): 1401-1408.

Habig W.H., Pabst M.J. ve Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol.Chem*., 249: 7130-7139.

Haque S.E. ve Gilani K.M., 2005. Effect of Ambroxol Spirulina and Vitamin-E in Naphtalene Induced Cataract in Female Rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol*, 49(1): 57–64.

Harries L.W., Stubbins M.J., Forman D., Howard G.C. ve Wolf C.R., 1997. Identification of Genetic Polymorphisms at the Glutathione S-transferase Pi Locus and Association with Susceptibility to Bladder, Testicular and Prostate Cancer. *Carcinogenesis.*, 18(4): 641-644.

Hassan A.M., Abdel-Aziem S.H. ve Abdel-Wahhab M.A., 2012. Modulation of DNA Damage and Alteration of Gene Expression During Aflatoxicosis via Dietary Supplementation of Spirulina (Arthrospira) and Whey Protein Concentrate. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 79: 294-300.

Hayes J.D. ve Pulford D.J., 1995. The Glutathione S-transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.,* 30(6): 445-600.

He K., Iyer K.R., Hayes R.N., Sinz M.W., Woolf T.F. ve Hollenberg P.F., 1998. Inactivation of Cytochrome P450 3A4 by Bergamottin, a Component of Grapefruit Juice. *Chem Res Toxicol*., 11(4): 252-259.

Helsby N.A., Chipman J.K., Gescher A. ve Kerr D., 1998. Inhibition of Mouse and Human CYP 1A- and 2E1-Dependent Substrate Metabolism by the Isoflavonoids Genistein and Equol. *Food Chem. Toxicol*., 36: 375-382.

Henderson M.C., Miranda C.L., Stevens J.F., Deinzer M.L. ve Buhler D.R., 2000. *In vitro* Inhibition of Human P450 Enzymes by Prenylated Flavonoids from Hops, Humulus lupulus. *Xenobiotica.*, 30(3): 235-251.

Hodek P., Trefil P. ve Stiborová M., 2002. Flavonoids-Potent and Versatile Biologically Active Compounds Interacting with Cytochromes P450. *Chem Biol Interact.*, 139(1): 1-21.

Hong J.Y., Pan J., Gonzales F.J., Gelboi H.V. ve Yang C.S., 1987. The Induction of a Specific form of Cytochrome P-450 (P-450j) by Fasting. *Biochem Biophys Res Commun.*, 142: 1077–1083.

Imai Y., Ito A. ve Sato R., 1966. Evidence for Biochemically Different Types of Vesicles in the Hepatic Microsomal Fraction. *J. Biochem.*, 60: 417-428.

Ioannides C., 1999. Effect of Diet and Nutrition on the Expression of Cytochromes P450. *Xenobiotica*, 29(2): 109-154.

Ioannides C., 2002. Pharmacokinetic Interactions Between Herbal Remedies and Medicinal Drugs. *Xenobiotica*, 32(6):451-478.

Ismail M.F., Ali D.A., Fernando A., Abdraboh M.E., Gaur R.L., Ibrahim W.M., Raj M.H. ve Ouhtit A., 2009. Chemoprevention of Rat Liver Toxicity and Carcinogenesis by Spirulina. *Int. J. Biol. Sci*., 5(4): 377-387.

Iwasa M., Yamamoto M., Tanaka Y., Kaito M. ve Adachi Y., 2002. Spirulina-Associated Hepatotoxicity. *Am. J. Gastroenterol*., 97(12): 3212-3213.

Iyanagi T. ve Mason H.S., 1973. Some Properties of Hepatic Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate–Cytochrome C Reductase. *Biochemistry*, 12: 2297–2308.

Iyanagi T., Makino R. ve Mason H.S., 1974. Redox Properties of the Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome P-450 and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide- Cytochrome b5 Reductases. *Biochemistry*, 13: 1701–1710.

Jefcoate C.R., Liehr J.G., Santen R.J., Sutter T.R., Yager J.D., Yue W., Santner S.J., Tekmal R., Demers L., Pauley R., Naftolin F., Mor G. ve Berstein L., 2000. Tissue-Specific Synthesis and Oxidative Metabolism of Estrogens. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*., 27: 95-112.

Jerina D.M., Daly J.W., Witkop B., Zaltzman-Nirenberg P. ve Udenfriend S., 1970. 1,2-Naphthalene Oxide as an Intermediate in the Microsomal Hydroxylation of Naphthalene. *Biochemistry*, 9: 147–156.

Karadeniz A., Yildirim A., Simsek N., Kalkan Y. ve Celebi F., 2008. Spirulina platensis Protects Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Phytother Res*., 22: 1506–1510.

Karkos P.D., Leong S.C., Karkos C.D., Sivaji N. ve Assimakopoulos D.A., 2011. Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evidence Based Complement Alternat Med.*, 2011: 531053.

Keen J. H., Habig W.H. ve Jakoby W.B., 1976. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biol. Chem.*, 25: 6183-6188.

Khan M., Shobha J.C., Mohan I.K., Naidu M.U., Sundaram C., Singh S., Kuppusamy P. ve Kutala BK., 2005. Effect of Spirulina Against Doxorubicin-Reduced Cardiotoxicity. *Phytother. Res.*, 19 (12): 1030–1037.

Khan M., Shobha J.C., Mohan I.K., Rao Naidu M.U., Prayag A. ve Kutala V.K., 2006. Spirulina Attenuates Cyclosporine-Induced Nephrotoxicity in Rats. *J. Appl.*

Toxicol., 26(5): 444-451.

Kharasch E.D. ve Thummel K.E., 1993. Identification of Cytochrome P450 2E1 as the Predominant Enzyme Catalyzing Human Liver Microsomal Defluorination of Sevoflurane, Isoflurane, and Methoxyflurane. *Anesthesiology*, 79(4): 795-807.

Klingenberg M., 1958. Pigments of Rat Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 75(2): 376–386.

Kohno H., Tanaka T., Kawabata K., Hirose Y., Sugie S., Tsuda H. ve Mori H., 2002. Silymarin, a Naturally Occurring Polyphenolic Antioxidant Flavonoid, Inhibits Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in Male F344 Rats. *Int. J. Cancer*, 101: 461-468.

Krishna D.R. ve Klotz U., 1994. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. *Clinical Pharmacokinetics*, 26: 144–160.

Kumar G., Banu G.S., Kannan V. ve Pandian M.R., 2005. Antihepatotoxic Effect of Beta-Carotene on Paracetamol Induced Hepatic Damage in Rats. *Indian J Exp Biol.*, 43(4): 351-355.

Kuriakose G.C. ve Kurup M.G., 2011. Antioxidant and Antihepatotoxic Effect of Spirulina Laxissima Against Karbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats. *Food Funct.*, 2(3-4): 190-196.

Laemmli U.K., 1970. Clevage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-684.

Le Marchand L., Sivaraman L., Pierce L., Seifried A., Lum A., Wilkens L.R. ve Lau A.F., 1998. Associations of CYP1A1, GSTM1 and CYP2E1 Polymorphisms with Lung Cancer Suggests Cell Type Specificities to Tobacco Carcinogens. *Cancer Res.*, 58: 4858–4863.

Levin W., Ryan D., West S. ve Lu A.Y.H., 1974. Preparation of Partially Purified, Lipid Depleted Cytochrome P-450 and NADPH-Cytochrome C Reductase from Rat Liver Microsomes. *J. Biol. Chem*., 249: 1747-1754.

Levitt R.C., Legraverend C., Nebert D.W. ve Pelkonen O., 1977. Effects of Harman and Norharman on the Mutagenicity and Binding to DNA of Benzo[a]pyrene Metabolites *In vitro* and on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction in Cell Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79(4): 1167-1175.

Lewis D.F., 2003. Human Cytochromes P450 Associated with the Phase I Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics: a Compilation of Substrates and Inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 Families. *Curr. Med. Chem.*, 10(19): 1955-1972.

Lin J.H. ve Lu A.Y.H., 2001. İnterindividual Variability in Inhibition and Induction of Cytochrome P450 Enzymes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41: 535-567.

Lindenmayer A. ve Smith L.,1964. Cytochromes and Other Pigments of Baker's Yeast Grown Aerobically and Anaerobically. *Biochim. Biophys. Acta.*, 93: 445–461.

Listowsky I., Abramovitz M., Hama H. ve Niitsu Y., 1988. Intracellular Binding and Transport of Hormones and Xenobiotics by GST. *Drug Metab. Rev*., 19: 305-318.

Lown K.S., Bailey D.G., Fontana R.J., Janardan S.K., Adair C.H., Fortlage L.A., Brown M.B., Guo W. ve Watkins P.B., 1997. Grapefruit Juice Increases Felodipine Oral Availability in Humans by Decreasing Intestinal CYP3A Protein Expression. *J. Clin. Invest.*, 99(10): 2545-2553.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. ve Randal R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*. 193: 265-275.

Lu A.Y.H. ve Coon M.J., 1968. Role of Hemoprotein P450 in Fatty Acid W-Hydroxylation in a Soluble Enzyme System from Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.*, 243: 1331-1332.

Lu J., Ren D.F., Wang J.Z., Sanada H. ve Egashira Y., 2010. Protection by Dietary Spirulina platensis Against D-Galactosamine--and Acetaminophen-Induced Liver Injuries. *Br. J. Nutr.*, 103(11): 1573-1576.

Lucas D., Farez C., Bardou L.G., Vaisse J., Attali J.R. ve Valensi P., 1998. Cytochrome P450 2E1 Activity in Diabetic and Obese Patients as Assessed by Chlorzoxazone Hydroxylation. *Fundam Clin Pharmacol.*, 12(5): 553-558.

Machala M., Kubinova R., Horavova P. ve Suchy V., 2001. Chemoprotective Potentials of Homoisoflavonoids and Chalcones of Dracaena cinnabari: Modulations of Drug-Metabolizing Enzymes and Antioxidant Activity. *Phytother. Res*., 15: 114-118.

Maliakal P.P., Coville P.F. ve Wanwimolruk S., 2001. Tea Consumption Modulates Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in Wistar Rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53: 569–577.

Mani U.V., Desai S. ve Iyer U., 2000. Studies on the Long-Term Effect of Spirulina Supplementation on Serum Lipid Profile and Glycated Proteins in NIDDM Patients. *J. Nutraceut.*, 2: 25–32.

Mannel M., 2004. Drug Interactions with St John's Wort: Mechanisms and Clinical Implications. *Drug Saf.*, 27(11): 773-797.

Mannervik B., Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., Di Ilio C., Ketterer B., Listowsky I., Morgenstern R., Muramatsu M. ve Pearson W.R., 1992. Nomenclature for

Human Glutathione Transferases. *Biochem J.*, 282: 305-306.

Markowitz J.S., De Vane C.L., Boulton D.W., Carson S.W., Nahas Z. ve Risch S.C., 2000. Effect of St. John's Wort (Hypericum perforatum) on Cytochrome P-450 2D6 and 3A4 Activity in Healthy Volunteers. *Life Sci*., 66(9): L133–L139.

Marles R., Barrett M., Barnes J., Chavez M., Gardiner P., Ko R., Mahady G., Low Dog T., Sarma N., Giancaspro G., Sharaf M. ve Griffiths J., 2011. United States Pharmacopeia Safety Evaluation of Spirulina. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51: 593-604.

Mascher D., Paredes-Carvajal M.C., Torres-Duran P.V., Zamora Gonzalez J., Dıaz-Zagoya J.C. ve Juarez-Oropeza M.A., 2005. Ethanolic Extract of Spirulina maxima Alters the Vasomotor Reactivity of Aortic Rings form Obese Rats. *Arch. Med. Res*., 37 (1): 50–57.

Mathew B., Sankaranarayanan R., Nair P.P., Varghese C., Somanathan T. ve Amma B.P., 1995. Evaluation of Chemoprevention of Oral Cancer with Spirulina fusiformis. *Nutr. Cancer*, 24: 197–202.

Mclemore T.L., Adelberg S., Liu M.C., McMahon N.A., Yu S.J., Hubbard W.C., Czerwinski M., Wood T.G., Storeng R. ve Lubet R.A., 1990. Expression of CYP1A1 Gene in Patients with Lung Cancer: Evidence for Cigarette Smoke-Induced Gene Expression in Normal Lung Tissue and for Altered Gene Regulation in Primary Pulmonary Carcinomas. *J. Natl.Cancer Inst.*, 82: 1333-1339.

Meyer D.J., Coles B., Pemble S.E., Gilmore K.S., Fraser G.M. ve Ketterer B., 1991. A New Class of Glutathione S-Transferases Purified From Rat and Man. *Biochem. J.*, 274: 409-414.

Minn A.L., Pelczar H., Denizot C., Martinet M., Heydel J.M., Walther B., Goudonnet H. ve Artur Y., 2005. Characterization of Microsomal Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases in the Rat Olfactory Mucosa. *Drug Metab. Dispos*., 33(8): 1229-1237.

Miranda C.L. ve Chhabra R.S., 1981. Effects of High Dietary Vitamin A on Drug-Metabolizing Enzyme Activities in Guinea Pig and Rabbit. *Drug Nutr Interact.*, 1(1): 55-61.

Mishima T., Murata J., Toyoshima M., Fujii H., Nakajima M., Hayashi T., Kato T. ve Saiki I., 1998. Inhibition of Tumor Invasion and Metastasis by Calcium Spirulan (Ca-SP). A Novel Nulfated Polysaccharide Derived from a Blue-Green

Alga, Spirulina platensis. *Clin Exp Metastasis.*, 16(6): 541-550.

Mittal A., Suresh P.V., Kumar C., Banerjee S., Rao A.R. ve Kumar A., 1999. Modulatory Potential of Spirulina fusiformis on Carcinogen Metabolizing Enzymes in Swiss Albino Mice. *Phytother. Res.*, 13: 111-114.

Mohan I.K., Khan M., Shobha J.C., Naidu M.U., Prayag A., Kuppusamy P. ve Kutala V.K., 2006. Protection Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Spirulina in Rats.*Cancer Chemother Pharmacol.*, 58(6): 802-808.

Moon Y.J., Wang X. ve Morris M.E., 2006. Dietary Flavonoids: Effects on Xenobiotic and Carcinogen Metabolism. *Toxicol In Vitro*, 20(2): 187-210.

Moore L.B., Goodwin B., Jones S.A., Wisely G.B., Serabjit-Singh C.J. ve Willson T.M., 2000. St. John's Wort Induces Hepatic Drug Metabolism Through Activation of the Pregnane X Receptor. *Proc. Natl Acad. Sci*., 97: 7500–7502.

Mosialou E., Ekstrom G., Adang A. E. P. ve Morgenstera R., 1993. Evidence that Rat Liver Microsomal Glutathione Transferase is Responsible for Glutathione-Dependent Protection Against Lipid Peroxidation. *Biochem. Pharmacoi*., 45: 1645-1651.

Murphy P. ve West C.A., 1969. The Role of Mixed Function Oxidases in Kaurene Metabolism in Echinocystis macrocarpa Green Endosperm. *Arch. Biochem. Biophys*., 133: 395–407.

Nash T., 1953. The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction. *Biochem. J*., 55: 416-421.

Nebert D.W., Adesnik M., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Levin W., Phillips I.R., Sato R. ve Waterman M.R., 1987. The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*, 6(1): 1-11.

Nebert D.W. ve McKinnon R.A., 1994. Cytochrome P450: Evolution and Functional Diversity. *Prog. Liver. Dis.*, 12: 63-97.

Nebert D.W., 1989. The Ah Locus: Genetic Differences in Toxicity, Cancer, Mutation and Birth Defects. *Curr.Rev.Tox*., 20: 153-174.

Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus L.C. ve Nebert D.W., 1996. P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.

Neve E.P. ve Ingelman-Sundberg M., 2010. Cytochrome P450 Proteins: Retention and

Distribution from the Endoplasmic Reticulum. *Curr. Opin Drug Discov. Devel.*, 13(1): 78-85.

Ohkawa H., Imaishi H., Shiota N., Yamada T., Inui H. ve Ohkawa Y., 1998. Molecular Mechanisms of Herbicide Resistance with Special Emphasis on Cytochrome P450 Monooxygenases. *Plant Biotechnology*, 15: 173-176.

Omura T. ve Sato R., 1964. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I.Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.*, 239: 2370-2378.

Onat T. ve Emerk K., 1996. *Karbohidratlar: Temel Biyokimya*. Emerk K., ed. Saray, İzmir. 289-409.

Otleş S. ve Pire R., 2001. Fatty Acid Composition of Chlorella and Spirulina Microalgae Species. *J. AOAC Int.*, 84(6): 1708-1714.

Parke D.V. ve Ioannides C., 1994. The Effects of Nutrition on Chemical Toxicity. *Drug Metab Rev.*, 26(4): 739-765.

Peng W.X., Li H.D. ve Zhou H.H., 2003. Effect of Daidzein on CYP1A2 Activity and Pharmacokinetics of Theophylline in Healthy Volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 59: 237-241.

Perez-Lopez M., Anglade P. ve Bec-Ferte M. P., 2000. Characterization of Hepatic and Extrahepatic Glutathione S- transferases in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) and Their Induction by 3,3 ',4,4 '-Tetrachlorobiphenyl. *Fish. Physiol. Biochem*., 22: 21-32.

Pinero Estrada J.E., Bermejo Bescos P. ve Villar del Fresno A.M., 2001. Antioxidant Activity of Different Fractions of Spirulina platensis Protean Extract. *Farmaco*, 56(5-7): 497-500.

Piscitelli S.C., Burstein A.H., Welden N., Gallicano K.D. ve Falloon J., 2002. The Effect of Garlic Supplements on the Pharmacokinetics of Saquinavir. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 234–238.

Premkumar K., Abraham S.K., Santhiya S.T. ve Ramesh A., 2004. Protective Effect of Spirulina fusiformis on Chemical-Induced Genotoxicity in Mice. *Fitoterapia*, 75(1): 24-31.

Rahman K., 2001. Historical Perspective on Garlic and Cardiovascular Disease. *J. Nutr.*, 131: 977S–979S.

Ramamoorthy A. ve Premakumari S., 1996. Effect of Supplementation of Spirulina on Hypercholesterolemic Patients. *J. Food. Sci. Technol*., 33: 124–128.

Rau S.E., Bend J.R., Arnold M.O., Tran L.T., Spence J.D. ve Bailey D.G., 1997. Grapefruit Juice-Terfenadine Single-Dose Interaction: Magnitude, Mechanism,

and Relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 61(4): 401-419.

Raucy J.L., Kraner J.C. ve Lasker J.M., 1993. Bioactivation of Halogenated Hydrocarbons by Cytochrome P4502E1. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23(1): 1-20.

Ray S., Roy K. ve Sengupta C., 2007. In vitro Evaluation of Protective Effects of Ascorbic Acid and Water Extract of Spirulina plantesis (blue green algae) on 5-Fluorouracil-Induced Lipid Peroxidation. *Acta Pol. Pharm*., 64(4): 335-344.

Rendic S. ve Guengerich F.P., 2012. Contributions of Human Enzymes in Carcinogen Metabolism. *Chem. Res. Toxicol.*, 25(7): 1316-1383.

Ronis M.J.J., Lindros K.O. ve Ingelman-Sundberg M., 1996. The CYP2E Subfamily, *in Cytochromes P450*: *Metabolic and Toxicological Aspects.* Ioannides C., Ed. CRC Press, New York. 211–239.

Rossi N., Derouiniot-Chaplain M., Jaouen P., Legentilhomme P. ve Petit I., 2008. Arthrospira platensis Harvesting with Membranes: Fouling Phenomenon with Limiting and Critical Flux. *Bioresour Technol.*, 99(14): 6162-6167.

Rouimi P., Anglade P., Debrauwer L. ve Tulliez J., 1996. Characterization of Pig Liver Glutathione S-Transferases Using HPLC-Electrospray-Ionization Mass Spectrometry. *Biochem. J.*, 317: 879-884.

Rowin J. ve Lewis S.L., 1996. Spontaneous Bilateral Subdural Hematomas Associated with Chronic Ginkgo biloba Ingestion. *Neurology*, 46: 1775–1776.

Ruschitzka F., Meier P.J., Turina M., Lüscher T.F. ve Noll G., 2000. Acute Heart Transplant Rejection due to Saint John's Wort. *Lancet*, 355(9203): 548-549.

Sangeetha R.K. ve Baskaran V., 2010. Retinol-Deficient Rats can Convert a Pharmacological Dose of Astaxanthin to Retinol: Antioxidant Potential of Astaxanthin, Lutein and β-carotene. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 88(10): 977-985.

Schenkman L.B. ve Cinti D.L., 1978. Preparation of Microsomes with Calsium. *Methods in Enzimology.*, 52: 83-89.

Selkirk J.A., Huberman E. ve Heidelberger C., 1971. An Epoxide is an Intermediate in the Microsomal Metabolism of the Chemical Carcinogen, Dibenz(a,h)anthracene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43: 1010–1016.

Sen A. ve Kirikbakan A., 2004. Biochemical Characterization and Distribution of Glutathione S-Transferases in Leaping Mullet (Liza saliens). *Biochemistry (Mosc)*, 69(9): 993-1000.

Sen A., Ulutas O.K., Tutuncu B., Ertas N. ve Cok I., 2010. Determination of 7-

Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Induction in Leaping mullet (Liza saliens) from the Highly Contaminated Aliaga Bay, Turkey. *Environ Monit Assess.*, 165(1-4): 87-96.

Shields P.G., Ambrosone C.B., Graham S., Bowman E.D., Harrington A.M., Gillenwater K.A., Marshall J.R., Vena J.E., Laughlin R., Nemoto T. ve Freudenheim J.L., 1996. A Cytochrome P4502E1 Genetic Polymorphism and Tobacco Smoking in Breast Cancer. *Mol Carcinogen*, 17: 144–150.

Shilter B., Perrin I., Cavin C. ve Hugget A.C., 1996. Placental Glutathione-S-Transferase (GST-P) Induction as a Potent Mechanism for the Anticarcinogenic Effect of the Coffee-Specific Components Cafestol and Kahweol. *Carcinogenesis*, 17(11): 2377- 2384.

Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y. ve Guengerich F.P., 1994. Interindividual Variations in Human Liver Cytochrome P-450 Enzymes Involved in the Oxidation of Drugs. Carcinogens and Toxic Chemicals: Studies with Liver Microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270: 414-423.

Shukla Y. ve Taneja P., 2002. Anticarcinogenic Effect of Black Tea on Pulmonary Tumors in Swiss albino Mice. *Cancer Lett.*, 176: 137-141.

Sijm D. T.H.M. ve Opperhuizen A., 1989. Biotransformation of Organic Chemicals by Fish: Enzyme Activities and Reactions, In: Hutzinger, O., Ed. *Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes* (Vol. 2E). Springer, Berlin. 163-235.

Sivaraman L., Leatham M.P., Yee J., Wilkens L.R., Lau A.F. ve Le Marchand L., 1994. CYP1A1 Genetic Polymorphisms and In Situ Colorectal Cancer. *Cancer Res.*, 54: 3692-3695.

Spigelski D. ve Jones P. J., 2001. Efficacy of Garlic Supplementation in Lowering Serum Cholesterol Levels. *Nutr. Rev.*, 59: 236–241.

Thomas H., Schladt L., Knehr M. ve Oesch F., 1989. Effect of Diabetes and Starvation on the Activity of Rat Liver Epoxide Hydrolases Glutathione-S-Transferases and Peroxisomal β-Oxidation. *Biochem. Pharmacol*., 38: 4291-4297.

Tomaszewski P., Kubiak-Tomaszewska G., Lukaszkiewicz J. ve Pachecka J., 2008. Cytochrome P450 Polymorphism-Molecular, Metabolic, and Pharmacogenetic Aspects. III. Influence of CYP Genetic Polymorphism on Dopulation Differentiation of Drug Metabolism Phenotype. *Acta Pol. Pharm.*, 65(3): 319-329.

Towbin H., Staehelin T. ve Gordon J., 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets; Procedure and Some Application. *Proc Nat Acad Sci USA*, 76: 4350-4354.

Townsend D.M. ve Tew K.D., 2003. The Role of Glutathione-S-Transferase in Anti-Cancer Drug Resistance. *Oncogene.*, 22(47): 7369-7375.

Trafalis D.T., Panteli E.S., Grivas A., Tsigris C. ve Karamanakos P.N., 2010. CYP2E1 and Risk of Chemically Mediated Cancers. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 6(3): 307-319.

Tsyrlov I.B., Mikhailenko V.M. ve Gelboin H.V., 1994. Isozyme- and Species-Specific Susceptibility of cDNA-Expressed CYP1A P-450s to Different Flavonoids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1205: 325-335.

Tümer T.B., Yilmaz D., Tanrikut C., Şahin G., Ulusoy G. ve Arinç E., 2010. DNA Repair XRCC1 Arg399Gln Polymorphism Alone, and in Combination with CYP2E1 Polymorphisms Significantly Contribute to the Risk of Development of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Res.*, 34(10): 1275-1281.

Ueng Y.F., Shimada T., Yamazaki H. ve Guengerich F.P., 1998. Aflatoxin B1 Oxidation by Human Cytochrome P450s. *J. Toxicol. Sci.*, 2: 132-135.

Vadiraja B.B., Gaikwad N.W. ve Madyastha K.M., 1998. Hepatoprotective Effect of C-Phycocyanin: Protection for Carbon Tetrachloride and R-(+)-Pulegone-Mediated Hepatotoxicty in Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249(2): 428-431.

Vang O., Frandsen H., Hansen K.T., Sørensen J.N., Sørensen H. ve Andersen O., 2001. Biochemical Effects of Dietary Intakes of Different Broccoli Samples. I. Differential Modulation of Cytochrome P-450 Activities in Rat Liver, Kidney, and Colon. *Metabolism*, 50(10): 1123-1129.

Viswanadha V.P., Sivan S. ve Rajendra Shenoi R., 2011. Protective Effect of Spirulina Against 4-Nitroquinoline-1-Oxide Induced Toxicity. *Mol. Biol. Rep.*, 38(1): 309-317.

Wang R.W., Newton D.J., Scheri T.D. ve Lu A.Y., 1997. Human Cytochrome P450 3A4-Catalyzed Testosterone 6-Beta-Hydroxylation and Erythromycin N-Demethylation. Competition During Catalysis. *Drug Metab. Dispos.*, 25: 502-507.

Wang Y., Chang C., Chou J., Chen H.L., Deng X., Harvey B.K., Caded J.L. ve Bickford P.C., 2005. Dietary Supplementation with Blueberries, Spinach, or Spirulina Reduces Ischemic Brain Damage. *Exp. Neurol.*, 193: 75–84.

Wargovich M.J., Woods C., Hollis D.M. ve Zander M.E., 2001. Herbals, Cancer

Prevention and Health. *J. Nutr.*, 131: 3034S–3036S.

Waterman M.H., 1996. Introduction: Transcription and Regulation of Activities of Cytochromes P450, Metabolizing Endogenous Substrates. *FASEB Journal (Bethesda, MD)*, 10: 1455.

Wentworth J.M., Agostini M., Love J., Schwabe J.W. ve Chatterjee V.K., 2000. St. John's Wort, a Herbal Antidepressant, Activates the Steroid X Receptor. *J. Endocrinol.*, 166: R11–R16.

Wright R.L., Harris K., Solow B., White R.H. ve Kennelly P.J., 1996. Cloning of a Potential Cytochrome P450 from the Archaeon sulfolobus solfataricus. *FEBS Lett.*, 384: 235–239.

Wrighton S.A. ve Stevens J.C., 1992. The Human Hepatic Cytochromes P450 Involved in Drug Metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, 22: 1–21.

Wu X., Amos C.I., Kemp B.L., Shi H., Jiang H., Wan Y. ve Spitz M.R., 1998. Cytochrome P450 2E1 DraI Polymorphism in Lung Cancer in Minority Populations. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 7: 13–18.

Zendehdel K., Bahmanyar S., McCarthy S., Nyren O., Andersson B. ve Ye W., 2009. Genetic Polymorphisms of Glutathione S-Transferase Genes GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and Risk of Esophageal and Gastric Cardia Cancers. *Cancer Causes Control.*, 20(10): 2031-2038.

Zhou S., Gao Y., Jiang W., Huang M., Xu A. ve Paxton J.W., 2003. Interactions of Herbs with Cytochrome P450. *Drug Metab Rev.*, 35(1): 35-98.

U.N. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Correspondance. June 8, 1993.

http://www.cyanotech.com/spirulina/analysis.html. Erişim tarihi: 15.04.2013.

http://fisheriesexploration.blogspot.com. Erişim tarihi: 30.08.2012.

http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/27. Erişim tarihi: 30.08.2012.

http://www.alibaba.com/product. Erişim tarihi: 29.08.2011.

http://drnelson.utmem.edu/ CytochromeP450.html. Erişim tarihi: 10.12.2012.

http://www.leinco.com/general_wb. Erişim tarihi: 01.09.12.

http://news.thomasnet.com/fullstory/Membrane-Sandwiches-make-western-blotting. Erişim tarihi: 02.09.2012.

ÇİZELGELER **Sayfa No**

Çizelge 1.1. Spirulina doğal preparatının bilinen fitokimyasal içeriği…….. 24

Çizelge 3.1. Deney hayvanları uygulama protokolü……. 30

Çizelge 3.2. NADPH, H^+ üretim sistemi reaksiyon karışımı…… 34

Çizelge 3.3. Sıçan karaciğerinde kafein N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği……... 34

Çizelge 3.4. Sıçan karaciğerinde anilin 4-hidroksilaz aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği……... 36

Çizelge 3.5. Sıçan karaciğerinde eritromisin N-demetilaz aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği……... 38

Çizelge 3.6. Sıçan karaciğer sitozollerinde total GST aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği…….. 39

Çizelge 3.7. Sıçan karaciğer sitozollerinde GST Mu aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği……..... 40

Çizelge 3.8. Sıçan karaciğer sitozollerinde GST Pi aktivitesinin belirlenmesi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği……..... 41

Çizelge 3.9. SDS-PAGE sıkıştırıcı ve ayrıştırıcı jellerin bileşenleri……...… 42

Çizelge 3.10. Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi için hazırlanan substrat solüsyonu……..... 44

Çizelge 3.11. Yarı kantitatif PZR yönteminde kullanılan sitokrom P450 izozimlerinin primer dizileri……...…… 47

Çizelge 3.12. cDNA amplifikasyonu için hazırlanan PZR karışımı……. 48

Çizelge 4.1. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının vücut ve doku ağırlıkları……..……..... 50

Çizelge 4.2. Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının 35 günlük yem tüketimleri……. 51

Çizelge 4.3. Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının 35 günlük su tüketimleri…… 53

Çizelge 4.4.Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal fraksiyonların protein değerleri ……...……...….. 55

Çizelge 4.5. Spirulina uygulaması yapılan deney hayvanlarının karaciğer dokularından elde edilen sitozolik fraksiyonların protein değerleri…….. 55
Çizelge 4.6. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku mikrozomlarındaki kafein N-demetilaz spesifik aktiviteleri…..…... 57
Çizelge 4.7. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz spesifik aktiviteleri…… 59
Çizelge 4.8. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku mikrozomlarındaki eritromisin N-demetilaz spesifik aktiviteleri…. 61
Çizelge 4.9. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku sitozollerinde total GST-CDNB aktiviteleri……..…… 63
Çizelge 4.10. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku sitozollerinde GST Mu- DCNB aktiviteleri...……..... 65
Çizelge 4.11. Spirulina uygulaması yapılan sıçanların karaciğer doku sitozollerinde GST Pi- EA aktiviteleri…...……..... 67
Çizelge 4.12. CYP1A2, CYP2E1, CYP3A1 izozimleri için mRNA, protein ve enzim aktivitesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan tüm değişiklikler…...…….. 79

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1.1. *Spirulina platensis* türünün mikroskobik görüntüsü……..... 2

Şekil 1.2. Spirulina' nın terapötik özellikleri…… 4

Şekil 1.3. Piyasada toz kapsül ve tablet halinde bulunan Spirulina doğal preparatları……..... 5

Şekil 1.4. Ksenobiyotiklerin Faz I ve Faz II metabolizması……...……. 6

Şekil 1.5. CYP izozimlerininin ksenobiyotiklerin Faz I metabolizmasında dağılımları……..……. 7

Şekil 1.6. Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sisteminin endoplazmik retikulumdaki lokalizasyonu……...……..... 7

Şekil 1.7. Sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenazların katalizlediği genel reaksiyon……. 8

Şekil 1.8. Sitokrom P450 enzimlerini ekspresyonlarını etkileyen bazı faktörler……... 11

Şekil 1.9. CYP1A2 izoziminin bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri….. 14

Şekil 1.10. CYP2E1 izoziminin bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri… 16

Şekil 1.11. CYP3A4 izoziminin bazı substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri… 17

Şekil 1.12. GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi……..... 18

Şekil 1.13. GSH konjugatının oluşumu……..… 19

Şekil 1.14. GST enzimlerinin bazı substratları…….. 20

Şekil 3.1. Kafein N-demetilasyonu…… 33

Şekil 3.2. Anilin 4-hidroksilasyonu……... 35

Şekil 3.3. Eritromisin N-demetilasyonu……..... 37

Şekil 3.4. Glutatyon S-transferaz aktivitesi……... 39

Şekil 3.5. Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi…….. 41

Şekil 3.6. Western blot analizinde sandviç hazırlanması……..... 43

Şekil 4.1. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının 35 günlük yem tüketimlerinin karşılaştırılması…….. 52

Şekil 4.2. Kontrol ve doz gruplarında bulunan deney hayvanlarının 35 günlük su tüketimlerinin karşılaştırılması…….. 54

Şekil 4.3. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer mikrozomlarında kafein N- demetilaz aktivitelerinin karşılaştırılması.... 58

Şekil 4.4. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer mikrozomlarında anilin 4-hidroksilaz aktivitelerinin karşılaştırılması…. 60

Şekil 4.5. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer mikrozomlarında eritromisin N-demetilaz aktivitelerinin karşılaştırılması……. 62

Şekil 4.6. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer sitozollerinde total GST-CDNB aktivitelerinin karşılaştırılması……. 64

Şekil 4.7. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer sitozollerinde GST Mu-DCNB aktivitelerinin karşılaştırılması…….. 66

Şekil 4.8. Farklı dozlarda Spirulina doğal preparatı uygulanan sıçan karaciğer sitozollerinde GST Pi-EA aktivitelerinin karşılaştırılması……... 68

Şekil 4.9. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina' nın CYP1A2 izoziminin protein düzeyine olan etkileri…… 69

Şekil 4.10. Spirulina'nın CYP1A2 izoziminin protein düzeyine olan etkilerinin karşılaştırılması……..... 69

Şekil 4.11. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın CYP2E1 izoziminin protein düzeyine olan etkileri……...…. 70

Şekil 4.12. Spirulina'nın CYP2E1 izoziminin protein düzeyine olan etkilerinin karşılaştırılması……..... 70

Şekil 4.13. Farklı dozlarda uygulanan Spirulina'nın CYP3A1 izoziminin protein düzeyine olan etkileri……..... 71

Şekil 4.14. Spirulina'nın CYP3A1 izoziminin protein düzeyine olan etkilerinin karşılaştırılması……... 72

Şekil 4.15. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP1A2 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkileri……..... 73

Şekil 4.16. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP1A2 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkisinin uygulama grupları ve kontrol arasında karşılaştırılması……... 73

Şekil 4.17. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP2E1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkileri……..... 74

Şekil 4.18. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP2E1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkisinin uygulama grupları ve kontrol arasında karşılaştırılması……... 75

Şekil 4.19. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP3A1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkileri……..... 76

Şekil 4.20. Spirulina'nın sıçan karaciğerinde CYP3A1 izoziminin mRNA seviyesi üzerine etkisinin uygulama grupları ve kontrol arasında karşılaştırılması……... 76

Şekil 4.21. Sıçan karaciğer mikrozomlarında KND, ANH, END aktivitelerinin karşılaştırılması……..…… 81

Şekil 4.22. Sıçan karaciğer sitozollerinde GST-CDNB, GST Mu-DCNB, GST Pi-EA aktivitelerinin karşılaştırılması……..……... 85

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı : Seda SAVRANOĞLU
Doğum Yeri : MANİSA
Doğum Tarihi : 02.01.1989

EĞİTİM DURUMU:

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi :Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ:

a)Yayınlar -SCI –Diğer:

Seda Savranoglu, Tugba Tumer. Inhibitory Effects of Dietary Supplement Spirulina on Carcinogen Activating Cytochrome P450 Isozymes and Potential for Drug Interactions, International Journal of Toxicology, 2013 (Basım aşamasında).

Tugba Boyunegmez Tumer, Seda Savranoglu, Gülsüm Terzioglu, Alaattin Sen, Sevki Arslan. Role of different GST Genotypes in the Modulation of MN Frequency among Agricultural Workers Occupationally Exposed to Pesticides from Denizli, Turkey. The International Archives of Occupational and Environmental Health, 2013 (Under review).

b) Bildiriler- Uluslararası- Ulusal:

Tugba Boyunegmez Tumer, Seda Savranoglu, Pelin Atmaca, Alaattin Sen, Sevki Arslan. Role of Genetic Polymorphism of DNA Repair Gene XRCC1 in the Modulation of DNA Damage in Farmers Occupationally Exposed to Pesticides: A Preliminary Study from Denizli, Turkey. The 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations and 12th European ISSX Meeting (June 17 – 21, 2012) Programs.

c) Katıldığı Projeler:

-Proje Adı: Sera İşçilerinde Pestisit Metabolizması ve DNA Tamirinde Rol Alan Genlerdeki Polimorfizmler ile Sitogenetik Hasar Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi (2010/113), ÇOMÜ-BAP Araştırma projesi, 2010-2013 (Araştırmacı).

-Proje Adı: Spirulina Doğal Preparatının Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Moleküler Düzeyde Aydınlatılması (111T582), TUBİTAK Hızlı destek Programı 1002, 2011-2012 (Bursiyer).

- Proje Adı: Diyetsel Takviye Spirulina'nın Sıçan Karaciğer Faz II Enzimleri ile *İn Vivo* Etkileşimi (2012-024), ÇOMÜ-BAP lisansüstü tez projesi, 2012-2013 (Araştırmacı).

İLETİŞİM:

E-posta Adresi: sedasavranoglu@gmail.com