

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Spirulina platensis* ' in ANTIOKSİDAN  
ÜRETİMİNİN İNDÜKLENMESİ VE  
KARACİĞER KORUYUCU ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
DOKTORA TEZİ**

**R. AYSUN KEPEKÇİ  
EKİM 2011**

***Spirulina platensis* ' in Antioksidan Üretiminin  
İndüklenmesi ve Karaciğer Koruyucu  
Etkisinin İncelenmesi**

**Gaziantep Üniversitesi  
Biyoloji Bölümü  
Doktora Tezi**

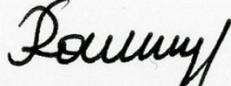
**Danışman  
Prof. Dr. Saadet Demirörs SAYGIDEĞER**

**R. Aysun KEPEKÇİ  
Ekim 2011**

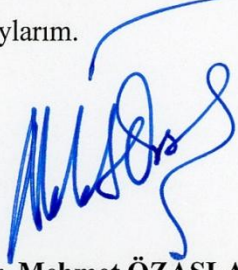
T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: *Spirulina platensis*'in Antioksidan Üretiminin İndüklenmesi ve Karaciğer Koruyucu Etkisinin İncelenmesi  
Öğrencinin, Adı Soyadı: **Remziye Aysun KEPEKÇİ**  
Tez Savunma Tarihi: **21 Ekim 2011**

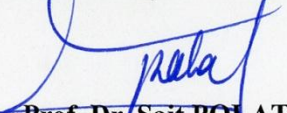
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

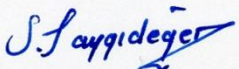
  
Prof. Dr. Ramazan KOÇ  
FBE Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.

  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Sait POLAT  
İkinci Tez Danışmanı

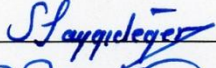
  
Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

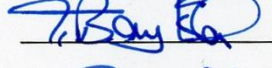
Jüri Üyeleri:

İmzası

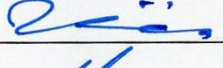
Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER



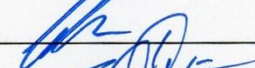
Prof. Dr. Tülin BAYKAL



Prof. Dr. Zerrin SÖYLEMEZ



Doç. Dr. Canan CAN



Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL



## ÖZET

### ***Spirulina platensis* ' in ANTIOKSİDAN ÜRETİMİNİN İNDÜKLENMESİ VE KARACİĞER KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

KEPEKÇİ, Remziye Aysun  
Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Saadet Demirörs Saygıdeğer  
Ekim 2011, 114 sayfa

Bu çalışmada, oksidatif strese cevap olarak *Spirulina platensis*'de iki basamaklı kesikli kültürasyon yöntemiyle antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif moleküllerin miktarını arttırmak ve bu yolla üretilen kültürün karaciğer koruyucu etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır. Işık şiddeti antioksidan üretiminde çevresel uyarıcı olarak kullanılmıştır. Düşük ışık şiddetinden yüksek ışık şiddetine ani değişimin, *S. platensis*'in fenolik bileşik üretimi, antioksidan aktivitesi, büyümesi ve biyokütle içeriği üzerindeki etkisi incelenmiştir. Artan ışık şiddetine paralel olarak total karbonhidrat, fikosiyanın, karotenoid, malondialdehit miktarlarının ve antioksidan aktivitelerin arttığı, total protein miktarlarının ise önemli oranda azaldığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çeşitli biyolojik aktivitelere sahip önemli sekonder metabolitler olarak kabul edilen fenolik bileşiklerin miktarının yaklaşık 8 kat arttığı bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Total fenolik madde miktarları ile antioksidan aktiviteler arasındaki ilişki % 99'luk güven aralığında önemli oranda ( $p<0,01$ ) birbirleri ile ilişkili bulunmuştur ki bu durum fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerin en büyük katkı sağlayıcıları olduklarını göstermektedir. Antioksidan aktivitesi artmış *S. platensis* biyokütlesinin  $CCl_4$ 'ün indüklediği akut karaciğer hasarına karşı karaciğer koruyucu etkisinin daha çok olduğu histolojik olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar, antioksidan aktivitesi artırılan *S. platensis*' in sentetik antioksidanların yerine güvenilir bir alternatif ve serbest radikallerin tetiklediği hastalıklar için potansiyel bir terapötik ajan kaynağı olabileceğini önermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *S. platensis*, antioksidan aktivite, fenolik bileşikler, karaciğer

## ABSTRACT

### INDUCEMENT OF ANTIOXIDANT PRODUCTION OF *Spirulina platensis* AND THE INVESTIGATION OF ITS HEPATOPROTECTIVE EFFECT

KEPEKÇİ, Remziye Aysun  
Ph.D. Thesis, In Biology  
Supervisor: Saadet Demirörs Saygıdeğer  
October 2011, 114 pages

In this study, we aimed to increase the amount of bioactive molecules with antioxidant activity in *Spirulina platensis* as a response to oxidative stress by a two-step batch mode cultivation and evaluate the hepatoprotective effect of *S. platensis* cultures grown by this way. Light intensity was used as an environmental inducer in antioxidant production. The investigation of the effect of the sudden shift from low light to high light intensity on phenolic compound production, antioxidant activity, growth, and biomass composition of *S. platensis* was undertaken. It was found that total amounts of carbohydrate, phycocyanin, carotenoid, malondialdehyde and antioxidant activities were significantly increased while total protein amounts were decreased ( $p<0,05$ ) correspondingly to the increased light intensity. The amount of phenolic compounds which are regarded as important seconder metabolites with various biological activities was significantly increased by approximately eightfold ( $p<0,01$ ). The relationships between antioxidant activities and total amounts of phenolic compounds were significantly correlated at the 99% confidence level ( $p<0,01$ ) indicating that phenolic compounds were major contributors of antioxidant activities. It was observed histologically that *S. platensis* biomass with increased antioxidant activity had more hepatoprotective effect against  $\text{CCl}_4$  induced acute liver injury. These results suggest that *S. platensis* with enhanced antioxidant activity could be a safe alternative to synthethic antioxidants and also potential candidate source of therapeutic agent for diseases induced by free radicals.

**Key words:** *S. platensis*, antioxidant activity, phenolic compounds, liver

## **TEŞEKKÜR**

Doktora eğitimim süresince tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında bilgi ve desteğini benden esirgemeyen, her konuda beni destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER'e;

Doktora çalışmalarım boyunca bana her zaman vakit ayıran, elektron mikroskopisi alanındaki engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve bu alanda gelişmemi sağlayan, verdiği maddi ve manevi destekle tez çalışmalarımın tamamlanmasında büyük katkısı olan ikinci danışman hocam Prof. Dr. Sait POLAT'a;

Tez çalışmalarımı takip ederek değerli bilgileri ile yol gösteren tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Prof. Dr. Tülin BAYKAL'a ve Doç. Dr. Canan CAN'a;

Doktora çalışmalarımda bana destek olan çok değerli arkadaşlarım Uzman Biyolog Fatih DENİZ'e, Dr. Nuray BAYAT'a, Dr. Önder YUMRUTAŞ'a ve Dr. Hilal ÖZKILINÇ'a;

Yaşamım boyunca bana her zaman güvenen, verdikleri maddi ve manevi destekle hep yanımda olan sevgili aileme;

Doktora çalışmalarım sürecinde bana manevi destek veren tüm dostlarıma;

En içten duygularıyla teşekkür ediyorum...

Remziye Aysun KEPEKÇİ

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Özet	i
Abstract	ii
Teşekkür	iii
İçindekiler	iv
Şekiller Listesi	viii
Tablolar Listesi	xi
Simgeler ve Kısaltmalar Listesi	xii
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş	1
1.2. Genel Bilgiler	6
1.2.1. Serbest Radikaller	6
1.2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	6
1.2.1.1.1. Tekli (singlet) Oksijen	7
1.2.1.1.2. Süper Oksit Radikali	7
1.2.1.1.3. Hidrojen Peroksit	8
1.2.1.1.4. Hidroksil Radikali	8
1.2.2. Bitkilerde ROT Üretimine Katılan Fizyolojik Süreçler	9
1.2.2.1. Fotosentez ve Fotosolunum	9
1.2.2.2. Solunum ve Diğer Oksidazlar	12
1.2.2.3. Çevresel Stres Süresince Rot Üretimi	13
1.2.2.3.1. Yüksek Işık Stresi	14
1.2.3. Memelilerde ROT Üretimine Katılan Fizyolojik Süreçler	16
1.2.3.1. Karaciğer	17
1.2.3.1.1. Karaciğerin Fonksiyonları	18
1.2.3.1.1.1. Karaciğerin Metabolik Fonksiyonları	18
1.2.3.1.1.2. Karaciğerin Detoksifikasyon Fonksiyonu	22

1.2.3.1.1.2.1. Faz 1 Reaksiyonları	22
1.2.3.1.1.2.2. Faz 2 Reaksiyonları	24
1.2.3.1.2. Karaciğerin Histolojik Yapısı	24
1.2.3.2. Karbon Tetraklorür ve Etki Mekanizması	27
1.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	28
1.2.4.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri	28
1.2.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	30
1.2.4.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	30
1.2.5. Antioksidan Savunma Sistemi	30
1.2.5.1. Bitkilerde Rot Detoksifikasyonu	32
1.2.5.1.1. Enzimatik Mekanizmalar	32
1.2.5.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	32
1.2.5.1.1.2. Askorbat Peroksidaz	32
1.2.5.1.1.3. Katalaz	34
1.2.5.1.1.4. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	34
1.2.5.1.1.5. Glutasyon redüktaz	34
1.2.5.1.1.6. Glutasyon-S-Transferazlar(GST)	34
1.2.5.1.1.7. Mitokondriyal sitokromoksidaz	34
1.2.5.1.2. Diğer Enzimatik Olmayan Mekanizmalar	35
1.2.5.1.2.1. Vitamin C (askorbikasit)	35
1.2.5.1.2.2. Vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol)	35
1.2.5.1.2.3. Glutasyon (GSH)	35
1.2.5.1.2.4. Karotenoidler	36
1.2.5.1.2.5. Demir şelatörleri	36
1.2.5.1.2.6. Fenolik Bileşikler	36
1.2.6. <i>Spirulina platensis</i>	39
1.3. Literatür özeti	43
BÖLÜM 2: MATERYAL VE METOD	47
2.1. Materyal	47
2.1.1. <i>S.platensis</i>	47
2.1.2. <i>Wistar albino</i>	47
2.2. Metod	47
2.2.1. Kültür Ortamı	47



2.2.3. Deney Ortamı ve Düzenegi	48
2.2.4. Büyüme Kinetigi	49
2.2.5. Kültürlerin Hasat Edilmesi	49
2.2.6. Biyokütle Analizi	49
2.2.6.1. Total Karbonhidrat ve Protein Miktarlarının Ölçülmesi	49
2.2.6.1.1. Total Karbonhidrat ve Protein Miktarlarının Ölçülmesi İçin Özüt Hazırlanması	49
2.2.6.1.2. Total Karbonhidrat Miktarının Ölçülmesi	50
2.2.6.1.3. Total Protein Miktarının Ölçülmesi	50
2.2.6.2. Total Fikosiyanin Miktarının Ölçülmesi	51
2.2.6.3. Total Klorofil ve Karotenoid Miktarının Ölçülmesi	51
2.2.6.3.1. Total Klorofil ve Karotenoid Miktarı için Özüt Hazırlanması	51
2.2.6.3.2. Total Klorofil ve Karotenoid Miktarının Ölçülmesi	51
2.2.6.4. Total Fenolik Bileşik Miktarının Ölçülmesi	51
2.2.7. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi	52
2.2.8. <i>In vitro</i> Antioksidan Testleri	53
2.2.8.1. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Temizleme Deneyi	53
2.2.8.2. ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesinin Tespiti	54
2.2.8.3. İndirgeme Gücü Tayini	54
2.2.9. Ratlarda CCl <sub>4</sub> ile İndüklenmiş Akut Karaciğer Hasar Modeli Oluşturulması	55
2.2.10. Işık Mikroskopik Doku Takip Yöntemi	56
2.2.11. Elektron Mikroskopik Doku Takip Yöntemi	56
2.2.12. İstatistiksel Analizler	58
<b>BÖLÜM 3: BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	<b>59</b>
3.1. Biyokütle Yoğunluğunun Hesaplanması İçin Standart Eğrinin oluşturulması	59
3.2. Deney Ortamı ve Düzenegi	59
3.3. Büyüme Kinetigi	60
3.4. Biyokütle Analizi	62
3.4.1. Total Karbonhidrat ve Protein Miktarları	62
3.4.1.1. Total Karbonhidrat Miktarları	62

3.4.1.2. Total Protein Miktarları	63
3.4.2. Total Klorofil ve Karotenoid Miktarları	63
3.4.3. Total Fikosiyanin Miktarları	64
3.4.4. Total Fenolik Bileşik Miktarları	64
3.5. Malondialdehit (MDA) Miktarları	65
3.6. <i>In vitro</i> Antioksidan Aktivite Testleri	70
3.6.1. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Temizleme Deneyi	70
3.6.2. ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesi	70
3.6.3. İndirgeme Gücü Tayini	71
3.7. Fenolik Madde Miktarı ile Diğer Parametrelerin Korelasyonunun Araştırılması	72
3.8. Işık Mikroskobu Bulguları	75
3.9. Elektron Mikroskobu Bulguları	84
BÖLÜM 4: SONUÇLAR VE ÖNERİLER	95
BÖLÜM 5: KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	113

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.1.</b> Tilakoid zarlarda elektronların ve protonların taşınması	10
<b>Şekil 1.2.</b> Bitkilerde Reaktif Oksijen Türlerinin uzaklaştırılması	12
<b>Şekil 1.3.</b> Bitkilerde ROT oluşumuna yol açan ekzojen etkenler	13
<b>Şekil 1.4.</b> Foton yakalama, ışık zararlarından korunma ve ışıktan kaynaklanan zararın onarımının düzenlenmesi	15
<b>Şekil 1.5.</b> Hücre zedelenmesinde oksijenin rolü	17
<b>Şekil 1.6.</b> Billirubin metabolizması ve eliminasyonu	21
<b>Şekil 1.7.</b> Karaciğerin yapısı	25
<b>Şekil 1.8.</b> Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin ve antioksidan mekanizmaların oluşumu	31
<b>Şekil 1.9.</b> Su-su döngüsü	33
<b>Şekil 1.10.</b> Askorbat-Glutasyon döngüsü	33
<b>Şekil 1.11.</b> Bitkisel fenoliklerin sentezleri	37
<b>Şekil 1.12.</b> Hawai’de (a) ve Kaliforniya’da (b) bulunan <i>Spirulina</i> üretim tesisleri	43
<b>Şekil 3.1.</b> İnkübasyondan 120 saat sonra farklı ışık şiddetleriyle inkübe edilen <i>S. platensis</i> kültürlerinin zamana (saat) karşı değişen biyokütle ( $g L^{-1}$ ) yoğunlukları	60
<b>Şekil 3.2.</b> Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen <i>S. platensis</i> kültürlerinin biyokütle içerikleri	66
<b>Şekil 3.3.</b> Negatif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 1) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (4X10)	76
<b>Şekil 3.4.</b> Negatif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 1) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (10X10)	77
<b>Şekil 3.5.</b> Pozitif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 2) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (4X10)	78

<b>Şekil 3.6.</b>	Pozitif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 2) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (10X10)	78
<b>Şekil 3.7.</b>	Pozitif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 2) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40X10)	79
<b>Şekil 3.8.</b>	Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş <i>S. platensis</i> biyokütlesi verilmiş ratlardan (Grup 3) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (20X10)	80
<b>Şekil 3.9.</b>	Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş <i>S. platensis</i> biyokütlesi verilmiş ratlardan (Grup 3) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40X10)	80
<b>Şekil 3.10.</b>	Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş <i>S. platensis</i> biyokütlesi verilmiş ratlardan (Grup 3) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40X10)	81
<b>Şekil 3.11.</b>	Bir ay boyunca antioksidan içeriği artırılmış <i>S. platensis</i> biyokütlesi verilen ratlardan (Grup 4) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (4X10)	82
<b>Şekil 3.12.</b>	Bir ay boyunca antioksidan içeriği artırılmış <i>S. platensis</i> biyokütlesi verilen ratlardan (Grup 4) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40X10)	83
<b>Şekil 3.13.</b>	Negatif kontrol grubundaki (Grup 1) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X15000)	84
<b>Şekil 3.14.</b>	Negatif kontrol grubundaki (Grup 1) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X25000)	85
<b>Şekil 3.15.</b>	CCl <sub>4</sub> ile akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubuna (Grup 2) ait ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X8000)	86
<b>Şekil 3.16.</b>	CCl <sub>4</sub> ile akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubuna (Grup 2) ait ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X15000)	87
<b>Şekil 3.17.</b>	Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş <i>S. platensis</i> biyokütlesi verilmiş ratların (Grup 3) karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X8000)	88

- Şekil 3.18.** Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi verilmiş ratların (Grup 3) karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X8000) 89
- Şekil 3.19.** Bir ay boyunca antioksidan içeriği artırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen (Grup 4) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X20000) 90
- Şekil 3.20.** Bir ay boyunca antioksidan içeriği artırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen (Grup 4) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X15000) 91

## TABLULAR LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.1.</b> Bitkilerde ROT üretimine katılan fizyolojik süreçler ve bölgeler	9
<b>Tablo 1.2.</b> <i>S. platensis</i> 'in biyokimyasal kompozisyonu	41
<b>Tablo 2.1.</b> <i>Spirulina</i> besi ortamı	48
<b>Tablo 3.1.</b> Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen <i>S. platensis</i> kültürlerinin büyüme oranları ( $\mu$ ), produktiviteleri ( $\text{mg gün}^{-1}$ )	61
<b>Tablo 3.2.</b> Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen <i>S. platensis</i> kültürlerinin metanol özütlerinin <i>in vitro</i> antioksidan aktiviteleri	71
<b>Tablo 3.3.</b> Fenolik madde miktarı ile araştırma kapsamında incelenen diğer parametreler arasındaki ilişkinin Pearson korelasyon katsayıları ve p değerleri	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AAE</b>	: Askorbik Asit Eşdeğeri
<b>AAPH</b>	: 2,2,-azobis2-amidinopropan dihidroklorit
<b>ABS</b>	: Absorbans
<b>ABTS</b>	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonik asit)
<b>ACMA</b>	: Beslenme Bozukluklarına Karşı Algokültür ile Mücadele Kurumu
<b>ALT</b>	: Alanin Aminotransferaz
<b>AsA</b>	: Askorbik Asit
<b>Asetil CoA</b>	: Asetil Koenzim A
<b>AST</b>	: Aspartat Aminotransferaz
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>BHA</b>	: Butil Hidroksi Anilin
<b>BHT</b>	: Butil Hidroksi Toluen
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>°C</b>	: Celsius Santigrad
<b>CCl<sub>3</sub>•</b>	: Triklorometil Radikali
<b>CCl<sub>4</sub></b>	: Karbon Tetraklorür
<b>CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>•</b>	: Triklorometil Peroksit Radikali
<b>cm<sup>3</sup></b>	: Santimetreküp
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DDSA</b>	: 2,Dodesenilsuksinik Asit Anhidrit
<b>DPPH</b>	: 2,2-Difenilpikrilhidrazil
<b>EPA</b>	: Çevre Koruma Dairesi
<b>ETZ</b>	: Elektron Transport Zinciri
<b>FADH<sub>2</sub></b>	: Flavin Adenin Dinükleotid (indirgenmiş)
<b>FS I :</b>	: Fotosistem 1
<b>FS II</b>	: Fotosistem 2
<b>g</b>	: Gram
<b>GAE</b>	: Gallik Asit Eşdeğeri
<b>GER</b>	: Granüllü Endoplazmik Retikulum

<b>GMP</b>	: İyi Üretim Uygulamaları
<b>GSSG</b>	: Okside Glutasyon
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GST</b>	: Glutasyon S Transferaz
<b>HDL</b>	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<b>HIV-1</b>	: İnsan İmmün Yetmezlik Virusü Tip 1
<b>HO<sub>2</sub>•</b>	: Perhidroksi Radikali
<b>IC<sub>50</sub></b>	: % 50 İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>L•</b>	: Lipit Serbest Radikalleri
<b>L</b>	: Litre
<b>LA</b>	: Linoleik Asit
<b>LOO•</b>	: Lipit Peroksit Radikalleri
<b>M</b>	: Molar (mol / litre)
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>m<sup>2</sup></b>	: Metrekare
<b>mm<sup>3</sup></b>	: Milimetreküp
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesaj Taşıyan Ribonükleik Asit
<b>NADP</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>NASA</b>	: Amerikan Uzay ve Havacılık Dairesi
<b>NO•</b>	: Nitrik Oksit
<b>NO<sub>2</sub>•</b>	: Azot Dioksit
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Nitrit
<b>NO<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	: Nitronyum İyonu
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>O<sub>2</sub>•<sup>-</sup></b>	: Süperoksit Radikali
<b>O<sub>2</sub><sup>1</sup></b>	: Tekli Oksijen
<b>OH•</b>	: Hidroksil Radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit



<b>P</b>	: Prodüktivite
<b>PAL</b>	: Fenilalanin Amonyum Liyaz
<b>PGE</b>	: Prostaglandin E
<b>R•</b>	: Karbon Merkezli Organik Radikaller
<b>R<sup>2</sup></b>	: Regresyon Belirleme Katsayısı
<b>RO•</b>	: Alkoksi Radikalleri
<b>ROO•</b>	: Peroksit Radikalleri
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RS•</b>	: Tiyil Radikalleri
<b>RSO•</b>	: Sülfenil Radikalleri
<b>RSO<sub>2</sub>•</b>	: Tiyil Peroksit Radikalleri
<b>RUBİSCO</b>	: Ribuloz 1,5 Bifosfat Karboksilaz Oksijenaz
<b>RuBP</b>	: Ribuloz 1,5 Bifosfat
<b>rpm</b>	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
<b>s</b>	: Saniye
<b>SER</b>	: Granülsüz Endoplazmik Retikulum
<b>SD</b>	: Standart Sapma
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik Asit
<b>TBARS</b>	: Thiobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri
<b>TGF-β</b>	: Değiştirici Büyüme Faktörü Beta
<b>TCA</b>	: Trikloroasetik Asit
<b>TEM</b>	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>UDP</b>	: Üridin Difosfat
<b>V<sub>max</sub></b>	: Maksimum Reaksiyon Hızı
<b>X<sub>max</sub></b>	: Maksimum Biyokütle Konsantrasyonu
<b>μ (h<sup>-1</sup>):</b>	: Bir Saatteki Büyüme Oranı
<b>μmol</b>	: Mikromol
<b>μM</b>	: Mikromolar

## BÖLÜM 1

### 1.1. GİRİŞ

Serbest radikaller, en dış halkalarında eşlenmemiş elektron içeren ve diğer bileşiklerle reaksiyona girerek bir elektron alma eğilimi gösteren atom ya da atom gruplarıdır. Canlı sistemlerde serbest radikaller anabolik ve katabolik süreçler sonucunda endojen olarak oluşabileceği gibi, iyonize radyasyon, ışık (görünür/UV), redoks reaksiyonlarına giren ksenobiyotikler gibi çeşitli maddelerin tesiri ile ekzojen olarak da ortaya çıkabilirler (Grune, 2005).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Moleküler oksijen, paralel spin durumlu iki eşleşmemiş elektrona sahiptir ve bu biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede Reaktif Oksijen Türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir. Kısaca ROT olarak adlandırılan bu moleküller arasında süperoksit, peroksil, hidroksil, alkoksil, nitrik oksit radikalleri gibi serbest radikallerle hidrojen peroksit, lipit hidroperoksit, hipoklorik asit, tekli oksijen, azot dioksit gibi oksijen içeren reaktif moleküller de yer almaktadır. Bu moleküller, hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Olinescu ve Smith, 2002; Grune, 2005; Valko vd., 2007).

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Membranlarda lipit peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri (L•) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO•) oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Recknagel vd., 1989).

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein, sülfhidril grupları ve diğer amino asit grupları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur (Dalle vd., 2003; Stadtman, 2004). Proteinlerin serbest radikal zararından etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Molekülün ikincil ve üçüncül yapısı, dolayısıyla yüzeyindeki hidrofobik bölgeleri değişir. Hidrofobitesi artar. Bu tip proteinler elektrostatik olarak etkileşerek ve çapraz bağlar oluşturarak kümeleşmiş bir ağ yapısı ortaya koyar. Proteazomal sistem bu yapıları farkederek yıkıma uğrattır (Dean vd., 1997; Davies, 2005).

Protein oksidasyonu ile ilişkili hastalıklar arasında romatoid artrit, iskemi/reperfüzyon, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, masküler distrofi, hızlı yaşlanma sendromu, katarakt gibi hastalıklar yer alır. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda ise hücre hasarı oluşur (Dhalla vd., 2000; Halliwell, 2001; Sayre vd., 2001; Jenner, 2003).

Hücre içinde diğer moleküller ile hızla reaksiyona girip onların yapısını bozacak zincirleme reaksiyonları başlatarak hücre hasarına neden olan ROS ancak antioksidan moleküller tarafından çeşitli mekanizmalarla durdurulabilirler. Oksidan özellikteki ROS ile antioksidan moleküller arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıyla hücre hasarına sebebiyet veren oksidatif stres meydana gelir (Mittler, 2002; Sabatini vd., 2009).

Oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, merkezi sinir sistemi hastalıkları, kanser, alkolik karaciğer hastalığı, akut renal yetmezlik, yaşlanma, romatit artrit, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur. ROS'nin ilişkili olduğu tüm bu fizyolojik koşullar ve hastalıklarda serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının ise yetersiz kaldığı gösterilmiştir.

(Kukreja ve Hess, 1992; Dhalla vd., 2000; Finkel ve Holbrook, 2000; Sayre vd., 2001; Yamagishi vd.,2001; Jenner, 2003).

Hastalıkların patogeneğinde serbest radikallerin artışının ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliğinin rolü anlaşıldıkça yeni antioksidanların keşfi ve bunların bu hastalıklara karşı kullanımı son yıllarda birçok araştırmannın odağı haline gelmiştir.

Sentetik antioksidanların karsinogenizin promotoru olarak aktivite gösterebilmelerinden duyulan endişe neticesinde bu maddelerin gıda katkısı olarak kullanılmalarına karşı küresel boyutta bir memnuniyetsizlik gelişmiştir (Ito vd., 1986; Namiki, 1990). Bu durum sentetik antioksidanların yerine doğal ve güvenilir olan antioksidanların kullanımını gündeme getirmiştir. Bu doğrultuda, son dönemde doğal antioksidanların keşfedilmesine yönelik araştırmalar giderek artmakta ve alternatif tıp kapsamında antioksidan potansiyeli yüksek birçok bitkinin birçok hastalığa karşı kullanımını popüler hale gelmektedir.

Güçlü antioksidan özelliklere sahip yararlı pek çok metabolit içeren fotosentetik mikroalgler doğal antioksidan kaynakları arasında en çok ilgi çeken canlı grubudur. Bugün mikroalgler tarafından sentezlenen birçok metabolit farmasötik biyoteknoloji ve gıda bilimi alanlarında gelecek vaad etmektedir. Yüksek oranda protein, vitaminler, yağ asitleri ve diğer pek çok kıymetli besinleri içeren mikroalgler, insanlar tarafından eskiden beri sağlıklı gıda desteği olarak tüketildiğinden dolayı dünya pazarlarında önemli bir arza sahiptir (Pulz ve Gross, 2004; Singh vd., 2005; Spolaore vd., 2006).

Uzun zamandan beri yoğun bir şekilde üretimi yapılan en önemli mikroalglerden biri olan *Spirulina*, biyoteknolojik araştırmalarda önem taşıyan ve besin maddesi olarak tüketilebilen, ekolojik ve ekonomik değer taşıyan bir mikroalgdir. Farklı *Spirulina* türleri ile yapılan çalışmalar *Spirulina*'nın antikanser, antiviral, antibakteriyel, immün sistemi güçlendirici etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Ayehunie vd., 1998; Khan vd., 2005; Chen vd., 2005; Akao vd., 2009; Ranga vd., 2010).

Bilimsel çalışmalar farklı antioksidan özellikteki bileşiklerin sinerjistik aktivitesinin tek bir antioksidanın aktivitesinden çok daha etkili olduğunu ve doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanların sentetik olanlara göre daha fazla koruyucu etkiye ve

daha yüksek biyoyararlanıma sahip olduğunu bildirmiştir. Birçok araştırma *Spirulina platensis*'in içeriğindeki fikosiyanın, selenyum, karetenoidler, yağ asidi GLA ve fenolik bileşikler gibi çeşitli bileşenlerin önemli antioksidan özelliğinin olduğunu doğrulamıştır (Zhi-gang vd., 1997; Gershwin ve Belay, 2008).

Pek çok araştırma antioksidanların serbest radikalleri etkisizleştirerek hücrelerin zarar görmesine engel olduklarını ortaya koymuştur. Antioksidanlar yardımıyla hücre koruyucu tedavi, dejeneratif hastalıklardan korunmada önemlidir. Bu yüzden güçlü antioksidan potansiyele sahip olan *Spirulina* oksidatif stresin tetiklediği hastalıklar, inflamasyonlar, alerjiler ve hatta kanser için potansiyel bir terapötik ajan olarak öngörülmektedir (Yang vd., 1997; Kim vd., 1998; Hayashi vd., 1998; Miranda vd., 1998; Gonzalez vd., 1999; Estrada vd., 2001; Dasgupta vd., 2001; Chen vd., 2005; Wu vd., 2005).

Alkol ve diğer toksik maddelerin detoksifikasyon olayının meydana geldiği karaciğer, serbest radikal oluşumuna dolayısıyla da oksidatif stresin indüklediği hasara sıklıkla maruz kalır. Bugün klinikte başarılı sonuçlar veren birçok ilacın kullanımı hepatotoksisite oluşturduğu için sınırlıdır. Alkol metabolizmasının bir sonucu olarak alkolün indüklediği oksidatif stresin karaciğerde ciddi hasara yol açtığı bilinmektedir (Poli, 2000). Ayrıca son yıllarda artan miktarda pestisitler, metal iyonları ve aflatoksinler gibi mikotoksinler ile kontamine olan besinlerin hem direk olarak hem de besin zinciri yoluyla dolaylı yoldan tüketilmesi özellikle karaciğerde oksidatif strese neden olarak hasar oluşturmaktadır (Banerjee vd., 2001).

Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların gerçekleşmesi esnasında oluşabildiği gibi çeşitli ekzojen etkenlerin etkisi ile de oluşabilmektedir. Oksidatif hasar oluşturan ekzojen etkenlerden birisi de karbon tetraklorürdür (CCl<sub>4</sub>). CCl<sub>4</sub> uygulamasında en fazla etkilenen organ karaciğerdir.

Deneysel karaciğer harabiyeti oluşturulmasında karbon tetraklorür, klasik ve model bir hepatotoksidandır. CCl<sub>4</sub>, sitokrom P<sub>450</sub> tarafından serbest radikallere (triklorometil radikali, triklorometil peroksi radikali) çevrilmektedir. Oluşan bu radikaller lipit peroksidasyonunu başlatarak organın siroza doğru ilerleyen değişimlerine ve fonksiyon bozukluğuna neden olurlar (Sheweita vd., 2001; Torres Durán vd., 2006; Kumar vd., 1997; Mc Donald ve Garg, 2003; Wong vd., 2003; Jeon vd., 2003).

ROT tarafından oluşturulan lipit peroksidasyonunun hücre membranlarının hasara uğramasına ve membranların yapısal bütünlüğünün ve biyokimyasal fonksiyonlarının değişmesine neden olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla ultrayapı düzeyinde meydana gelen bu hasara karşı önerilen antioksidanların koruyucu etkisi de yine ultra yapı düzeyinde yapılan incelemelerle desteklenmelidir. Bugün birçok araştırmacı antioksidan aktivitenin tek bir yöntemle ölçülmesinin yeterli olmadığını savunmaktadır (Singh ve Singh, 2008). Literatürdeki bu konudaki çalışmalarda *Spirulina*'nın antioksidan aktivite tayini için sadece bir ya da iki *in vitro* antioksidan aktivite tayin yöntemi uygulanmıştır (Miranda vd., 1998; Bhat ve Madyastha, 2001; Wu vd., 2005).

Bazı mikroalg türlerinin çeşitli stres koşulları altında büyütülmesiyle (azot yetersizliği, yüksek ışık şiddeti, yüksek tuzluluk v.b.), hücre içinde kuvvetli antioksidan özelliklere sahip maddelerin biriktirilmesi sağlanabilir. Böylece mikroalg biyoteknoloji kapsamında, kültür koşullarında çeşitli parametrelerle oynanarak hücreler üzerinde çeşitli fizyolojik stresler yaratılabilir. Bu yolla kültüre alınan hücrelerin istenen ürünü daha fazla üretmesi sağlanabilir (Kobayashi, 2000; Bhandari ve Sharma, 2006; Malanga ve Puntarulo, 2006; Sabatini vd., 2009). Bu çalışma kapsamında yüksek ışık stresi uygulanarak *Spirulina platensis*'in antioksidan üretiminin indüklenmesi amaçlanmıştır.

Antioksidan üretimi indüklenmiş *S. platensis* kültüründen elde edilen biyokütlenin antioksidan aktivitesi farklı *in vitro* antioksidan aktivite testleri ile (ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesi, DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi, Fe İndirgeme Gücü Tayini) belirlenmiştir. Ayrıca ratlara intraperitoneal olarak verilen karbon tetraklorürün oluşturduğu serbest radikallerin karaciğer üzerinde yol açtığı hasar ve bu hasara karşı *S. platensis* biyokütlesinin ne şekilde bir koruyucu etki gösterdiği, transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) organın hücre ve hücre altı yapılarının incelenmesi yoluyla aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Spirulina*'nın antioksidan aktivitesinin karaciğer üzerindeki etkisi çoğunlukla ticari olarak satılan *Spirulina* tabletlerinin veya saflaştırılmış fikosiyaninin ratlara verilmesi yoluyla çoğunlukla şu yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır: *in vitro* mikrozomal lipit peroksidasyonunun inhibisyonunun ölçülmesi, karaciğer enzimlerinin ya da serum ve karaciğer

lipitlerinin, trigliserid, total kolesterol miktarının tespit edilmesi. Literatürde antioksidan üretimi indüklenmiş *S. platensis* kültürünün *in vivo*da karaciğer üzerindeki serbest radikallere karşı koruyucu etkisinin ultrayapısal düzeyde değerlendirildiği bir çalışma yoktur.

## 1.2. GENEL BİLGİLER

### 1.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller en dış halkalarında eşlenmemiş elektron içeren ve diğer bileşiklerle reaksiyona girerek bir elektron alma eğilimi gösteren atom ya da atom grublarıdır. Başlıca özellikleri şunlardır (Olinescu ve Smith, 2002);

- Stabil değildir.
- Çok kısa yarı ömürlüdürler.
- Çok reaktiftirler.
- Molekül ağırlıkları düşüktür.
- Hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler.

#### 1.2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Moleküler oksijenin elektron konfigürasyonu normalden farklıdır. Her biri  $\pi$  orbitalinde olan, paralel spinli 2 tane eşleşmemiş elektrona sahiptir. Bu yüzden de zemin düzleminde üçlü bir moleküldür. Bu durum, tüm elektronların eşleşmiş spinlerinin olduğu ikili zemin düzleminde bulunan hücredeki moleküllerin çoğuna terstir. Bu spin kısıtlanmasından dolayı moleküler oksijen ve moleküllerin çoğunun arasında tepkime gerçekleşmez (Dröge, 2002).

Bununla birlikte moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir. Bir spinini çevirerek tekli oksijen, bir, iki veya üç elektron alarak sırasıyla süperoksit radikali, hidrojen peroksit veya hidroksil radikali oluşturabilir (Akkuş, 1995). Reaktif Oksijen Türleri (ROT) olarak adlandırılan bu oksijen türleri moleküler oksijenin tersine çok reaktiftirler. Hücreler, hücresel birimleri oksidatif strese koruma amacıyla, başta en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikalleri olmak üzere fazla reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmak için etkin mekanizmalara sahip olmak zorundadırlar (Grune, 2005).

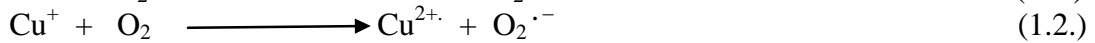
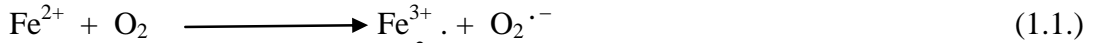
Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler. Ayrıca hücrede karbon merkezli organik radikaller (R<sup>•</sup>), peroksit radikalleri (ROO<sup>•</sup>), alkoksi radikalleri (RO<sup>•</sup>), tiyil radikalleri (RS<sup>•</sup>), sülfenil radikalleri (RSO<sup>•</sup>), tiyil peroksit radikalleri (RSO<sub>2</sub><sup>•</sup>) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

#### 1.2.1.1.1. Tekli (singlet) oksijen

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle tekli oksijen oluşur. Tekli oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Tekli oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipitperoksitlerin oluşumuna yol açar (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Akkuş, 1995).

#### 1.2.1.1.2. Süper oksit radikali

Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O<sub>2</sub>) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir (Bandyopadhyay vd., 1999).



Süperoksit radikali direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir. Oksidan perhidroksi radikali (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) oluşturmak üzere protonlanır.

Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO<sup>•</sup>) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO<sup>•</sup>) meydana gelir.



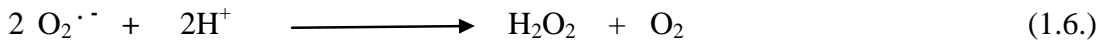
Peroksinitrit, nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ), nitronyum iyonu ( $\text{NO}_2^+$ ) gibi toksik ürünlere dönüşebilir (Dröge, 2002).

#### 1.2.1.1.3. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), süperoksitin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton ( $\text{H}^+$ ) ile birleşmesi sonucu meydana gelir (Olinescu ve Smith, 2002).



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.



Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü  $\text{Fe}^{+2}$  veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) oluşturur (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Süperoksit radikalinin lipit çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipitte kolayca çözünebilir. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat  $\text{Fe}^{+2}$  içeren membranlarda hasar oluşturabilir (Akkuş, 1995).

#### 1.2.1.1.4. Hidroksil radikali

Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici

radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS<sup>•</sup>), karbon merkezli organik radikaller (R<sup>•</sup>), organik peroksitler (RCOO<sup>•</sup>) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



### 1.2.2. Bitkilerde ROT Üretimine Katılan Fizyolojik Süreçler

Bitkilerde serbest radikaller endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşur. Bitkilerde ROT üretimine katılan fizyolojik süreçler ve bölgeler Tablo 1.1'de gösterilmiştir (Mittler, 2002).

**Tablo 1.1.** Bitkilerde ROT üretimine katılan fizyolojik süreçler ve bölgeler (Mittler,2002)

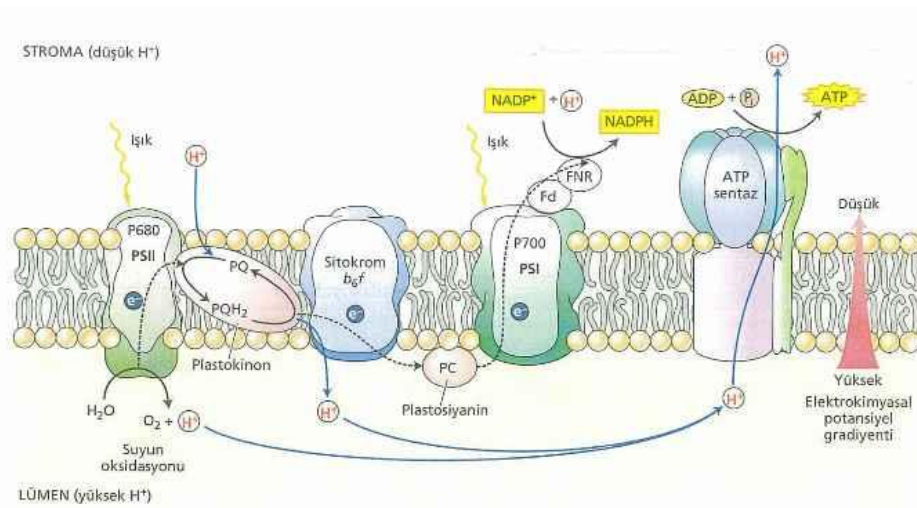
Üretim	Bölge	ROT
Fotosentez ET ve FSI veya FSII	Klorofil	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Solunum ET	Mitokondri	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Glikolat oksidaz	Peroksizom	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Uyarılan klorofil	Klorofil	O <sub>2</sub> <sup>1</sup>
NADPH oksidaz	Hücre zarı	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Yağ asiti oksidasyonu	Peroksizom	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Okzalot oksidaz	Apoplast	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Ksantin oksidaz	Peroksizom	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Peroksidazlar Mn <sup>+2</sup> ve NADH	Hücre duvarı	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Amin oksidaz	Apoplast	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

#### 1.2.2.1. Fotosentez ve fotosolunum

Fotosentetik organizmalar enerji girişi olmaksızın gerçekleşmesi mümkün olmayan karbon bileşiklerinin sentezi için ışık enerjisini kullanırlar. Işık başlıca anten komplekslerinde soğurular. Soğurulan fotonlar klorofil moleküllerini uyarır ve uyarılan klorofiller bu enerjiyi fotokimya, floresans veya ısı olarak dağıtırlar. Klorofiller, aksesuar pigmentler ve proteinlerden oluşan anten kompleksleri

kloroplastın tilakoyid zarlarında yerleşmiştir (Taiz ve Zeiger, 2008). Fotosentezin anten pigmentleri enerjiyi özelleşmiş bir klorofil-protein kompleksine aktarırlar. Bu kompleks reaksiyon merkezi olarak isimlendirilir. Reaksiyon merkezi çok sayıda alt birimden oluşmuş protein komplekslerini ve klorofilleri içerir. Anten kompleksleri ve reaksiyon merkezleri tilakoyid zarın içinde yerleşmiş elemanlardır. Reaksiyon merkezi karmaşık bir kimyasal reaksiyonlar dizisi başlatır. Bu reaksiyonlar enerjiyi kimyasal bağ formunda tutarlar (Bozcuk, 1999).

Bitkiler ve fotosentez yapan bazı prokaryotlar fotosistem I ve fotosistem II olarak bilinen ve seri olarak çalışan iki reaksiyon merkezine sahiptirler. İki fotosistem tilakoyid zar üzerinde farklı yerlerde bulunurlar. FS I yığın oluşturmeyen stroma zarlarında, FS II ise yığın oluşturan grana zarlarında yaygın olarak yerleşmiştir. FS I'in reaksiyon merkezindeki klorofiller 700 nm'de, FS II reaksiyon merkezindeki klorofiller ise 680 nm'de maksimum ışık soğurur. Fotosistem II ve Fotosistem I devirli olmayan elektron taşınımını gerçekleştirirler (Şekil 1.1.). Bunun sonucunda su moleküler oksijene yükseltgenir.  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$ 'e indirgenir (Taiz ve Zeiger, 2008).



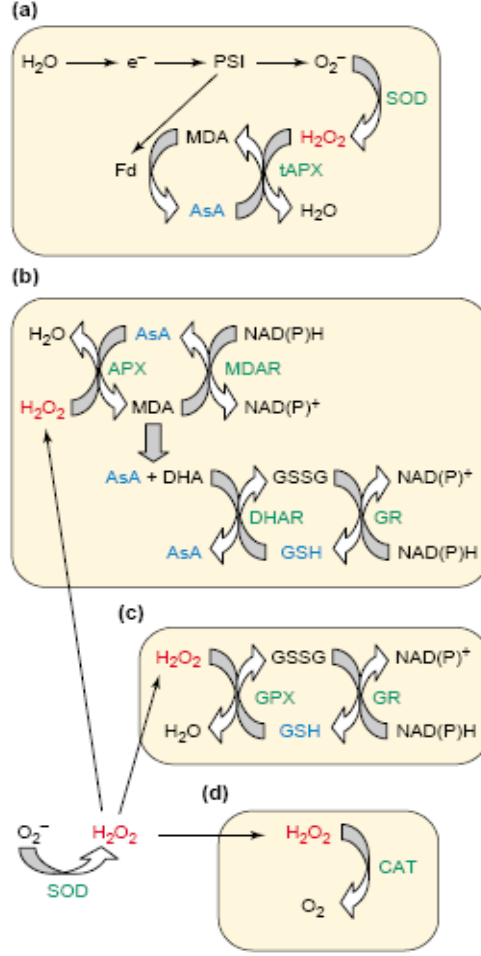
**Şekil 1.1.** Tilakoid zarlarda elektronların ve protonların taşınması (Taiz ve Zeiger, 2008)

Kloroplastlarda reaktif oksijen türlerinin iki oluşum yeri bulunur; birincisi Fotosistem I'in diğeri Fotosistem II'nin indirgen bölgesidir (Taiz ve Zeiger, 2008).  $\text{CO}_2$  fiksasyonunu sınırlayan çevresel koşullar fotosentezde kullanılabilir nitelikte daha fazla ışık enerjisinin emilimiyle sonuçlanabilir. Bitkiler uyarılma enerjisini gidermek

için birçok yola sahiptir. Bunlar arasında,  $O_2$ 'nin FS I'in alıcı yüzeyindeki elektronlar tarafından doğrudan indirgenmesi olayına Mehler-peroksidaz reaksiyonu veya su-su döngüsü denilir (Laisk ve Edwards, 1998).

Temel olarak NADPH/NADP<sup>+</sup> oranı yüksek olduğunda FS I reaksiyon merkezine bağlı olan Fe-S merkezleri tarafından sağlanan tek elektronlar  $O_2$ 'e yönlendirilerek  $O_2^-$  oluşturulur. Bu süperoksit, tilakoide bağlı bir süperoksit dismutaz (SOD) tarafından metabolize edilerek  $H_2O_2$  oluşturulur. Oluşan  $H_2O_2$ , tilakoide bağlı askorbat peroksidaz tarafından suya indirgenir. Bu sırada askorbik asitin (AsA) monodehidroaskorbata oksidasyonu gerçekleşmiş olur. Askorbik asit FS I'deki ferrodoksin tarafından monodehidroaskorbattan oluşturulur. Net bir  $O_2$  değişimi olmaz. Bu olaya su-su döngüsü denir; çünkü FS II tarafından  $H_2O$ 'dan salınan elektronlar  $O_2$ 'i indirgemede kullanılır ve sonra askorbat peroksidaz tarafından tekrar suya okside edilir.  $\Delta pH$  ve ATP oluştuğu halde NADPH oluşmadığı için bu yola "yalancı döngüsel elektron transportu" ya da "yalancı döngüsel fotofosforilasyon" denir. Su-su döngüsü fizyolojik olarak önemlidir. Çünkü  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  tilakoide bağlı süpürücü sistemden difüz etmeden önce su-su döngüsü tarafından uzaklaştırılır. Eğer  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  tilakoid sistemden kaçarsa antioksidant enzimlerin stromal sistemi ROT'ni zarar vermeden önce uzaklaştırma görevini üstlenir (Asada, 1999). Bitkilerdeki bu ROT uzaklaştırma yolları Şekil 1.2.'de gösterilmektedir.

Fotosolunum, Mehler-peroksidaz reaksiyonunda olduğu gibi fotosentetik enerji için alternatif bir boşaltım sağlar. Bunun yanında elektron taşıma zincirinin indirgenmesini sağlar. Elektron taşıma zinciri indirgenmezse fotoinhibisyona neden olur. Fotosolunum RUBISCO RuBP'a oksijen katarak fosfoglikolat ürettiğinde başlar. Fikse edilmiş karbon ve nitrojenin geridönüşümünde kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomlar yer alır ve NADPH ve ATP kullanılır. Birçok çevresel faktör Rubisco oksijenazın ve ilgili fotosolunumsal reaksiyonların şiddetini etkiler. Kuraklık stresi stomaları kapatır ve  $CO_2$ 'i sınırlar ki bu da oksijenaz aktivitesini ve fotosolunumu arttırır. Yüksek sıcaklıkta enzimin kinetik özelliklerinden ötürü oksijenaz aktivitesi artar. Fotosolunum sürecinde, peroksizomlarda yer alan glikolat oksidazın aktivitesi yoluyla yüksek oranda  $H_2O_2$  üretilir. Ortaya çıkan  $H_2O_2$  etkin bir şekilde katalaz tarafından uzaklaştırılmalıdır (Mittler, 2002).



**Şekil 1.2.** Bitkilerde Reaktif Oksijen Türlerinin uzaklaştırılması (Mittler,2002)  
**(a)**Su-su döngüsü **(b)** Askorbat–Glutasyon döngüsü **(c)** Glutasyon peroksidaz döngüsü **(d)** Katalaz

**DHA:**Dehidroaskorbat **DHAR:**DHA redüktaz **Fd:**Ferrodoksin **GR:** Glutasyon redüktaz **GSSG:**Okside Glutasyon **MDA:**Monodehidroaskorbat **MDAR:** MDA redüktaz **PSI:**Fotosistem I **tAPX:**Tilakoide bağlı Askorbat peroksidaz **GPX:** Glutasyon peroksidaz **CAT:**Katalaz

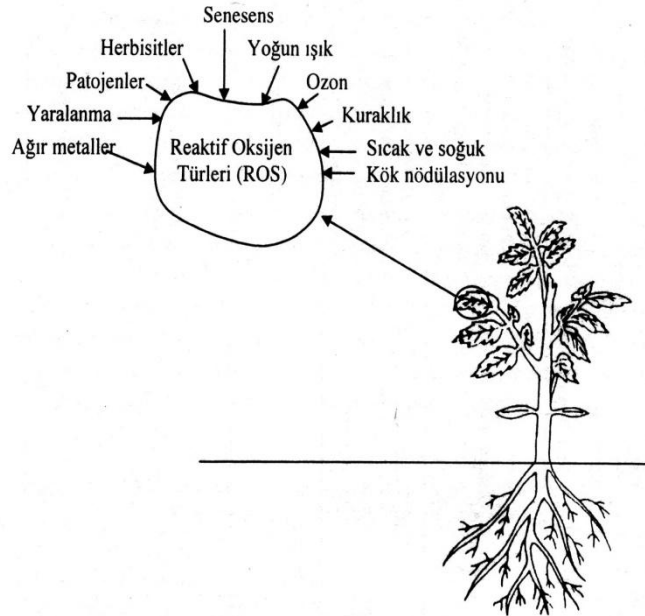
### 1.2.2.2. Solunum ve diğer oksidazlar

ROT üretiminin diğer bir kaynağı da mitokondrilerdir. ATP'nin ve solunum substratlarının yüksek seviyeleri  $O_2^-$ 'nin oluşumunu teşvik eder. Mitokondrilerde oluşturulan superoksit mitokondrilerdeki Mn SOD tarafından  $H_2O_2$ 'ye çevrilir (Laisk ve Edwards, 1998). Mitokondrideki alternatif oksidazlar elektronlar için alternatif bir boşaltım olarak işlev görerek mitokondride ROT üretim potansiyelini azaltırlar. Alternatif oksidazlar elektronları ubiquinone havuzundan direk kabul ederler. Böylelikle de süperoksit üretimi için elektron kaynağı olarak işlev görebilecek olan indirgenmiş ubiquinone birikimini önler (Dat vd., 2000).

Hücre duvarı, apoplast ve plasma membranında bulunan peroksidazlar, amin oksidazlar ve NADPH'a bağlı oksidaz gibi çok sayıda oksidaz bitki hücresinde ROT oluşturur. Bu oksidazların bakteriyel ve fungal patojenlerle karşılaştıklarında bitkilerin verdiği ilk cevap olarak gözlenen "oksidatif patlama" ya katıldıkları düşünülmektedir (Mittler, 2002).

### 1.2.2.3. Çevresel stres süresince ROT üretimi

Normal metabolizma süresince hücrelerde meydana gelen birçok biyokimyasal ve kimyasal reaksiyona kaçınılmaz olarak oksijen indirgenmesi ve ROT oluşumu eşlik eder. Bu şekildeki sürekli ROT üretimine, hücre içindeki ROT seviyesini dayanılabilir seviyede tutan antioksidanlar yoluyla ROT'nin aktif olarak yok edilmesi yoluyla karşı çıkılır. Çevresel stres boyunca ROT üretimi ile ROT detoksifikasyonu arasındaki denge bozulabilir. Bu dengenin bozulmasıyla, ROT'nin seviyesi hücrelere tehdit oluşturacak şekilde fazlaca artar. Kuraklık, düşük ve yüksek ısı değerleri, ağır metaller, UV ışık, beslenme noksanlıkları, yüksek derecede tuzlu ortam, hipoksi ve yüksek ışık stresi bitkilerdeki ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır (Gechev vd., 2003, Lamb ve Dixon, 1997). Bu ekzojen etkenler Şekil 1.3.'de gösterilmektedir (Kaçar vd., 2006).



Şekil 1.3. Bitkilerde ROT oluşumuna neden olan ekzojen etkenler (Kaçar vd., 2006)

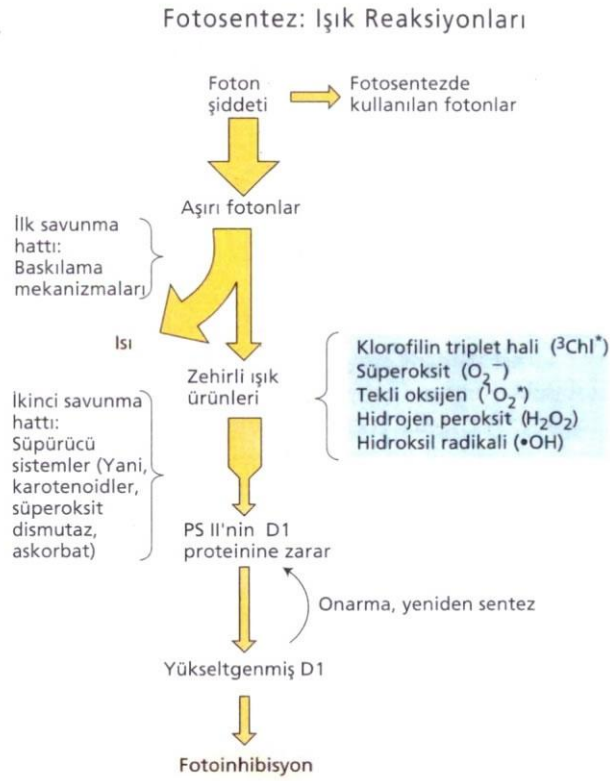
### 1.2.2.3.1. Yüksek ışık stresi

Fotosentez yapan canlılar diğer canlılarla karşılaştırıldıklarında özel bir tehlike ile yüzyüzedir. Bu canlılardaki fotosentetik aygıtlar, görünür ışığı optimal olarak etkili bir şekilde absorbe etme ve kullanma yeteneğindedir. Bu sistemler yüksek miktarda ışık enerjisini soğurmak ve onu kimyasal enerjiye dönüştürmek üzere düzenlenmiştir. Bir fotonun enerjisi özellikle uygun olmayan koşullarda moleküler düzeyde zarara neden olabilir. Çok fazla ışık enerjisi süperoksit, tekli oksijen ve peroksit gibi zararlı oksijen türlerinin oluşumuna yol açabilir. Bu aşırı ışık enerjisi güvenli bir şekilde dağıtılmazsa zarar oluşturur (Taiz ve Zeiger, 2008). Bu nedenle fotosentez yapan organizmalar gelişmiş düzenleyici ve onarıcı mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalardan bazıları, reaksiyon merkezlerinin aşırı uyarılmasını engellemek ve iki fotosistemin eşit düzeyde çalışmasını sağlamak için anten sisteminde enerji akışını düzenler. Her ne kadar bu sistemler çok etkili olsalar da bazen tümüyle başarılı olamaz ve toksik bileşikler üretilir. Bu bileşiklerin, özellikle de toksik oksijen türlerinin yok edilmesi için ek mekanizmalar gereklidir (Asada, 1999; Müller vd., 2001).

Işık zararlarından korunma çok aşamalı bir işlemdir. İlk savunma hattı uyarılma enerjisinin fazlasının ısı olarak dağıtılması ile zararın baskılanmasıdır. Bu savunma yetersiz kalır ve zararlı reaktif ürünler bir çeşit süpürücü sistem tarafından ortadan kaldırılır. Eğer bu ikinci savunma hattı da başarısız olursa, zararlı ürünler fotosistem II'nin D<sub>1</sub> proteinine zarar verebilirler. Bu zarar fotoinhibisyona neden olur. D<sub>1</sub> proteini FS II reaksiyon merkezinden çıkarılır ve parçalanır. Yeni sentezlenen bir D<sub>1</sub> proteini, FS II reaksiyon merkezine katılarak merkezin işlevinin sürmesini sağlar (Long vd., 1994). Bu durum Şekil 1.4.'de gösterilmiştir.

Yüksek ışık şiddeti süresince fotosentetik aparat Rubisco tarafından yapılan CO<sub>2</sub> fiksasyon oranını geçecek kadar yüksek oranda işlev görür. ROT'nin FS I ve FS II merkezindeki fotosentetik aparat tarafından doğrudan üretildiği düşünülmektedir. Bunlar su-su döngüsündeki SOD ve askorbat peroksidaz tarafından temizlenir. Bununla birlikte, FS II merkezinde üretilen ROT D<sub>1</sub> proteinine zarar verebilir ve parçalanmasına yol açabilir (Asada, 1999). D<sub>1</sub> proteininin parçalanmasından kaynaklanabilecek olan klorofildeki elektron taşıma zincirindeki farklı birimlerin ayrılması klorofil anteninin fazla uyarılmasına ve tekli oksijen üretimine neden olur.

Bu ROT antenin içinde bulunan karotenoidler tarafından temizlenir (Asada, 1999).



**Şekil 1.4.** Foton yakalama, ışık zararlarından korunma ve ışıktan kaynaklanan zararın onarımının düzenlenmesi (Taiz ve Zeiger, 2008)

Karotenoidler klorofilin uyarılmış halini hızla yatıştırarak ışıktan koruyucu ajanlar olarak iş görürler. Aksesuar pigmentler olarak görev yapan karotenoidler ışık zararlarından korunmada önemli bir role sahiptirler. Fotokimyasal olarak depolanabilecek olandan daha fazla ışık pigmentler tarafından soğurulunca fotosentezde yer alan zarlar kolayca zarar görebilir. Bu nedenle koruyucu bir mekanizmaya gereksinim vardır. Koruyucu mekanizma, fazla enerjiryi organizmaya zarar vermeden önce ortamdan uzaklaştıracak bir emniyet valfi olarak düşünülebilir. Uyarılmış haldeki klorofillerde depolanan enerji uyarılma enerjisinin aktarımı veya fotokimya sonucu hızla dağıtılır; buna uyarılmış durumun yatıştırılması denir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Klorofilin uyarılmış hali uyarılma enerjisinin aktarımı ya da fotokimyaya bağlı olarak hızla yatıştırılmazsa uyarılmış bir oksijen türü olan tekli oksijeni oluşturmak üzere moleküler oksijenle reaksiyona girebilir. Aşırı reaktif olan tekli oksijen,



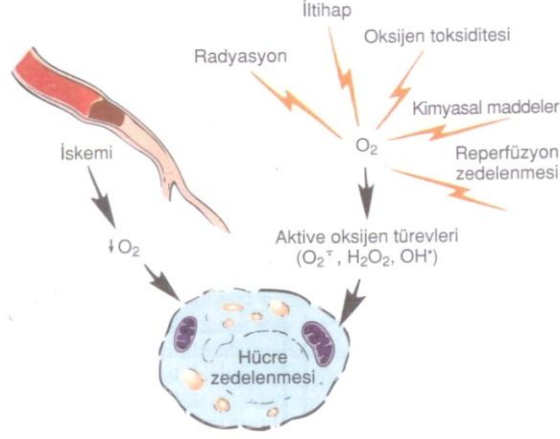
özellikle lipitlerle olmak üzere hücredeki pek çok molekülle reaksiyona girerek onlara zarar verir. Karotenoidler koruyucu etkilerini klorofilin uyarılmış durumunu hızla yatıştırarak sağlarlar. Karotenoidlerin uyarılmış hallerinin enerjisi tekli oksijen oluşturmaya yetmez. Dolayısıyla sahip olduğu enerjiyi ısı olarak kaybederken temel durumlarına geri dönerler (Asada, 1999).

Son yıllarda karotenoidlerin ikinci bir koruyucu ve düzenleyici mekanizma sayılan fotokimyasal olmayan yatıştırmada da görev yaptığı bulunmuştur. Fotokimyasal olmayan yatıştırma uyarılma enerjisinin reaksiyon merkezine geçişini düzenleyen başlıca mekanizmadır. Bu işlem ışık şiddetine ve diğer koşullara bağlı olarak uyarılma enerjisinin yönetilebilir bir düzeyde FS II reaksiyon merkezine akışını düzenleyen bir “ayar düğmesi” gibi düşünülebilir. Bu işlem pek çok bitki ve algde anten sistemlerinin düzenlenmesinde başlıca unsurdur (Dernming ve Adams, 1992; Müller vd., 2001).

Fotokimyasal olmayan yatıştırma, fotokimyasal özellik göstermeyen diğer işlemler kullanılarak klorofil florosensinin yatıştırılmasıdır. Bu işlem sonucunda şiddetli ışıklandırmanın, anten sisteminde neden olduğu uyarılmaların büyük bir bölümü ısıya dönüştürülerek yatıştırılır (Krause ve Weis, 1991). Fotokimyasal olmayan yatıştırmanın, aşırı uyarılma ve buna bağlı zarara karşı fotosentez mekanizmasının korunmasında yer aldığı düşünülmektedir. Fotokimyasal olmayan yatıştırmada ksantofiller olarak adlandırılan karotenoidler gereklidir. Bu ksantofiller; viyolaksantin, anteraksantin ve zeaksantindir (Dernming ve Adams, 1992; Müller vd., 2001).

### **1.2.3. Memelilerde ROT Üretimine Katılan Fizyolojik Süreçler**

Memelilerde serbest radikaller, mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ), fagositik ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, araşidonik asit metabolizması, otooksidasyon reaksiyonları esnasında ksantin oksidaz ile NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) oksidaz gibi enzimlerinin etkisiyle meydana gelirler. Serbest radikal oluşturan ekzojen kaynaklar ise endüstriyel kirleticiler, ilaçlar, diyet, iyonize radyasyon, ultraviyole (UV) ışık, sigara dumanı ve ksenobiyotiklerdir (Kumar vd., 1997). Hücre zedelenmesinde oksijenin rolü Şekil 1.5’de gösterilmiştir.



**Şekil 1.5.** Hücre zedelenmesinde oksijenin rolü (Kumar vd.,1997)

Alkol ve diğer toksik maddelerin detoksifikasyon olayının meydana geldiği karaciğer, serbest radikal oluşumuna dolayısıyla da oksidatif stresin indüklediği hasara sıklıkla maruz kalır. Bugün klinikte başarılı sonuçlar veren birçok ilacın kullanımını hepatotoksisite oluşturduğu için sınırlıdır (Lee, 2003). Alkol metabolizmasının bir sonucu olarak alkolün indüklediği oksidatif stresin karaciğerde ciddi hasara yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca son yıllarda artan miktarda pestisitler, metal iyonları ve aflatoksinler gibi mikotoksinler ile kontamine olan besinlerin hem direk olarak hem de besin zinciri yoluyla dolaylı yoldan tüketilmesi özellikle karaciğerde oksidatif strese neden olarak hasar oluşturmaktadır (Banerjee vd., 2001).

### 1.2.3.1. Karaciğer

Karaciğer, vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Diyaframın altında abdominal boşlukta yerleşmiştir. Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur.

Organa kanın % 70-80'i portal venden gelir; geri kalan az bir bölümü hepatik arterle sağlanır. İnce bağırsaklardan emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır. Sadece kompleks lipitler (şilomikronlar) lenf damarlarıyla taşınır. Karaciğerin dolaşım sistemindeki konumu, metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin etkisizleştirilmesi ve elenmesi için çok uygundur. Bu elenme karaciğerin lipit sindirimi için önemli bir dış salgı üreten safrada

gerçekleşir. Karaciğerin ayrıca albümin ve diğer taşıyıcı proteinler gibi plazma proteinlerinin üretilmesi gibi çok önemli bir işlevi de vardır (Guyton ve Hall, 1996).

### **1.2.3.1.1. Karaciğerin fonksiyonları**

#### **1.2.3.1.1.1. Karaciğerin metabolik fonksiyonları**

Karaciğer hücreleri çok yüksek bir metabolizma hızına sahip kimyasal aktif bir havuz oluştururlar. Vücudun diğer bölgelerine taşınacak birçok madde burada sentezlenir ve işlenir (Guyton ve Hall, 1996).

Karbonhidrat metabolizmasında karaciğerde yürütülen fonksiyonlar şunlardır;

1. Glikojen depolama
2. Galaktoz ve fruktozu glikoza çevirme
3. Glikoneogenez
4. Karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli kimyasal maddelerin oluşturulması

Karaciğer özellikle kanda normal glikoz konsantrasyonunun devamı bakımından önemlidir. Glikojenin depo edilmesiyle karaciğer glikozun fazlasını kandan alıp depo eder. Glikoz konsantrasyonu düşmeye başladığı zaman da tekrar kana verir. Buna karaciğerin 'glikoz tamponlama fonksiyonu' adı verilir (Guyton ve Hall, 1996). Karaciğer glikoneogenez fonksiyonuyla glikozun kanda normal düzeyde kalmasına yardımcı olur. Glikoz konsantrasyonu normalin altına düşmeye başladığı zaman önemli miktarda glikoneogenez gerçekleşir. Bu durumda büyük miktarda amino asidin glikoza çevrilmesi de kandaki glikoz konsantrasyonunun normale döndürülmesine katkıda bulunur (Guyton ve Hall, 1996). Yağ metabolizması kısmen vücuttaki tüm hücrelerde yürütülürse de, bu metabolizmanın bazı özgül işlemleri karaciğerde yapılmaktadır. Bu işlemler şöyle özetlenebilir;

1. Diğer vücut fonksiyonları için enerji sağlayacak yağ asitlerinin büyük bir hızla oksidasyonu
2. Lipoproteinlerin çoğunun oluşumu
3. Büyük miktarda kolesterol ve fosfolipit sentezi
4. Büyük miktarda karbonhidrat ve proteinin yağa dönüşümü

Enerji elde etmek üzere nötral yağlar ilk olarak gliserol ve yağ asitlerine ayrılır. Daha sonra yağ asitleri beta oksidasyonla iki karbonlu asetil köklerine ayrılır. Bunlar da asetil koenzim A (asetil CoA)'yı oluştururlar. Asetil CoA, sitrik asit siklusuna girerek okside olur ve büyük miktarda enerji sağlar. Beta oksidasyon vücuttaki bütün hücrelerde yapılırsa da karaciğer hücrelerinde bu olay özellikle hızlıdır. Karaciğer oluşan asetil CoA'nın hepsini kullanamaz. İki molekül asetil CoA'nın birleşmesiyle oluşan asetoasetik asit çok kolay erir ve karaciğer hücrelerinden ekstrasellüler sıvıya geçip bütün vücuda taşınarak dokular tarafından absorbe edilir. Dokular da asetoasetik asiti tekrar asetil-CoA'ya çevirerek normal yoldan okside ederler. Bu nedenle, karaciğerin yağ metabolizmasından büyük ölçüde sorumlu olması doğaldır (Guyton ve Hall, 1996).

Karaciğerde sentezi yapılan kolesterolün yaklaşık % 80'i safra tuzlarına çevrilerek safraya salgılanır. Geri kalanı lipoproteinler içinde kanla vücudun tüm doku hücrelerine taşınırlar. Fosfolipitler de karaciğerde aynı şekilde sentezlenerek lipoproteinler içinde kanla vücudun tüm doku hücrelerine taşınırlar. Kolesterol ve fosfolipitler hücrelerde membranların, intrasellüler yapıların oluşumunda ve hücre fonksiyonları için önemli olan kimyasal maddelerin yapımında kullanılırlar (Guyton ve Hall, 1996).

Vücutta karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezi büyük ölçüde karaciğerde gerçekleşir. Karaciğerde sentezi yapıldıktan sonra yağ, lipoproteinler içinde yağ dokusuna taşınarak depo edilir (Guyton ve Hall, 1996).

Karaciğerin protein metabolizmasındaki başlıca fonksiyonları şöyle özetlenebilir;

1. Aminoasitlerin deaminasyonu
2. Üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması
3. Plazma proteinlerinin oluşumu
4. Vücuttaki metabolik olaylar için önemli amino asitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüşümleri

Aminoasitlerin, enerji için kullanılmadan ya da karbonhidrat veya yağlara çevrilmeden önce deaminasyonu gerekir. Vücutta öteki dokularda, özellikle böbreklerde az miktarda deaminasyon olursa da, ekstrahepatik deaminasyon yüzdesi o kadar küçüktür ki tamamen ihmal edilebilir. Karaciğer üre oluşumuyla vücut

sıvılarından amonyağı uzaklaştırır. Deaminasyon işlemlerinin ürünü olan büyük miktardaki amonyağa, bağırsaklarda bakterilerle sürekli olarak yapılıp kana absorbe edilen amonyak da katılır. Bu nedenle karaciğerin üre yapımı ile ilgili fonksiyonu kaybolduğunda, plazma amonyak konsantrasyonu hızla yükselir ve hepatik koma ile ölüm görülür (Guyton ve Hall, 1996).

Gama globulinlerin bir bölümü dışında hemen bütün plazma proteinleri, karaciğer hücrelerinde yapılırlar. Bu, plazma proteinlerinin % 90'ıdır. Geri kalan gama globulinler, lenfatik dokudaki plazma hücrelerinde yapılan antikorlardır. Plazma proteinlerinin azalması karaciğer hücrelerinde mitozu hızlandırarak karaciğerin büyümesine yol açar. Bu sırada kanda plazma proteinlerinin konsantrasyonu normale ulaşınca kadar proteinler hızla karaciğerden kana verilir (Guyton ve Hall, 1996).

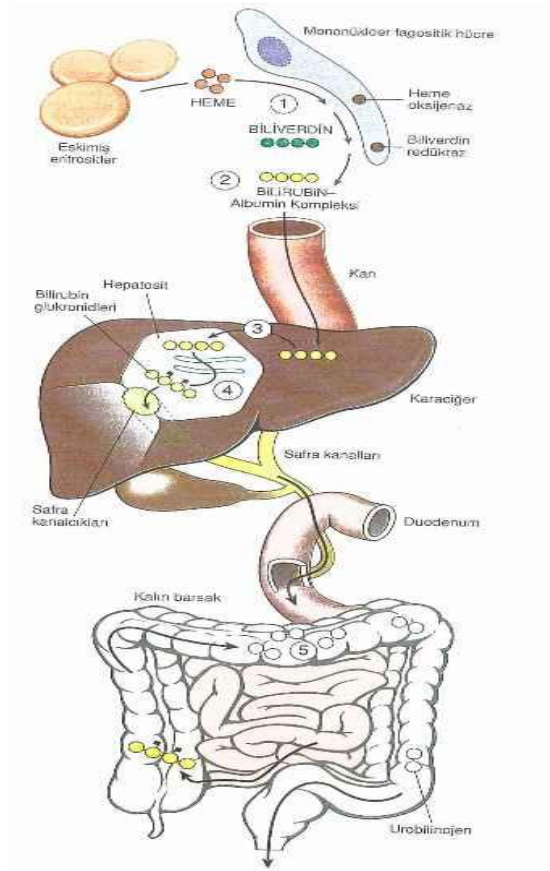
Karaciğerin en önemli işlevlerinden biri de, bazı amino asitlerin sentezini yapması ve amino asitlerden önemli kimyasal bileşikler oluşturmasıdır. Bu amaçla ilk olarak yapılacak amino asitle aynı bileşimde keto asit sentezlenir. Daha sonra amino kökü, uygun amino asitlerden bir çok transaminasyon aşamalarından sonra transfer edilerek keto oksijen grubunun yerine yerleştirilir (Guyton ve Hall, 1996).

Kanda koagülasyon işleminde kullanılan fibrinojen, protrombin, akselerator globülin ve faktör VII gibi koagülasyon faktörleri karaciğerde yapılırlar. Vücutta, kandaki hemoglobinde bulunan demir dışında demirin en büyük bölümü normalde karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Karaciğer hücrelerinde, demirle az ya da çok miktarlarda birleşebilen bir protein olan apoferritin bol miktarda bulunur. Böylece vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere saklanır. Dolaşımdaki vücut sıvılarında demir düşük bir düzeye indiğinde ferritin demiri serbest bırakır. Böylece karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yaptığı gibi kan demirinin tamponu işlevini de yürütür (Guyton ve Hall, 1996).

Eritrositlerin fragilitesi 120 günlük yaşamları sonunda dolaşım sisteminde kalmalarını engelleyecek derecede arttığında, eritrositlerin hücre membranları yırtılır ve serbestlenen hemoglobin doku makrofajları tarafından fagosite edilir. Hemoglobin ilk önce globin ve heme ayrılır. Daha sonra hem halkası açılır; transferin ile kanda dört pirol çekirdeğinden yapılmış düz bir zincir ortaya çıkar. Oluşan ilk madde

biliverdindir. Ancak bu hızla serbest bilirübine indirgenerek yavaş yavaş makrofajlardan plazmaya salıverilir. Serbest bilirubin hemen plazma albuminine kuvvetle bağlanır ve bu şekilde kanda ve interstisyel sıvılarda taşınır. Birkaç saat içinde serbest bilirubin karaciğer hücre membranı vasıtasıyla absorbe edilir. Hepatik hücrelerin içinden geçerken, plazma albumininden serbestlenir ve hemen konjuge olduktan sonra yaklaşık yüzde 80'i glikuronik asitle birleşerek bilirubin glikuronat, % 10'u sülfatla birleşerek bilirubin sülfat yapar. Geri kalan % 10'u da çeşitli maddelerle birleşir. Bilurubin bu şekilde hepatositlerden aktif transportla safra kanalcıklarına ve sonra da bağırsaklara salgılanır (Guyton ve Hall, 1996).

Bağırsaklara geçen "konjuge" bilirubinün yarısı bakteriler tarafından suda kolay eriyen ürobilinojene çevrilir. Ürobilinojenin bir kısmı bağırsak mukozasından kana absorbe edilir. Bunun büyük bir kısmı karaciğerden tekrar bağırsağa atılır; yaklaşık % 5'i böbreklerden idrara geçer. Hava ile temas eden idrarda, ürobilinojen ürobiline oksitlenir. Feçeste de oksitlenerek sterkobiline çevrilir. (Guyton ve Hall, 1996). Bilirubin metabolizması ve eliminasyonu Şekil 1.6' da gösterilmiştir.



**Şekil 1.6.** Bilirubin metabolizması ve eliminasyonu (Kumar vd.,1997)

### **1.2.3.1.1.2. Karaciğerin detoksifikasyon fonksiyonu**

Karaciğer; anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle toksik madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan bir organdır. Karaciğer, biyotransformasyon reaksiyonları ile organizma için zararlı veya artık yararsız hale gelmiş maddeleri etkisizleştirerek atılmasını sağlar. Biyotransformasyon sırasında bazı ksenobiyotikler inaktivasyona uğrarken (biyoaktivasyon), bazıları da biyolojik olarak daha etkin veya toksik metabolitlere dönüşür (biyoaktivasyon) (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

Karaciğerde biyotransformasyon çoğunlukla mikrozomal enzimlerle gerçekleştirilir. Bunlara ek olarak hepatositlerde biyotransformasyon ile ilgili mikrozomal olmayan enzimler de işlev görür (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

İlaçlar genellikle lipofiliktir. Dolayısıyla idrar veya safra ile atılamazlar. Daha hidrofilik ve suda atılabilir olmaları; karaciğerde bulunan enzim bağımlı yollarla olmaktadır. Enzimatik biyotransformasyonda rol oynayan kimyasal reaksiyonlar faz 1 ve faz 2 reaksiyonları olmak üzere 2 grupta toplanabilir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

Faz 1 reaksiyonları ksenobiyotiğin hem kimyasal yapısında hem de biyolojik etkisinde değişikliğe yol açar. Faz 2 reaksiyonları ise Faz 1 reaksiyonu sonucu oluşan metabolitlerle gerçekleşir ve onları daha polar hale getirir. Faz 2 reaksiyonları sırasında metabolitlere glukuronik asit, sulfat, asetat, glisin, glutamin ve glutatyon gibi hidrofilik moleküllerden biri bağlanır veya yapısına metil grubu eklenir. Ksenobiyotiklerin çoğu hem Faz 1 hem de Faz 2 reaksiyonlarına maruz kalırken bazı ilaçlar ve ksenobiyotikler sadece Faz 1 reaksiyonlarını takiben vücuttan uzaklaştırılır (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

#### **1.2.3.1.1.2.1. Faz 1 reaksiyonları**

Faz 1 reaksiyonların çoğunu oksidasyon reaksiyonları (sıklıkla hidrosilasyon) oluşturur. Ayrıca deaminasyon, epoksidasyon, peroksidasyon ve indirgenme reaksiyonları da kullanılmaktadır. Oksidasyon (yükseltgenme) reaksiyonlarının büyük bir kısmı karaciğer parankim hücrelerinin mikrozomal enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006). Karaciğerde oksidasyonla görevli mikrozomal enzimler kısaca sitokrom P450 ailesi de denilen karma fonksiyonlu

monooksijenazlardır. Sitokrom P450 ailesi tüm canlılarda bulunur ve yaklaşık 150 izoformdan oluşur. Birçok organda yaygın olmakla beraber, en bol karaciğerde bulunur. Hücrenin endoplazmik retikulum, mitokondri ve nukleus membranlarında yerleşmiştir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

Sitokrom P450 ailesine ait enzimlerin en önemli fonksiyonları ilaçların biyotransformasyonlarına ve ekzojen kimyasalların metabolizmasına katılmaktır. Bu fonksiyon hücre hasarı, ölümü veya mutasyon gibi istenmeyen etkilere de yol açabilir. Sitokrom P450 enzimlerinin başlıca substratları; kolesterol ve diğer steroid yapılı bileşikler, safra asitleri, lipitler, eikozanoidler, ilaçlar ve ksenobiyotiklerdir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

Sitokrom P450 ailesindeki enzimlerin önemli bir özelliği uyarılabilir olmalarıdır. Sitokrom P450 izoformlarının uyarılması; ilaçların inaktivasyon ve atılım hızında artışa veya etkinliklerinde değişikliklere yol açar. Bu etkinin sitokrom P450 mRNA molekülünün transkripsiyonundaki bir artış veya katabolizmasındaki azalma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Sitokrom P450 enzimlerine monooksijenazlar da denilmektedir. Memelilerde sitokrom P450 enzimi, endoplazmik retikulum veya iç mitokondri membranında terminal elektron alıcısı olarak görev yapar. Sitokrom P450 proteinlerinde oksijenin bağlandığı prostetik grup bir demir atomu içeren protoporfirin 9'dur (=hem). Hidroksilasyonun (monooksijenasyon) gerçekleşebilmesi için demir ferri ( $Fe^{+3}$ ) durumdan ferro duruma ( $Fe^{+2}$ ) indirgenmelidir. Monooksijenasyon için toplam iki elektron gereklidir; bu elektronlar sitokrom P450 molekülüne ancak birer birer aktarılabilir. Birinci elektron oksijenin sitokrom P450'ye bağlanması için; ikinci elektron ise substrat molekülünün hidroksilasyonu için gerekli olan aktif oksijeni oluşturmada kullanılır (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

Sitokrom P450 enzimine substrat bağlandığında, hem demirini çevreleyen yapılarda bir değişiklik meydana gelir ve substratın bağlı olmadığı duruma göre daha yüksek bir indirgenme potansiyeli oluşur. Bu olay, NADPH-flavoprotein reduktaz aracılığıyla NADPH'dan sağlanan elektronlarla sitokrom P450 enziminin indirgenme hızını artırır. İndirgenme reaksiyonları ilaç ve ksenobiyotik metabolizması sırasında oksidasyon reaksiyonlarına göre daha az gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlarda da



NADPH ile birlikte FADH<sub>2</sub> ve diğere flavinler görev alır. Kopma reaksiyonları şeklindeki biyotransformasyonlar, ksenobiyotik molekülünden bir grubun koparılmasını veya ilaç molekülünün iki parçaya bölünmesini sağlayan reaksiyonları içerir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

#### **1.2.3.1.1.2.2. Faz 2 reaksiyonları**

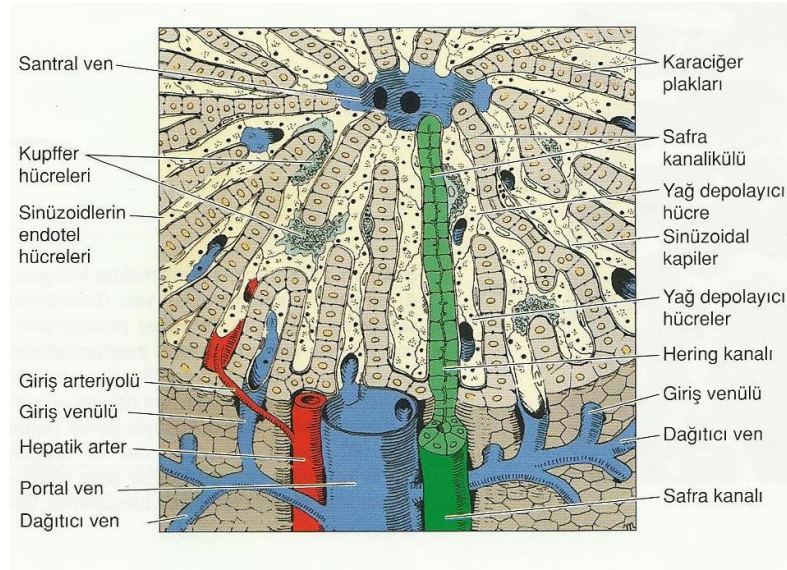
Faz 1 reaksiyonları ksenobiyotikleri polar metabolitlere dönüştürmekte, Faz 2 reaksiyonları ise bu metabolitlerin glukuronik asit, sulfat veya glutatyon gibi çeşitli bileşiklerle konjuge edilerek daha polar ve suda çözünür hale gelmelerini sağlamaktadır. Faz 2 reaksiyonlarını katalizleyen enzimler; UDP-glukuronil transferaz hariç sitozolde bulunur. Faz 2 reaksiyonları Faz 1 reaksiyonlarına kıyasla daha hızlı gerçekleşir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

#### **1.2.3.1.2. Karaciğere histolojik yapısı**

Karaciğere hilumda kalınlaşan, kolojen ve elastik liflerden zengin fibröz bir doku olan Glisson kapsülü ile sarılmıştır. Hilum bölgesinde bu kapsül organın içine girerek bağ dokusu septalarını oluşturur. Böylece karaciğere fizyolojik ve morfolojik işlevleri birbirinin aynı olan çok sayıda küçük bölgelere ayrılmış olur ki bu bölgelerin her birine karaciğere lobulusları adı verilir. Hilumda organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Bu damarlar ve kanallar, lobüller arasındaki sonlandıkları portal alanlara dek bağ dokusu ile çevrelenmişlerdir. Portal alanlardan başlayan ince bir retiküler lif ağı hepatositlere ve karaciğere sinüzoidlerinin endotel hücrelerine destek sağlar (Aslan, 2005).

Karaciğere lobulusları piramid biçimde olup longitudinal yönde alınan histolojik kesitlerde poligonal olarak gözlemlenirler. Portal alan ya da Glisson üçgeni adı verilen bu bölgelerde bir venül, bir arteriyol, bir safra kanalı ve lenfatik damarlar bulunur (Junqueira ve Carneiro, 2003 ).Karaciğere temel yapı elemanı karaciğere hücresi ya da hepatositlerdir. Hepatositler birbirleriyle anastomozlar yaparak ilerleyen epitelyal hücre kordonlarını oluştururlar. Remark Plakları adı verilen bu kordonların arasındaki boşlukta karaciğere sinüzoidleri adı verilen kapiller kan damarları bulunur. Bu damarlar sadece kesintili pencereci endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Endotel hücreleri hepatositlerden “Disse Aralığı” denen endotel altı bir boşlukla ayrılmıştır. Bu aralıkta hepatositlerin mikrovillusları

bulunur. Sonuç olarak kan sıvısı endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylece sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında makromolekül alışverişi kolaylıkla sağlanır. Bu geçiş hem çok sayıda büyük molekülün hepatositler tarafından kana verilmesi nedeniyle hem de bu makromoleküllerin çoğunun hepatositlerce alınıp çözülmesi nedeniyle fizyolojik bir önem taşır. Karaciğer sinüzoidleri işinsal olarak ilerler ve her bir lobulusun merkezinde santral veni oluşturmak üzere birleşirler (Şekil 1.7.).



**Şekil 1.7.** Karaciğerin yapısı (Junqueira ve Carneiro, 2003 ).

Sinüzoidler ince bir retiküler lif ağıyla desteklenirler burada endotel hücrelerinin yanı sıra Kupffer hücreleri adı verilen karaciğer makrofajlarına rastlamak mümkündür. Yaşlanmış eritrositleri sindirip, hemoglobini metabolize etmek ve immünolojik reaksiyonlarda rol almak, kupffer hücrelerinin görevleri arasındadır (Junqueira ve Carneiro, 2003; Naito vd., 2004; Senoo, 2004).

Disse aralığında bulunan diğer bir hücre tipi de Ito hücreleridir. Yağ depolayıcı hücreler olarak da bilinen bu hücrelerde A vitamininden zengin lipit çökeltileri bulunur. Sağlıklı karaciğerde bu hücreler, retinoidlerin alınması, depolanması ve salınması, bazı ekstrasellüler matriks proteinlerinin ve proteoglikanların sentezi ve salgılanması, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanması ve çeşitli düzenleyici maddelere (prostoglandinler, tromboksan A2) yanıt olarak sinüzoid lümen çapının düzenlenmesi gibi bazı işlevler görür. Karaciğer hücreleri polihedral olup 20-30 µm çapındadırlar. Portal triadlardan farklı uzaklıklarda bulunan hepatositler, yapısal,

histokimyasal ve biyokimyasal farklılıklar gösterirler. Karaciğer dokusu elektron mikroskopik olarak değerlendirildiğinde granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında yerleşmiş çok sayıda poliribozomun varlığı dikkati çeker. Granüllü endoplazma retikulumu üzerindeki polizomlarda hem karaciğerin kendisi hem de plazma lipoproteinleri (albumin, protrombin, lipoproteinler ve fibronojen) için protein sentezi yapılır. Sentezlenen proteinler hepatositler tarafından depo edilmez ve sürekli olarak kana salgılanır. Böylece hepatositler endokrin bir bez gibi davranmış olurlar (Ross vd., 1995; Junqueira ve Carneiro, 2003).

Düz endoplazma retikulumu sitoplazma içinde difuz olarak yayılmıştır ve çok çeşitli metabolik aktivitelere sahiptir. Organizmaya alınan ilaç ve zararlı toksinlerin konjugasyonunu ve degrade edilmesini sağlayan enzimler ihtiva eder. Bu tür maddelerin vücuttan atılımlarından önce bunların inaktivasyonu ve detoksifikasyonu için gerekli olan oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon işlemlerinden sorumludur. Ayrıca kolesterol, safra tuzları ve serum lipoproteinlerinin lipit formlarının sentez edilmesinden de sorumludur. İlaçlar, toksik maddeler ve metabolik stimulyasyonlarla hepatositlerin fizyolojik koşulları tehdit edildiği zaman düz endoplazma retikulumu hücrenin dominant organeli haline gelir. Hidrofobik toksik bilirubin, glukuronil transferaz ile reaksiyona girerek toksik olmayan bilirubin glukuronidi oluşturması bu organelin önemli görevlerinden biridir (Ross vd., 1995; Kierszenbaum, 2003; Junqueira ve Carneiro, 2003).

Golgi kompleksi üç ila beş adet düz ve birbirine paralel sisternalardan oluşmuştur. Hücrede genellikle safra kanalikülüne yakın yerleşimli olarak bulunur. Bu yüzden hepatositlerin ekzokrin fonksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sisternalarının uçları genellikle genişlemiştir ve çaplar yaklaşık 25-80 µm olan elektron yoğun granüller içerirler. Bunların granülsüz endoplazma retikulumunda gözlenen düşük dansiteli lipoproteinlerle benzer olduğu düşünülmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2003; Ross vd., 1995). Hepatositler çok sayıda mitokondri içerirler. Bunların sayıları her bir hepatositte yaklaşık 2000 tanedir. Mitokondriler tübüler kristalidirlar, şekilleri ve büyüklükleri hücrenin fizyolojik koşullarına göre değişir (Junqueira ve Carneiro, 2003).

Hepatositler sayıları 200-300 arasında değişen bol miktarda peroksizoma sahiptirler. Peroksizomlar membranla sarıdırlar ve 0,2-1,0 µm arasında değişen çeşitli

büyükliklere sahiptirler. Peroksizomlar kristalin bir öz içerirler (Kierszenbaum, 2003; Ross vd., 1995). Peroksizomlar solunum organelleridirler.  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$ 'ya çeviren katalaz enzimini ve alkol dehidrogenaz enzimlerini içerirler. Peroksizomlar aynı zamanda glukoneogenezde pürin, alkol ve lipit metabolizmalarında özellikli oksidatif fonksiyonlara sahiptirler. Hepatosit lizozomları genellikle safra kanalikülleri yakınında lokalizedirler. Pigment granülleri, miyelin figürleri ve sindirilmiş sitoplazmik organel kısımlarını içerirler (Ross vd., 1995).

### **1.2.3.2. Karbon tetraklorür ve etki mekanizması**

Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların gerçekleşmesi esnasında oluşabildiği gibi çeşitli ekzojen etkenlerin etkisi ile de oluşabilmektedir. Bu ekzojen etkenlerden birisi de karbon tetraklorürdür ( $CCl_4$ ).

Karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ) renksiz, berrak, uçucu bir sıvıdır. Önceleri kuru temizleme, yangın söndürme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede yararlanılan bu kimyasal bileşik; günümüzde petrol ürünleri, çeşitli yağlar, vernik, cila, reçine çözücüsü ve organik bileşiklerin imalatında kullanılmaktadır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak,  $CCl_4$ 'ü insan için olası kanserojen (grup B2) sınıfına dahil etmiştir (Weber vd., 2003, Thrall vd., 2000).  $CCl_4$  solunan hava, su, gıda alımı ve deriden temas yoluyla vücuda girer. Karaciğer, beyin, böbrek, kaslar, yağ dokusu ve kanda daha yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere tüm vücuda dağılır.  $CCl_4$  uygulamasında en fazla etkilenen organ karaciğerdir. Bundan dolayı  $CCl_4$  klasik ve model bir hepatotoksikandır (Weber vd., 2003).

$CCl_4$ 'ün karaciğerde mitokondriyal monooksijenaz (P450 2E1) sistemince metabolize edilmesi sonucu ortaya çıkan serbest radikaller membran proteinleri ve lipitlerine iki yolla saldırabilirler (Nadkarni ve Souza, 1988; Recknagel vd.,1989).

1-Direkt etki (kovalent bağlanma)

2-İndirekt etki

1-Metabolizma esnasında öncelikle stabil olmayan başlangıç metaboliti triklorometil ( $CCl_3\bullet$ ) serbest radikali oluşuktan sonra lipitler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak hızla triklorometil peroksite ( $CCl_3O_2\bullet$ ) veya hidrojen atomlarını

kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür. Daha sonra sekonder olarak oluşan konjuge dien, lipit hidroperoksit ve malondialdehid gibi yapılar ile kısa zincirli karbonhidratlar oluşur. Toksik etki sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri hücre membranlarındaki fosfolipitlerde bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olarak karaciğer hücre nekrozuna yol açarlar (Poli vd., 1990).

2-  $CCl_3\cdot$  radikalının oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen  $CCl_3O_2\cdot$  radikali de kuvvetli bir lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır. Bu olayları takiben serbest radikal üretimi karaciğerde antioksidan savunmaları aşar; bu da hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır (Akkuş, 1995). Karbon tetraklorür; karaciğerde hidropik dejenerasyon, yağlanma ile nekroz yapar (Kumar vd., 1997).

#### **1.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri**

Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süper oksit radikali ( $O_2\cdot^-$ ) ve hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipit peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar (Kumar vd., 1997).

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein, sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır. Nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede ROT'nin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir (Sies, 1991).

##### **1.2.4.1. Serbest radikallerin lipitlere etkileri**

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve

oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri ( $L\bullet$ ) ve lipit peroksit radikallerinin ( $LOO\bullet$ ) oluşması, ROT'nin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir.

Hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali ( $L\bullet$ ) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikallerinin ( $L\bullet$ ) moleküler oksijenle ( $O_2$ ) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ( $LOO\bullet$ ) oluşur. Lipit peroksit radikalleri ( $LOO\bullet$ ), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipitperoksitlerine ( $LOOH$ ) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Poli vd., 1990).

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit peroksitlerinin ( $LOOH$ ) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipit peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallere varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipit peroksitleri ( $LOOH$ ) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar (Recknagel vd., 1989).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (Placer vd., 1990). Nonenzimatik lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına neden olur (Recknagel vd., 1989).

#### **1.2.4.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri**

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır (Dean vd.,1997).

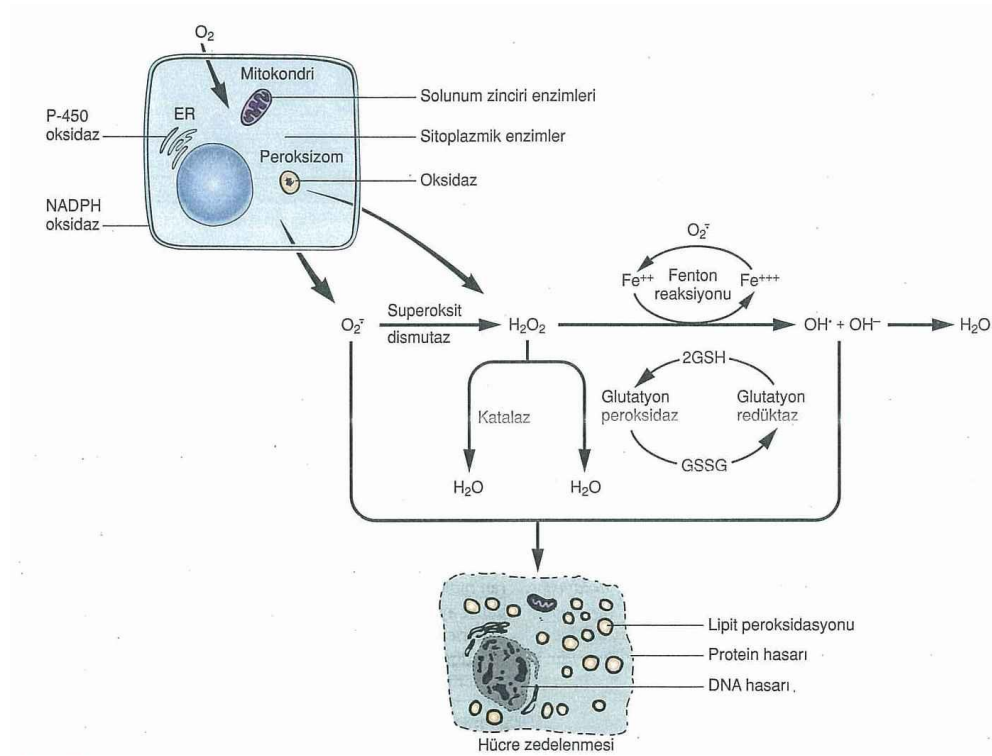
Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, kırılmalar, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

#### **1.2.4.3. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri**

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Valko vd.,2007).

#### **1.2.5. Antioksidan Savunma Sistemi**

ROT üretimi aerobik metabolizmanın kaçınılmaz ürünü olduğu için hücrelere hasar vermesini önlemek için ROT'ni uzaklaştırmaya yarayan sistemler gelişmiştir. ROT'nin üretimine katılan faktörler onları yok edecek olan antioksidan sistemin kapasitesinden daha ağır basarsa oksidatif stres ortaya çıkar. Bu denge bozulduğunda biyolojik zarar meydana gelir. Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin ve antioksidan mekanizmaların oluşumu Şekil 1.8.'de gösterilmektedir.



**Şekil 1.8.** Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin ve antioksidan mekanizmaların oluşumu (Kumar vd., 1997)

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler (Boyunağa ve Çelik, 1996);

**1. Süpürme etkisi:** Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engelleyip; oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Bu gruba örnek olarak süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler; ferritin, seruloplazmin ve metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinler verilebilir.

**2. Söndürme etkisi:** Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir.  $\beta$ -karoten, vitamin C, vitamin E, flavonoidler bu tür etkiye örnektir.

**3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi:** Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar.

**4. Onarma etkisi:** Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar. Bu gruba örnek olarak DNA tamir enzimleri ve metiyonin sulfoksit redüktaz verilebilir.



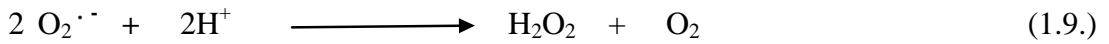
### 1.2.5.1. Bitkilerde ROT detoksifikasyonu

#### 1.2.5.1.1. Enzimatik mekanizmalar

$O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$ 'nin kendileri tehlikeli olmakla beraber bunların varlığında metal-katalizli Haber-Weiss reaksiyonunun bir sonucu olarak çok reaktif ve yüksek derecede toksik olan hidroksil radikali oluşabilir. Bu yüzden de oksidatif hasardan kaçınmak için  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$ 'nin konsantrasyonları düşük tutulmalıdır. Bu, bitki hücrelerinde SOD, askorbat peroksidaz ve katalazın aktivitesi ile başılır. Ayrıca Feritin ve diğer metal bağlayan proteinler hücrelerin hidroksil radikallerinden zarar görmesini engellemede önemlidir (Dernming ve Adams, 1992).

##### 1.2.5.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz süperoksit serbest radikalının ( $O_2^{\bullet-}$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.



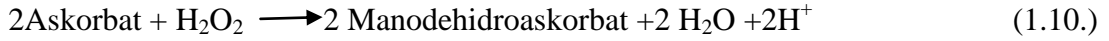
SOD'ın fizyolojik fonksiyonu süperoksit serbest radikalının ( $O_2^{\bullet-}$ ) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı oksijeni metabolize eden hücreleri korumaktır.

Üç tane önemli SOD ailesi vardır; CuZn SOD, Fe SOD ve Mn SOD. Bitkilerde en çok CuZn SOD bulunur ve sitosolde, kloroplastta ve apoplastta bulunur. Mn SOD mitokondride, sınırlı sayıda bitki türünde bulunan Fe SOD ise kloroplastlarda yer almaktadır. Stres altında artan ROT ile baş edebilmek için SOD aktivitesi indüklenir. SOD izozimlerinin ifadesi çevre koşullarına ve gelişimsel durumlara karşılık olarak farklı olarak düzenlenir (Mittler, 2002).

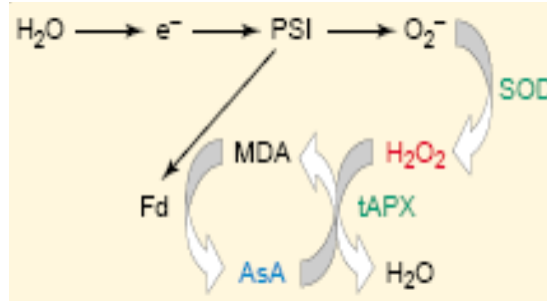
##### 1.2.5.1.1.2. Askorbat peroksidaz

SOD katalizli reaksiyonun bir ürünü olan  $H_2O_2$  hücreler için toksiktir ve hücrelerden  $H_2O_2$ 'yi yok etmek için etkin temizleme sistemleri bulunmalıdır. Bitkilerde başta gelen enzimler, peroksizomlar ve glioksizomlarla sınırlı olan katalaz ve kloroplastlarda, peroksizomlarda, glioksizomlarda, mitokondrilerde ve sitosolde bulunan askorbat peroksidazdır (Dernming ve Adams, 1992).

Askorbat peroksidaz askorbattan sağlanan elektronla  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$ 'ya redükler (Mittler, 2002).



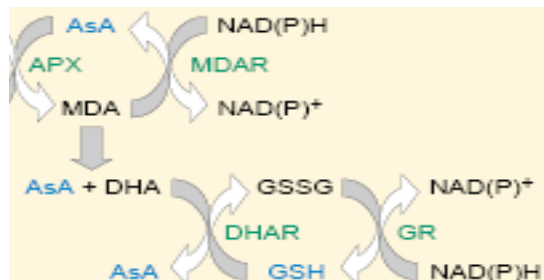
Bu reaksiyon tilakoide bağlı askorbat peroksidaz tarafından katalizlendiğinde oluşturulan Manodehidroaskorbat indirgenmiş ferrodoksinden sağlanan elektronlarla askorbata (AsA) indirgenir. Diğer askorbat peroksidaz izozimleri Manodehidroaskorbat ürettiğinde askorbat-glutasyon döngüsü yoluyla geri AsA'ya indirgenir (Şekil 1.9.). Bu döngüde Manodehidroaskorbat doğrudan monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR) tarafından NAD(P)H elektron vericisi olarak kullanılarak AsA'ya indirgenebilir (Mittler, 2002).



Şekil.1.9. Su-su döngüsü (Mittler, 2002)



Dönüşümlü olarak Manodehidroaskorbat kendiliğinden AsA ve dehidroaskorbata dönüşür. Bu durumda DHA, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından Glutasyon (GSH) elektron vericisi olarak kullanılarak indirgenir (Şekil 1.10.). Yükseltgenen Glutasyon (GSSG) NAD(P)H elektron vericisi olarak kullanılarak Glutasyon redüktaz (GR) tarafından indirgenir (Mittler, 2002).

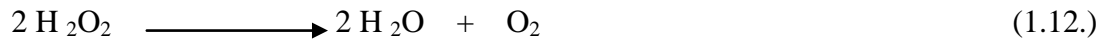


Şekil 1.10. Askorbat-Glutasyon Döngüsü (Mittler, 2002)

Askorbat peroksidaz  $H_2O_2$  için yüksek afinite gösteren bir proteindir. Enzimin, elektron vericisi olarak AsA için yüksek oranda spesifikliği vardır. Bununla birlikte sitosolik izoform farklı elektron vericilerini kullanabilir (Mittler, 2002).

#### **1.2.5.1.1.3. Katalaz**

Birçok hücre bölümünde bulunan askorbat peroksidazın tersine katalaz, sırasıyla fotosolunumda ve yağların oksidasyonunda oluşan  $H_2O_2$ 'yi ortadan kaldırmak için görev gördüğü peroksizomlar ve glioksizomlarla sınırlıdır. Şu yönüyle de askorbat peroksidazdan farklıdır; katalaz indirgeyici istemez,  $H_2O_2$  için düşük afiniteye sahiptir ve yüksek  $V_{max}$ 'a sahiptir. Bir hem proteini olan katalaz etkin bir şekilde  $H_2O_2$ 'yi yok etmek için çok yüksek konsantrasyonlarda bulunmalıdır. Şu reaksiyonu katalizler (Mittler, 2002);



#### **1.2.5.1.1.4. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)**

Glutatyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir (Noctor ve Foyer, 1998).

#### **1.2.5.1.1.5. Glutatyon redüktaz**

GSH-Peroksidaz vasıtasıyla hidrojen peroksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder (Noctor ve Foyer, 1998).

#### **1.2.5.1.1.6. Glutatyon-S-transferazlar (GST)**

Lipit peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GSH-Peroksidaz aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar (Noctor ve Foyer, 1998).



#### **1.2.5.1.1.7. Mitokondriyal sitokromoksidaz**

Solunum zincirinin son enzimidir, süperoksidi ( $O_2^{\bullet-}$ ) detoksifiye eder.



### **1.2.5.1.2. Diğer enzimatik olmayan mekanizmalar**

#### **1.2.5.1.2.1. Vitamin C (askorbik asit)**

Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. Bu yüzden de bitkileri oksidatif strese karşı korumada çok önemlidir. Ayrıca  $\alpha$ -tokoferol radikalinden E vitaminini oluşturarak onu indirgenmiş durumda muhafaza etmekte de önemlidir. Askorbat ayrıca askorbat peroksidaz ve violaksantin deepoksidaz için substrat olarak da işlev görür. Violaksantin deepoksidaz enzimi, FS II deki fazla uyarılma enerjisinin termal dağılımında anahtar olan ksantofil döngüsünde yer alır (Noctor ve Foyer, 1998).

#### **1.2.5.1.2.2. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)**

Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) çok güçlü bir antioksidandır. Hücre membran fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller (Graßmann, 2005; Seven ve Candan, 1996).

#### **1.2.5.1.2.3. Glutatyon (GSH)**

Glutatyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.  $Fe^{+2}$  halde tutarak protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (Noctor ve Foyer, 1998).

#### **1.2.5.1.2.4. Karotenoidler**

Vitamin A'nın ön maddesi olan  $\beta$ -karotenin tekli oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır. Proteinlere bağlı olan karotenoidler triplet klorofili ve tekli oksijeni söndürme yetenekleri sayesinde klorofili korumada özellikle önemlidirler (Müller vd., 2001).

#### **1.2.5.1.2.5. Demir şelatörleri**

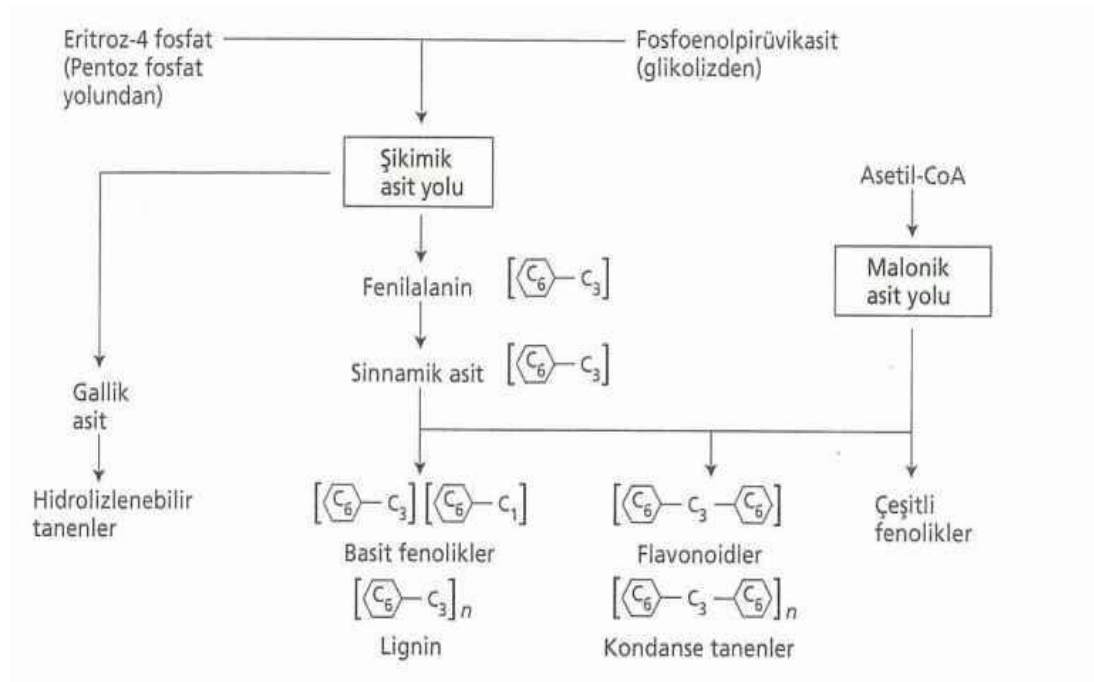
Demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler. Böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler (Seven ve Candan, 1996).

#### **1.2.5.1.2.6. Fenolik bileşikler**

Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Evans vd., 1997). Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir. Bitkilerde önemli sekonder metabolitler arasında yer alan fenolik bileşikler, yaklaşık 10 000 çeşit bileşiğin yer aldığı kimyasal olarak heterojen bir gruptur (Taiz ve Zeiger, 2008).

Fenolik bileşiklerin, yapılarındaki hidroksil grubundaki H atomunu vererek lipidlerin ya da diğer biyomoleküllerin oksidasyonunu sonlandırabilen etkili antioksidan moleküller olarak fonksiyon gördükleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Polifenollerin tokoferoller ve askorbata göre *in vitro* olarak daha iyi antioksidan olduğu bildirilmektedir. (Paganga vd., 1999; Foti vd., 1994).

Bitkisel fenolikler farklı yollardan sentezlendiklerinden metabolik anlamda oldukça heterojen bir grubu oluştururlar. İki temel metabolik yol bulunur; şikimik asit ve malonik asit yolları (Şekil 1.11.). Şikimik asit yolu pek çok bitkisel fenoliklerin sentezine katılır. Malonik asit yolu bakteri ve funguslarda fenolik ikincil ürünler için önemli bir kaynak oluşturmakla beraber yüksek bitkilerde daha az önem taşır (Taiz ve Zeiger, 2008).



**Şekil 1.11.** Bitkisel fenoliklerin sentezleri (Taiz ve Zeiger, 2008)

Şikimik asit metabolik yolu glikoliz ve pentoz fosfat yolunda oluşan basit karbonhidrat öncüllerini aromatik amino asitlere dönüştürür. Ara ürünlerinden biri şikimik asittir ve tüm tepkimeler dizisine adını vermiştir. Bitkilerde en sık rastlanan sekonder fenolik bileşik grupları fenilalaninden türevlenirler. Fenilalaninden amonyum molekülünün uzaklaşmasıyla sınnamik asit oluşur. Bu tepkimeyi katalizleyen fenilalanin amonyum liyaz (PAL) bitkisel sekonder metabolizmada en çok çalışılan enzimdir (Herrmann ve Weaver, 1999).

PAL, primer ve sekonder metabolizmanın tam ayrılma noktasında bulunduğundan birçok fenolik bileşiğin oluşumunda düzenleyici basamağı katalizler. PAL aktivitesi, düşük beslenme düzeyleri, ışık ve fungus enfeksiyonu gibi çevresel etmenlerin etkisiyle artış gösterir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, merkezi sinir sistemi hastalıkları, kanser, alkolik karaciğer hastalığı, akut renal yetmezlik, yaşlanma, romatit artrit, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur. ROT'nin ilişkili olduğu tüm bu fizyolojik koşullar ve hastalıklarda serbest radikal üretiminin

arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının ise yetersiz olduğu gösterilmiştir (Kukreja ve Hess, 1992; Dhalla vd., 2000; Finkel ve Holbrook, 2000; Sayre vd., 2001; Yamagishi vd., 2001; Jenner, 2003; Valko vd., 2007).

Hastalıkların patogeneğinde serbest radikallerin artışının ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliğinin rolü anlaşıldıkça yeni antioksidanların keşfi ve bunların bu hastalıklara karşı kullanımı son yıllarda birçok araştırmmanın odağı haline gelmiştir.

Sentetik antioksidanların karsinogenezin promotörü olarak aktivite gösterebilmelerinden duyulan endişe neticesinde bu maddelerin gıda katkıları olarak kullanılmalarına karşı küresel boyutta bir memnuniyetsizlik gelişmiştir (Ito vd., 1986; Namiki, 1990). Bu durum sentetik antioksidanların yerine doğal ve güvenilir olan antioksidanların kullanımını gündeme getirmiştir. Bu doğrultuda, son dönemde doğal antioksidanların keşfedilmesine yönelik araştırmalar giderek artmakta ve alternatif tıp kapsamında antioksidan potansiyeli yüksek bir çok bitkinin birçok hastalığa karşı kullanımı popüler hale gelmektedir (Dillard ve German, 2000).

Güçlü antioksidan özelliklere sahip yararlı pek çok metabolit içeren fotosentetik mikroalgler doğal antioksidan kaynakları arasında en çok ilgi çeken canlı grubudur. Mavi-yeşil algler ve mikroalgler yaklaşık olarak 3 milyar yıldır atmosferde bulunan oksijenin büyük bir çoğunluğunu üretmektedirler. Aynı zamanda bu organizmalar, süperoksit ve oksijen radikali gibi zararlı serbest radikalleri de üretmektedirler. Kendi membran lipitlerini ve hücrel komponentlerini bu zararlı radikallere karşı korumak için çeşitli oksidatif savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Hajimahmoodi vd., 2010).

Bugün mikroalgler tarafından sentezlenen birçok metabolit farmasötik biyoteknoloji ve gıda bilimi alanlarında gelecek vaad etmektedir. Yüksek oranda protein, vitaminler, yağ asitleri ve diğer pek çok kıymetli besinleri içeren mikroalgler, insanlar tarafından eskiden beri sağlıklı gıda desteği olarak tüketildiğinden dolayı dünya pazarlarında önemli bir arza sahiptir (Pulz ve Gross, 2004; Singh vd., 2005; Spolaore vd., 2006). Uzun zamandan beri yoğun bir şekilde üretimi yapılan en önemli mikroalglerden biri olan *Spirulina*, biyoteknolojik araştırmalarda önem taşıyan ve

besin maddesi olarak tüketilebilen, ekolojik ve ekonomik değer taşıyan bir mikroalgdir (Khan vd., 2005).

### 1.2.6. *Spirulina platensis*

*S. platensis* en fazla kültürü yapılan, kozmetikte, tıpta, insan ve hayvan gıdası olarak çeşitli sanayi alanlarında yaygın olarak kullanılan *Cyanophyceae* (Mavi-yeşil Algler) sınıfından prokaryotik bir mikroalgdir (Khan vd., 2005).

*Spirulina* çok eski çağlardan beri gıda olarak kullanılmaktadır. Aztekler, Meksika’da bulunan Texcoco Gölünden topladıkları *Spirulina*’yı kurutmuşlar ve “Tecuitlat” adını vermişlerdir. 1940’da Fransız fikolog Dangered, Afrikada Çad gölü çevresindeki halkın “Dihe” adını verdiği *S. platensis*’i yediğini ve bu insanların çevrede yaşayan diğer kabilelere oranla daha uzun boylu ve sağlıklı olduklarını belirtmiştir. 1965 yılında Fransız Petrol Araştırma Enstitüsü laboratuvarlarında yetiştirdiği *Spirulina* ’nın % 60-70 oranında protein içerdiğini yayınlamış ve bilimsel çalışmaların yoğunlaşması, ticari kültürlerinin yapılması bu tarihten sonra olmuştur. *Spirulina* birçok uluslararası kuruluş tarafından araştırılmış ve üretimi teşvik edilmiştir. 1970’li yıllarda Amerikan Uzay ve Havacılık Dairesi (NASA) tarafından uzay çalışmalarında kullanılmak üzere besin yapımında kullanılmıştır. Merkezi Fransa’da olan Beslenme Bozukluklarına Karşı Algokültür ile Mücadele Kurumu (Association Pour Combatre La Malnutrition Par Algoculture ACMA) beslenme bozukluklarına karşı Afrika ve Hindistan gibi açlık problemi olan ülkelerde halkı *Spirulina* üretip, yemeye teşvik ederek kalıcı bir yardım sağlama amacı gütmektedir. Bu amaçla yapılan projelerde beslenme bozukluğu nedeniyle hastanelere yatmış olan hastaların diyetlerine *Spirulina* konulması yoluyla tedavileri gerçekleştirilmektedir (Habib vd., 2008).

*Spirulina* ilk kez 1827’de TURPIN tarafından izole edilmiştir. Sarmal (spiral) şekilli mavi yeşil filamentler veya trikomlar *Spirulina*’nın karakteristik özelliğidir. Heterosistleri yoktur. Hücrede sarmal şekilli filamentlerle birlikte gaz dolu vakuollerin bulunması yüzmesine neden olmaktadır. Trikomlar 50-500 mikrometre uzunlukta ve 3-8 mikrometre genişliktedir. Kloroplastları yoktur; Klorofil a içerir, klorofil b içermez. Karotenoid, fikosiyanın, fikoeritrin içermektedir. Prokaryotik organizmalardır; kalıtsal materyal sitoplazma içerisinde dağılmış halde



bulunmaktadır. Çok hücreli, silindirik trikoma'nın kendi uzunluğu boyunca heliks biçiminde dizilişı ile tanınır. Flamentleri tektir, kendi eksenini etrafında kayarak hareket eder. Spiral şekli karakteristik özelliğidir ve farklı bölgelerde farklı boyutlarda spiral çaplı türleri vardır. Özellikle sıcaklık, fiziksel ve kimyasal koşullar gibi çevresel faktörler, heliks geometrisini etkiler. Hücre duvarı yapısında peptidoglukan bulunması nedeniyle *Spirulina* bakterilere benzer (Tomaselli, 1997).

Elektron mikroskobu ile gözlenen hücresel organizasyonunda morfolojik olarak sınırlanmış bir nükleus ve plastid mevcut değildir ve dışta gram negatif tipte bir zara sahiptir. Zarın kalınlığı yaklaşık 0,5 mikrometredir ve lifli ağ benzeri bir yapısı vardır. Hücre duvarı üzerinde bulunan porlardan salgılanan zar materyalinin, flament hareketi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çok tabakalı hücre duvarı incedir. Sitoplazma bölgesi esas olarak poliglukan tanecikleri ve gaz vesikülleri ile doludur. Ayrıca küçük ozmofilik granüller, fibriller ve yağ damlacıkları da vardır. Çevresel ve merkezi sitoplazma arasında yer alan tilakoid membranlar paralel olarak dizilmişlerdir ve birleşik vaziyette elektronları geçirmeyen fikobilizomları vardır. Tilakoidler, hücre duvarının uzun kenarına paralel, flamentleri ayıran çepere ise çaprazlama uzanan düz veya bükümlü desteler olarak görünürler. Düşük elektron yoğunluğuna sahip tilakoid içermeyen alanlar ribozomlar ve DNA fibrilleri ile doludur. *Spirulina* klorofilin sadece tek formuna, klorofil a'ya sahiptir. Ayrıca hepsinde karakteristik biliprotein pigmentleri olan, fotosentezde yakalayıcı pigment olarak fonksiyon gösteren fikobilinler mevcuttur. Fikobilinlerin bir sınıfı olan fikosiyaninler, mavi renklidir ve klorofil-a ile birlikte alge mavi-yeşil rengini verirler (Tomaselli, 1997).

*Spirulina*'nın kimyasal bileşimi protein, esansiyel yağ asitleri, karbonhidratlar, vitaminler, Ca, Mg, Fe, F, Selenyum, Çinko gibi önemli mineraller, karotenler, fikosiyanin, klorofil a gibi yapılardan oluşmuştur (Tokuşoğlu ve Ünal, 2003).

*Spirulina*, yüksek protein miktarına sahiptir. Yüksek protein içeriğinin % 10,9'unu lizin, % 7,5'unu valin ve % 6,8'ini izolisin gibi esansiyel amino asitler oluşturmaktadır (Clément vd., 2006). Ekstraksiyon metodları ile elde edilen *Spirulina* tozundaki yüksek protein gıda maddelerinde katkı olarak kullanılmaktadır. Kuru ağırlığının % 6-7 oranında lipit içeren *Spirulina*, linoleik asit (LA) ve  $\gamma$ -linoleik

asit (GLA) gibi esansiyel yağ asitlerini bünyesinde taşımaktadır. *S. platensis*'in biyokimyasal kompozisyonu Tablo 1.2.'de gösterilmektedir (Fox, 1996).

**Tablo1.2.** *S. platensis*'in biyokimyasal kompozisyonu (Fox,1996)

KOMPOZİSYON	% KURU AĞIRLIK
Protein	60-71
Karbonhidrat	13-16,5
Lipit	6-7
Mineral	6,4-9

*Spirulina* en zengin mikroalgal Gamalinoleik asit (GLA) kaynağıdır (Richmond, 2004). GLA bazı hayvanlarda büyümeyi uyararak cilt ve saçlarda parlaklık ve yumuşaklık sağlamaktadır. Gamalinoleik asitin ayrıca bir anti inflamatuvar olarak işlev göstermekte olduğu ve bazı eklem rahatsızlıklarının semptomlarını azalttığı bilinmektedir. *Spirulina*'da bulunan GLA, prostaglandin E (PGE) sentezini stimule ederek kolesterolü etkilemekte ve bu yolla *Spirulina*'nın kolesterolü düşürücü etkisi olduğu bildirilmektedir (Belay vd., 1993).

Son 10 yıl içinde yapılan araştırmalar *Spirulina*'nın potansiyel terapötik etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. *Spirulina*'nın sağlık üzerindeki olumlu etkilerini kanıtlayan çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalara *in vitro* deneyler, hayvanlar üzerindeki *in vivo* araştırmalar, insanlar üzerinde çiftkör placebo kontrollü klinik deneyler de dahildir. Bu *in vitro* ve *in vivo* deneyler sonucunda, *Spirulina*'nın antikanser, antiviral, immun sistemi güçlendirici, antioksidan, radyasyona karşı koruyucu, kolestrol düşürücü etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Khan vd., 2005).

Bunlara ek olarak Harward Tıp Fakültesi'nde yapılan bir araştırmada *Spirulina*'dan alınan su özütünün, HIV-1 virüsünün insan T-hücre dizilerinde çoğalmasını engellediği bulunmuştur. Bu araştırmaya göre, viral üreme yaklaşık % 50 oranında azalmıştır. Bunun üzerine *Spirulina* su özütünün “antiretroviral aktiviteye sahip olduğunu ve potansiyel klinik önemde olduğu” sonucuna varmışlardır (Ayehunie vd.,1998). Ayrıca *S. platensis*'ten elde edilen sülfatlanmış polisakkaritin, Kalsiyum Spirulinan, Herpes simplex virus tip 1, Influenza A virusu ve HIV-1 gibi bazı zarflı viruslerin replikasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Richmond, 2004).

Ağzında kanser öncesi lezyonlar bulunan tütün çiğneyicileri arasında yapılan bir araştırmada *Spirulina* alan grupta 44 vakanın 20'sinde (% 45) lezyonların bütünüyle gerilediği görülmüştür. Placebo grubunda yer alan kişilerde ise 43 vakanın yalnızca 3'ünde (% 7) gerileme görülmüştür. Tamamen gerileme göstermiş olan ve bir sonraki yıl boyunca *Spirulina* almayan 20 denekten 9'u (% 45) yeni lezyonlar geliştirmiştir (Mathew vd., 1995). *Spirulina*'nın alerjik rinit üzerindeki etkilerini araştıran Kaliforniya Üniversitesi'nde yapılan başka bir çalışma kapsamında *Spirulina* kullanan hastaların İnterlökin-4 sitokin seviyelerinin düştüğü gösterilerek *Spirulina*'nın alerjik rinit hastalığına karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Mao vd., 2005).

*Spirulina*, C-fikosiyanin ve allofikosiyanin olmak üzere iki biliprotein içerir. Bu mikroalgin protein fraksiyonunun yaklaşık % 20'si, suda çözünen mavi bir pigment olan fikosiyaninden oluşmaktadır (Cohen, 1997). Bu biliproteinlerin, yüksek molar absorpsiyon katsayıları, floresan kuantum verimleri, yüksek fotostabiliteleri nedeniyle flow sitometrisi için floresan işaretlemeye, yüksek verimli klinik analizler ve fikobiliprotein temelli reaktif oksijen türleri testlerinde kullanılmaktadır (Kronik ve Grossmann, 1983). *Spirulina*'dan ekstrakte edilen fikosiyanin gıda sanayiinde renklendirici, kozmetik endüstrisinde doğal boya olarak kullanılmaktadır (Sarada vd., 1999). Buna ek olarak çevre biyoteknolojisi kapsamında yapılan birçok araştırma *S. platensis*'in çeşitli endüstriyel atık sularından birçok ağır metalin ve boyanın uzaklaştırılmasında etkili bir biosorbent olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Solisio vd., 2006; Forlani vd., 2010).

*Spirulina* ile ilgili ilk ticari üretim Meksika'da başlamış ve yılda 100-300 ton üretim kapasitesine ulaşmıştır. 21. yy.'da *Spirulina* üretimi başta Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, Çin, Tayvan, Fransa, Meksika, İspanya gibi birçok ülkede kurulu 150 işletmeyle beraber 3000 tonu aşmıştır. *Spirulina* üretimi muhtemelen ve 2010'lu yıllarda da 8000 ton ürün ve 1,1 milyar dolar cirosuyla önemli bir sektör konumunda olacaktır. Kaliforniya ve Hawaii'de bulunan dünyadaki en büyük *Spirulina* üretim tesisleri Şekil 1.12'de görülmektedir (Habib vd., 2008).



**Şekil 1.12.** Hawai’de (a) ve Kaliforniya’da (b) bulunan *Spirulina* üretim tesisleri (Habib vd., 2008)

Ülkemizde çoğunlukla ithal yolla temin edilen *Spirulina* konusunda üretim çalışmaları da başlamıştır. Bu bağlamda 2000 yılında Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi ile sanayi işbirliği olarak ilk *Spirulina* üretim işletmesi kurulmuştur. Sonraki yıllarda, İzmir’in Menderes ilçesinde Ecolife *Spirulina* olarak ikinci bir işletme kurulması ve bunu takip eden girişimlerin olması, Türkiye’de *Spirulina* üretiminin yaygınlaşması bakımından sevindirici gelişmelerdir. Günümüzde ticari *Spirulina* üretimi yıllık 150 milyon dolar gelirle, birkaç ülkede kurulu şirketler vasıtasıyla yılda 3000 ton ve üzerinde üretimle devam etmektedir. Genel olarak tablet, kapsül ve kurutulmuş toz ürün şeklinde 70 ülkede eczanelerde, marketlerde, aktarlarda ve güzellik merkezlerinde tüketime sunulmaktadır. *Spirulina*’dan özütlenen ve ticari olarak ‘lima mavisı’ olarak da adlandırılan protein yapısındaki fikosiyanın, gıda ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılan bir renklendiricidir. Bununla birlikte *Spirulina* sahip olduğu zengin protein, mineral ve vitamin içeriğinden dolayı besin olarak da tüketilmektedir (Güler ve Gülmez, 2008).

### 1.3.LİTERATÜR ÖZETİ

*Spirulina*’nın antioksidan özellikleri son yıllarda birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Bu alandaki ilk çalışmalardan olan Manoj ve arkadaşlarının yaptığı araştırma *Spirulina*’nın alkol özütünün  $\alpha$ -tokoferol (% 35) ve BHA (% 45) ve beta karoten (% 48) gibi antioksidanlara göre lipit peroksidasyonunu çok (% 65) daha fazla önlediğini ortaya koymuştur (Manoj vd., 1992). Ayrıca *Spirulina*’nın su özütünün gallik asit (% 54) ve klorojenik asitten (% 56) daha iyi antioksidan etkiye (% 76) sahip olduğu gösterilmiştir (Zhi-gang vd., 1997).

Miranda ve arkadaşları (1998) *Spirulina*'nın metanol özütünün antioksidan aktivitesini *in vivo* ve *in vitro* olarak göstermiştir. *In vitro* antioksidan deneyleri kapsamında beyin homojenatını özütle birlikte ve özüksüz olarak 37°C'de inkübe etmişler ve rat beyin homojenatının peroksidasyonunun 0,5 mg metanol özütüyle % 95 oranında önlediğini bildirmişlerdir. *In vivo* antioksidan aktivite ise 2 ve 7 ay boyunca günlük 5 mg *Spirulina* dozu alan hayvanların karaciğer ve plazmalarında değerlendirilmiştir. İki ve yedi aylık süre sonunda beyin homojenatındaki plazma antioksidan aktivitesi sırasıyla deney grubu için % 97 ve % 71 iken, kontrol grubu için % 74 ve % 54 olarak bulunmuştur. Antioksidan etki tek başına ve/veya sinerjik olarak beta karotene, tokoferole ve fenolik bileşiklere bağlanmıştır (Miranda vd., 1998).

*Spirulina* ve *Chlorella* özütlerinin antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada *Spirulina* özütündeki toplam fenolik içeriğin *Chlorella* özütünden 5 kat daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. *Spirulina*'nın en çok kullanılan antioksidan aktivite testlerinden biri olan ABTS yöntemiyle tespit edilen antioksidan aktivitesi *Chlorella*'nın antioksidan aktivitesinden daha yüksek bulunmuştur. Yine antioksidan aktivite testleri arasında sık kullanılan bir antioksidan aktivite testi olan DPPH yöntemine göre yapılan çalışmalar da benzer sonuçlar vermiştir (Wu vd., 2005). Herrero ve arkadaşlarının (2004) yapmış olduğu başka bir araştırma kapsamında dört farklı çözücüde (hekzan, petroleum, su ve etanol) basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan *S. platensis* özütlerinin önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Fikosiyaninin saflaştırılması ve ticari olarak üretiminin gerçekleşmesiyle fikosiyaninin antioksidan, antiinflamatuvar etkisi *in vitro* ve *in vivo* olarak birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Alkoksil, peroksil ve hidroksil radikallerinin fikosiyanin tarafından temizlenmesi antioksidan aktivite testleri ile gösterilmiştir. Romay ve arkadaşları (1998a, 1998b, 2003) *in vitro* olarak fikosiyaninin hidroksil ve alkoksil radikallerini temizlediğini ve karaciğer mikrosomal lipid peroksidasyonunu önlediğini ve serbest radikal oluşturucusu olan AAPH'ın (2,2,-azobis2-amidinopropan dihidroklorit) indüklediği insan eritrosit hemolizini iyi bilinen antioksidanlar olan troloks ve askorbik asit gibi önlediğini bildirmişlerdir (Romay ve Gonzalez, 2001).

Vadiraja ve arkadaşları (1998) ratlarda karbon tetraklorürün ve R-(+) pligonun indüklediği hepatotoksitenin intraperitonel olarak fikosiyanın zerk edildiğinde ciddi şekilde azaldığını karaciğer enzimlerinin analizi yoluyla göstermiştir. Hirata ve arkadaşları (2000) fikosiyanın bir bileşeni olan fikosiyanobilinin *in vitro* antioksidan aktivitesinin alfa tokoferol, zeaksantin ve kafeik asitten daha fazla olduğunu göstermiştir. Bhat ve Madyastha (2001) fikosiyanın peroksil radikali temizleyicisi olarak etkin bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Fikosiyanın dikkat çekici bir şekilde  $Fe^{+2}$ - askorbik asit veya serbest radikal başlatıcısı olan AAPH muamelesinden sonra karaciğer mikrozomlarının lipit peroksitlerindeki artışı engellediği gösterilmiştir. İzole edilen mikrozomlara  $Fe^{+2}$ -askorbat varlığında fikosiyanın eklenmesi hepatik lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan TBARS ( Thiobarbiturik asit reaktif maddeleri) miktarında azalmaya neden olmuştur (Romay vd., 1998b). Yine bir çalışmada fikosiyanın farelerin karaciğerlerinde oluşturulan lipit peroksidasyonunu ve hepatosit hasarının göstergesi olan artmış AST ve ALT konsantrasyonlarını azalttığı bildirilmiştir. Bu durum fikosiyanın radikal süpürücü etkisinin yanında antiinflamatuvar etkisi ile inflamatuvar infiltrasyonu ve TGF- $\beta$  ifadesini engellemesi ile açıklanmıştır (Ou vd., 2010).

Bazı metallerin sistemik veya oral yolla alınımı oksidatif hasarın başlamasına neden olur. Metallerin indüklediği oksidatif hasara karşı *Spirulina*'nın koruyucu etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmalarda Pb, CdCl<sub>2</sub> ve HgCl<sub>2</sub>'ün ratlara verilmesiyle oksidatif hasar oluşturulan kontrol grubundaki ratlarla karşılaştırıldığında *Spirulina* sp. verilen ratlarda lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan TBARS (Thiobarbiturik asit reaktif maddeleri) miktarında, konjuge dien ve hidrojen peroksit seviyelerinde azalma gözlenirken, süperoksit dismutaz, selenyum, katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinde ise artma tespit edilmiştir (Upasani vd., 2001; Jeyaprakash ve Chinnaswamy, 2005; Kumar vd., 2005; Karadeniz vd., 2009).

Deney hayvanları ile yapılan birçok çalışma *Spirulina*'nın karaciğer üzerindeki koruyucu etkisini göstermiştir. Bu çalışmalardan birinde 5 gün boyunca simvastatin (75 mg/kg vücut ağırlığı), ethanol (% 20) ve hiperkolestrolemik diet (% 1 kolesterol) uygulanarak karaciğer yağlanması indüklenen CD-1 farelerinde ölçülen karaciğer total lipitleri, karaciğer total triaçilgliseroller, serum HDL ve serum triaçilgliserol

seviyelerinin 2 hafta boyunca % 10'luk *Spirulina* diyetiyle beslenen fare grubunda kontrol grubuna göre ciddi oranda azaldığı tespit edilmiştir (Blé Castillo vd., 2002).

*Spirulina*'nın hipolipidemik, kolestrol düşürücü, karaciğer triaçilgliserollerini azaltıcı etki göstererek, deney hayvanlarında yüksek kolestrol diyeti (Kato ve Takemoto 1984; Blé Castillo vd., 2002), % 60' lık fruktoz diyeti (Iwata vd., 1990; González de Rivera vd., 1993), karbon tetraklorür (Torres Durán vd., 1998; Torres Durán vd., 2006) ve alloksanla deneysel diabet oluşumu yoluyla (Rodríguez-Hernández vd., 2001) oluşturulan karaciğer yağlanmasını azalttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak ratlarda *Spirulina*'nın zengin antioksidan içeriği sayesinde hepatik lipit peroksidasyonunu azaltarak karbon teraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında gözlenen iyileşmede etkili olduğu da vurgulanmıştır (Torres Durán vd., 1998; Torres Durán vd., 2006).

Deney hayvanlarıyla yapılan bu prelinik çalışmalara ek olarak insanlar üzerinde gerçekleştirilen klinik birçok çalışma da *Spirulina*'nın hipokolesterolemik, hipoglisemik, hipotriaçilgliserolemik, hipolipidemik etki göstererek karaciğeri koruduğunu doğrulamıştır (Nayaka vd., 1988; Parikh vd., 2001, Samuels vd., 2002; Torres-Durán vd., 2007; Ferreira-Hermosillo vd., 2010).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Spirulina*'nın antioksidan aktivitesinin karaciğer üzerindeki etkisi çoğunlukla ticari olarak satılan *Spirulina* tabletlerinin veya saflaştırılmış fikosiyanınin ratlara verilmesi yoluyla çoğunlukla şu yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır; *in vitro* mikrozomal lipit peroksidasyonunun inhibisyonunun ölçülmesi, karaciğer enzimlerinin ya da serum ve karaciğer lipitlerinin, trigliserid, total kolestrol miktarının tespit edilmesi.

Literatürde antioksidan üretimi indüklenmiş *S. platensis* kültüründen elde edilen biyokütlenin *in vivoda* karaciğer üzerindeki serbest radikallere karşı koruyucu etkisinin ultrayapısal düzeyde değerlendirildiği bir çalışma yoktur.

## BÖLÜM 2

### MATERYAL VE METOD

#### 2.1. MATERYAL

##### 2.1.1. *Spirulina platensis*

Bu çalışmada kullanılan *Spirulina platensis* suşu Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı Plankton Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

##### 2.1.2. *Wistar albino*

Bu çalışmada 28 adet *Wistar albino* cinsi erkek rat kullanılmıştır. Çalışmadaki ratların hepsi deney süresince Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde standart nem, ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve oda ısısı (20-22 °C) koşullarında bulundurulmuştur.

#### 2.2. METOD

##### 2.2.1. Kültür Ortamı

*S. platensis*'i üretmek amacıyla bu çalışmada '*Spirulina* besi ortamı' kullanılmıştır (Schlösser, 1982). A ve B solüsyonları şeklinde eşit hacimde ayrı şişelerde hazırlanan besiyeri (pH 9,5) 121 °C 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril koşullar altında karıştırılmıştır. Kültür ortamının kompozisyonu Tablo 2.1'de gösterilmektedir. 30 °C sıcaklık 40  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  ışık şiddeti altında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık foto periyodu altında inkübe edilen *S. platensis* kültüründen her defasında kültürün % 10'u alt kültür için inokulum olacak şekilde kullanılarak *S. platensis* suşunun besiyeri ve kültür koşullarına alışması sağlanmıştır (Olguin vd., 2001 ; Leema vd., 2010).



**Tablo 2.1.** *Spirulina* besi ortamı (Schlösser, 1982)

Solusyon A	g/L	Solusyon B	g/L
NaHCO <sub>3</sub>	27,22	NaNO <sub>3</sub>	5,00
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8,060	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,000	NaCl	2,00
		MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,40
		CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,08
		PIV (ml)	12,0
		Chu (ml)	2,00

### 2.2.2. Biyokütle Yoğunluğunun Hesaplanması İçin Standart Eğrinin Oluşturulması

*Spirulina* biyokütle miktarlarının spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için deneyde kullanılan besiyerinde hazırlanan farklı kuru *Spirulina* biyokütle yoğunluğuna sahip çözeltiler için (g/L) 670 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk değerleri (Colla vd., 2007) kullanılarak “biyokütle konsantrasyonu-optik yoğunluk” standart eğrisi çizilmiştir. Bu eğrinin oluşturulmasında her bir yoğunluk için ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alınmıştır. Üç tekrarlı olarak yapılan bu deneyde besiyeri blank (kör) olarak kullanılmıştır.

### 2.2.3. Deney Ortamı ve Düzeneği

Deney için iklimlendirme dolabı 3 bölüme ayrılmıştır. “*Spirulina* besi ortamı” içeren kültür ortamları başlangıç biyokütle konsantrasyonları 0,12 g/L olacak şekilde daha önceden belirtilen kültür şartlarına adapte edilen kültürden inokule edilmiştir. *Spirulina* biyokütle konsantrasyonları standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır.

Her bölüme aynı şekilde 3'er adet kültür yerleştirilerek 3 grup şeklinde 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddeti, 30 °C sıcaklık, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodu sağlanarak inkubasyon başlatılmıştır. Her 24 saatte bir her gruptan 3'er örnek steril koşullarda alınarak 670 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Kültürün yoğun olduğu koşullarda örnek seyreltilerek kültür konsantrasyonu hesaplanmıştır. İnkubasyonun 120. saatinin sonunda Grup 2 ve Grup 3'deki kültürlerin ışık şiddeti sırasıyla 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  olacak şekilde değiştirilirken Grup 1'deki kültürlerin ışık şiddeti 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde sabit tutulmuştur. 168. saatin sonunda inkubasyon durdurularak her gruptaki kültürler ayrı

ayrı birleştirilerek 5 litrelik steril erlenmayerlerde toplanmıştır. Deney üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

#### 2.2.4. Büyüme kinetiği

Her grupta bulunan kültürler için hesaplanan ortalama biyokütle konsantrasyonları kullanılarak her grup için büyüme eğrileri çizilmiştir. Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin maksimum biyokütle konsantrasyonları ( $X_{max}$ ) Soletto ve arkadaşlarına göre (2008), büyüme oranları ( $\mu$ ) Hu ve arkadaşlarına göre (2000), produktivite (P) ise Colla ve arkadaşlarına göre (2007) aşağıdaki denklemlerle hesaplanmıştır;

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / \Delta t \quad (2.1.)$$

X= Biyokütle miktarı (g/L),

$\Delta t$  = zaman aralığı (saat)

$$\text{Prodüktivite (P)} = (X_i - X_0) / t_i \quad (2.2.)$$

$X_0$ = Başlangıçtaki biyokütle yoğunluğu (mg/L)

$X_i$ = i anındaki biyokütle yoğunluğu (mg/L)

$t_i$  =  $X_0$  ve  $X_i$  değerleri için geçen zaman (gün)

#### 2.2.5. Kültürlerin Hasat Edilmesi

5 litrelik steril erlenmayerlerde toplanan kültürler 50 ml'lik santrifüj tüplerinde 10000 rpm 4°C'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Pelet şeklinde elde edilen biyokütle steril distile suyla iki kere daha santrifüj edilerek besiyeri kaynaklı safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen biyoküteller daha ileriki analizlerde kullanılmak üzere -20° C'de saklanmıştır.

#### 2.2.6. Biyokütle Analizi

##### 2.2.6.1. Total karbonhidrat ve protein miktarının ölçülmesi

##### 2.2.6.1.1. Total karbonhidrat ve protein miktarı için özüt hazırlanması

Total karbonhidrat ve protein analizi için -20° C'de saklanan biyokütle örnekleri 0,1 M fosfat tamponunda (pH=7,4) ultrasonikasyon işlemi yoluyla ekstrakte edilmiştir

(Patel vd., 2005). Bu özütlerin 10000 rpm 4°C’de 30 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatantlar analizler için 4°C ’de muhafaza edilmiştir.

#### **2.2.6.1.2. Total karbonhidrat miktarının ölçülmesi**

Total karbonhidrat analizi fenol sülfirik asit metoduna göre yapılmıştır (Dubois vd., 1956). 1,5 ml örnek (blank için 0,1M fosfat tamponu) üzerine 4,5 ml sülfirik asit ve 1ml % 5 fenol konmuştur. Vortekslenen tüpler önce 10 dakika oda sıcaklığında daha sonra da yarım saat 30° C’deki etüvde bekledikten sonra 490 nm’de okunan absorbans değerleri kullanılarak total karbonhidrat miktarları hesaplanmıştır. Total karbonhidrat miktarlarının hesaplanabilmesi için 0,1 M fosfat tamponunda (pH=7,4) farklı glukoz konsantrasyonlarında 3 tekrarlı olarak bu protokole göre hazırlanan örnekler ile bu örneklerin 490 nm’de verdikleri absorbans değerleri kullanılarak standart eğri çizilmiştir ( $R^2=0,9989$ ,  $n=4$ ).

#### **2.2.6.1.3. Total protein miktarının ölçülmesi**

0,1 M fosfat tamponunda (pH=7,4) daha önce bahsedildiği gibi hazırlanan *S. platensis* özütlerinin içerdiği protein miktarı “Hartree Lowry Protokolü” ne göre belirlenmiştir (Hartree, 1972).

Bunun için 0,9 ml A Reaktifi üzerine 1 ml örnek (blank için 1 ml 0,1 M fosfat tamponu) eklenip karıştırılmıştır. Tüpler 50°C deki su banyosunda 10 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek her bir tüpe 0,1 ml B Reaktifi konulup 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüplere 3’er ml C Reaktifi konulup vortekslenmiştir. Tüpler önce 50°C’deki su banyosunda 10 dakika sonra da 25°C’de 15 dakika bekletilmiştir. Bu sürecin sonunda 650 nm’de tüplerdeki her bir solusyonun absorbansı ölçülmüştür. Deney her bir örnek için 3’er tekrarlı olarak hazırlanmıştır.

Deney kapsamında kullanılan A Reaktifi, son hacim 1 litre olacak şekilde distile su içinde; 2 g. NaKtartarat X 4H<sub>2</sub>O, 100 g. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 500 ml 1N NaOH’in çözülmesiyle hazırlanmıştır. B Reaktifi 2 g. NaKtartarat X 4H<sub>2</sub>O, 1 g. CuSO<sub>4</sub> X 5H<sub>2</sub>O, 10 ml 1N NaOH’in toplam hacim 100 ml. olacak şekilde distile su içinde çözülmesiyle elde edilmiştir. C Reaktifi ise 1 hacim Foulin Cioaltea reaktifinin 15 hacim distile su ile seyreltilmesinden oluşturulmuştur.

0,1 M fosfat tamponunda hazırlanmış olan *S. platensis* özütlerinin protein miktarının bu protokolle spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için öncelikle 0,1 M fosfat tamponunda hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltilerinin bu protokole göre belirlenen absorbanları kullanılarak “protein yoğunluğu-absorbans” standart eğrisi çizilmiştir.

#### **2.2.6.2. Total fikosiyenin miktarının ölçülmesi**

-20°C de saklanan *S. platensis* biyokütle örnekleri 0,1 M fosfat tamponunda (pH=7) ultrasonikasyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir (Patel vd., 2005). Elde edilen özütler 10 000 rpm 4°C’de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımlarının 562, 615 ve 552 nm dalga boylarındaki absorban değerleri tespit edilmiştir. Tespit edilen bu değerler Bennet ve Bogorad (1973) tarafından önerilen denkleme göre fikosiyenin miktarlarının spektrofotometrik olarak hesaplanmasında kullanılmıştır.

#### **2.2.6.3. Total klorofil ve karotenoid miktarının ölçülmesi**

##### **2.2.6.3.1. Total klorofil ve karotenoid miktarı için özüt hazırlanması**

-20°C’de saklanan *S. platensis* biyokütelleri metanolle ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ultrasonikasyon işlemi biyokütle renksiz olana kadar tekrar edilmiştir. Elde edilen metanol özütleri 10000 rpm 4°C’de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı tüplere alınmıştır (Sanchez vd., 2009).

##### **2.2.6.3.2. Total klorofil ve total karotenoid miktarının ölçülmesi**

Süpernatant kısımları alınan metanol özütlerinin içerdiği klorofil-a miktarlarının hesaplanması Welburn’a (1994) göre yapılmıştır. Bunun için örneklerin optik yoğunlukları blank olarak kullanılan metanole karşı 666 ve 653 nm’de okutulmuştur.

Total karotenoid miktarlarının tespit edilmesi için hazırlanan metanol özütlerinin 475 nm’deki absorbanı ölçülerek Zou ve Richmond’a göre (2000) hesaplama yapılmıştır. Blank olarak metanol kullanılmıştır.

##### **2.2.6.4. Total fenolik bileşik miktarının ölçülmesi**

Daha önce açıklandığı gibi ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış olan metanol özütlerinin 10000 rpm 4°C’de 30 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilen

süpernatantların rotary evaporatörde metanollerinin uzaklaşması sağlanarak özütlerin konsantre hale gelmesi sağlanmıştır. Total fenolik madde miktarının ölçülmesinde ve antioksidan aktivite testlerinde (ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesi, DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi, Fe İndirgeme Gücü Tayini) kullanılacak olan özütler için her alg örneği, konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

Elde edilen metanol özütlerinin içerdiği total fenolik madde miktarının ölçülmesi Foulin Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). Bunun için 0,2 ml metanolde hazırlanmış örneklerin üzerine (blank için 0,2 ml metanol ) 1'er ml 1:10 oranında seyreltilmiş Foulin Ciocalteu reaktifi konulmuştur. 25 °C' de 4 dakika inkübe edildikten sonra üzerlerine 0,8 ml doymuş NaCO<sub>3</sub> (75 g/L) çözeltisinden eklenip tüpler vortekslenerek 25 °C' de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu sürecin sonunda 765 nm'de tüplerdeki her bir çözeltinin absorbanı ölçülmüştür (Li vd., 2007). Deney her bir örnek için 3'er tekrarlı olarak hazırlanmıştır.

Metanolde hazırlanmış olan *S. platensis* özütlerinin total fenolik madde miktarının bu protokolle spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için öncelikle metanolde hazırlanan stok gallik asitin (500 µg/ml) farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin üç tekrarlı olarak bu protokole göre belirlenen absorbanları kullanılarak "fenolik madde konsantrasyonu-absorbans" standart eğrisi çizilmiştir.

### **2.2.7. Malondialdehit miktarının belirlenmesi**

Her gruptaki *S. platensis* biyokütlelerinin içerdiği MDA miktarının belirlenmesi Hodges vd.'ne (1999) göre yapılmıştır. Malondialdehit (MDA) miktarı tayini, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle saptanmıştır.

Konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde % 80'lik etil alkolde homojenize edilen *S. platensis* örnekleri 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Analiz iki aşamada yapılmıştır. Birinci aşamada sanrifügattan alınan 1 hacim ekstrakt üzerine 1 hacim % 20'lik TCA (Trikloroasetikasit) ve 1 hacim % 0,01'lik BHT (Butilhidroksitoluen) eklenmiştir. İkinci aşamada ise sanrifügattan alınan 1 hacim ekstrakt üzerine 1 hacim % 0,65'lik TBA içeren % 20'lik TCA ve bunun üzerine 1 hacim % 0,01'lik BHT eklenmiş ve örnekler karıştırılmıştır. Daha sonra sıcak su banyosunda (95 °C)

25 dakika inkübe edilmiş ve ardından şok soğutma yapılmıştır. Bu örnekler tekrar santrifüj edilmiş ve birinci aşama örnekleri 532 ve 600 nm’de, ikinci aşama örnekleri ise 532, 600 ve 440 nm’de absorbans okumaları yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\text{mmol MDA ml}^{-1} = (A-B / 157\ 000) \times 10^6 \quad (2.3.)$$

$$A = [(ABS_{532+TBA}) - (ABS_{600+TBA}) - (ABS_{532-TBA}) - (ABS_{600-TBA})]$$

$$B = [(ABS_{440+TBA} - ABS_{600+TBA}) \times 0,0571]$$

## 2.2.8. *In vitro* Antioksidan Aktivite Testleri

### 2.2.8.1. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) temizleme deneyi

Bu test yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH)’in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor rengin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır.

Bu metod için metanolde hazırlanmış stok DPPH çözeltisi ( $6 \times 10^{-5}$  mol/l) metanolla 1:10 oranında seyreltilmiştir. 0,1 ml metanolde hazırlanmış örnek üzerine bu seyreltilmiş DPPH çözeltisinden 3,9 ml eklenip 25 °C’de 2 saat bekletilmiştir. Deney başlangıcında blank (kör) tüpünün 516 nm’deki absorbans değeri ölçülmüştür (Wang vd., 2009). 516 nm’deki absorbansın azalması % DPPH inhibisyonundaki artışı göstermektedir.

BHT (Butilhidroksitoluen) bu testin kalibrasyonu için standart antioksidan olarak kullanılmıştır. Spektrofotometrik olarak “% DPPH İnhibisyonu-antioksidan konsantrasyonu” değerlerinin bulunabilmesi için BHT çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının üç tekrarlı olarak bu metoda göre tespit edilen absorbansları kullanılarak standart eğri çizilmiştir.

Farklı ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinden elde edilen metanol özütlerinin her birinin 5 farklı konsantrasyonu için bu metod 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Her metanol özütünün, % 50 DPPH inhibisyonunu sağlayan konsantrasyonunu ifade eden “IC<sub>50</sub> değeri” hesaplanmıştır.

### 2.2.8.2. ABTS radikal katyon temizleme aktivitesinin tespiti

ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesinin Tespiti için ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 7 mM konsantrasyonu sağlayacak şekilde distile suda çözülmüştür. Potasyum persulfat final konsantrasyonu 2,45 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. ABTS ve Potasyum persulfat solusyonu karıştırılarak elde edilen karışım 16 saat karanlıkta bekletilmiştir. Bu karışım spektrofotometrede 734 nm'de  $0,70 \pm 0,02$  absorbansı bulana kadar etanol ile seyreltilmiştir. 0,1 ml örnek ile ABTS radikal solüsyonunun 2,9 ml'si karıştırılmıştır. Bu karışım 30°C'de 20 dakika bekletilerek örneklerin absorbansları yeniden 734 nm'de ölçülmüştür (Re vd., 1999).

Troloks konsantrasyonu 4,5 mM olacak şekilde etanolde çözülerek standart bir stok antioksidan solüsyonu hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilen farklı konsantrasyonlardaki Troloks'un ABTS radikalini inhibe etme yüzdesi, her bir Troloks konsantrasyonun bu metoda göre 734 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bu hesaba göre çizilen standart eğri, *S. platensis* özütlerinin Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesinin bu protokolle spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için kullanılmıştır.

Farklı ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinden elde edilen metanol özütlerinin her birinin 5 farklı konsantrasyonu için bu metod 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Her metanol özütünün Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1} \pm \text{SD}$ ) hesaplanmıştır.

### 2.2.8.3. İndirgeme gücü tayini

Deney tüplerinde 1 ml metanol özütü (blank için 1 ml metanol), 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6) ve 2,5 ml % 1'lik potasyum ferrisiyanat karıştırılmıştır. Karışım 50 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. Karışıma 2,5 ml % 10'luk TCA eklenmiştir. 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatandan 2,5 ml alınmış ve üzerine 2,5 ml saf su ve 0,5 ml % 0,1'lik FeCl<sub>3</sub> eklenerek vortekslenmiştir. Karışımın absorbans değeri 700 nm' de okunmuştur (Jayaprakasha vd., 2001).

Buna göre, farklı ışık şiddetine maruz kalan alg örneklerinin demir indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak tespit edilebilmesi için farklı konsantrasyonlardaki askorbik asit çözeltilerinin bu metoda göre 700 nm'de verdikleri absorbans

kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Sonuçlar askorbik asit standart eğrisi üzerinden değerlendirilerek “Askorbik Asit Eşdeğeri = AAE” ( $\mu\text{M AAE g}^{-1} \pm \text{SD}$ ) olarak ifade edilmiştir. Deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

### **2.2.9. Ratlarda CCl<sub>4</sub> ile indüklenmiş akut karaciğer hasar modeli oluşturulması**

Deneye başlamadan önce *Wistar albino* cinsi erkek ratların hepsinin ağırlığı tespit edilip her gruptaki ortalama rat ağırlığının yaklaşık olarak aynı olması sağlanmıştır. Deney süresince pelet fare yemi ile ad libitum beslenen ratlar her grupta 7 rat olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır;

**Grup 1:** Bu gruptaki ratlara 30 gün boyunca distile suda çözülmüş *S. platensis* biyokütlesi yerine aynı miktarda distile su gavajla verilmiştir. 30 günün sonunda 1 ml/kg dozda zeytinyağı intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bu grup negatif kontrol grubu olarak işlev görmüştür.

**Grup 2:** Bu gruptaki ratlara 30 gün boyunca distile suda çözülmüş *S. platensis* biyokütlesi yerine aynı miktarda distile su gavajla verilmiştir. 30 günün sonunda 1:1 oranında zeytinyağında seyreltilmiş olarak 1 ml/kg dozunda CCl<sub>4</sub> intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bu grup pozitif kontrol grubu olarak işlev görmüştür.

**Grup 3:** Bu gruptaki ratlara 30 gün boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi distile suda çözülerek gavajla 800 mg/kg dozda verilmiştir. 30 günün sonunda 1:1 oranında zeytinyağında seyreltilmiş olarak 1 ml/kg dozda CCl<sub>4</sub> intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

**Grup 4:** Bu gruptaki ratlara 30 gün boyunca inkübasyonun 120. saatinde ışık şiddetinin 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ’ye artırılmasıyla antioksidan içeriği artırılmış *S. platensis* biyokütlesi distile suda çözülerek gavajla 800 mg/kg dozda verilmiştir. 30 günün sonunda 1:1 oranında zeytinyağında seyreltilmiş olarak 1 ml/kg dozda CCl<sub>4</sub> intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

CCl<sub>4</sub> verilerek akut karaciğer hasarı oluşturulmasından 24 saat sonra ratlar intraperitoneal olarak ketamin/ksilazin karışımı (ketamin; 67 mg/kg, ksilazin 6 mg/kg) verilerek anestezide alınmıştır. İlaç uygulaması yapılmadan önce her hayvan ayrı ayrı tartılarak, ilaç dozları vücut ağırlıklarına göre bireysel olarak hesaplanmıştır. Gıda verilmesi anesteziden 1-2 saat önce kesilmiştir. Deneklerin kanları terminal bir



yöntem olan intrakardiyak girişimle tüplere alınarak ratlar sakrifiye edilmiştir. Herbir karaciğerin aynı lobundan ışık mikroskopik incelemeler için 1 cm<sup>3</sup>'lük, elektron mikroskopik incelemeler içinse 1 mm<sup>3</sup>'lük örnekler alınarak uygun doku takip protokolü uygulanmıştır.

#### **2.2.10. Işık Mikroskopik Doku Takip Yöntemi**

Işık mikroskopik incelemeler için alınan doku örnekleri % 10'luk tamponlanmış formaldehit içinde fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından doku takip işlemlerine geçilmiştir. Bu amaçla dokular sırasıyla;

4 saat boyunca akarsuda yıkanma işlemi takiben dehidratasyon için;

% 70'lik etil alkolde 12 saat

% 80'lik etil alkolde 12 saat

% 90'lik etil alkolde 12 saat

Absolü alkolde 3 saat bekletilmiştir.

Şeffaflaştırma aşaması için dokular önce % 96'lık alkol ve ksilen ile 1/1 oranında hazırlanan solusyonda 15 dakika sonrasında ise saf ksilende 30 dakika bekletilmiştir. Parafin serilerinden geçirilerek parafin immersiyonu sağlanan dokular parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom ile kesilen 5-6 µm kalınlığındaki kesitler cam lamalar üzerine alındıktan sonra Hematoksilen-eozin ile boyanarak histolojik yapı değerlendirilmiştir.

#### **2.2.11. Elektron Mikroskopik Doku Takip Yöntemi**

Elektron mikroskopik değerlendirme için alınan doku parçaları Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5'lik gluteraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra üzerinde birkaç damla gluteraldehit olan dışı mumuyla kaplı petri üzerinde jilet yardımıyla 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalara ayrılmıştır.

Doku parçaları tekrar gluteraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat kadar tespit edilmiştir. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponunda 10 dakika çalkalanmıştır. Dokular ikinci kez Millonig fosfat tamponuna alındıktan sonra aynı tampon içerisinde bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün dokular Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1 lik osmium tetraoksit solüsyonu ile ikinci defa tespit edilmiş ve yine fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika yıkanmıştır.

Dokular daha sonra aşağıdaki sıraya göre dehidrate edilmiştir:

- % 50 Etil alkolde + 4° C’de 15 dakika
- % 70 Etil alkolde + 4° C’de 15 dakika
- % 86 Etil alkolde + 4° C’de 15 dakika
- % 96 Etil alkolde + 4° C’de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4° C’de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4° C’de 15 dakika

Buraya kadar olan işlemler buzdolabında + 4° C’de gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ise aşağıdaki işlemler oda ısısında yapılmıştır:

- % 100 Etil alkolde 15 dakika
- Propilen oksitte 15 dakika
- Propilen oksitte 15 dakika

Dehidrate edilen doku parçaları daha sonra aşağıdaki solüsyonlar içerisinde immerse edilmiştir:

- Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika
- Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (rezin) bulunan tüplere alınmıştır ve bir gece süreyle rotatorda karıştırılmıştır.

Gömme Materyali :

- Araldit 20 ml
- Sertleştirici DDSA (2,Dodesenilsuksinik asit anhidrit) 20 ml
- Hızlandırıcı 2,4,6-tris (dimethylaminomethyl) phenol 0,6 ml
- Plastikleştirici – Dibtil Fitalat 1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömülerek 60 °C’de etüvde 48 saat süreyle polimerize edilmiştir. Daha sonra elde edilen bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakılmıştır. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 500 A° kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplanarak % 70’lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds’un kurşun sitrat solüsyonları ile boyanmıştır. Boyanan kesitler JEOL JEM-1400 elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

### **2.2.12. İstatistiksel Analizler**

Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde tek yönlü ANOVA LSD testi kullanılmıştır.

Fenolik madde miktarı ile araştırma kapsamında incelenen diğer parametreler (DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi, Fe İndirgeme Gücü Tayini, ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesi, total karbonhidrat, total protein, total karotenoid, total klorofil ve total fikosiyanin miktarları) arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ve regresyon analizi kullanılarak incelenmiştir. Bu işlemler SPSS (SPSS 16.0 for Windows) paket programı kullanılarak yapılmıştır.

## BÖLÜM 3

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Üç ayrı grup halinde  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ışık şiddeti  $30^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta üreilmeye başlanan *S. platensis* kültürlerinde inkübasyonun 120. saatinde Grup 1'deki kültürlerin ışık şiddeti  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 'de sabit bırakılırken Grup 2'de ve Grup 3'de bulunan kültürlerin ışık şiddetleri sırasıyla  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ve  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  olarak değiştirilmiştir. Bu şekilde aniden arttırılan ışık şiddetinin alg kültürleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde, ışık şiddeti  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  'de sabit bırakılan Grup 1 kontrol grubu olarak işlev görmüştür.

#### 3.1. Biyokütle Yoğunluğunun Hesaplanması İçin Standart Eğrinin Oluşturulması

*Spirulina* biyokütle miktarlarının spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için deneyde kullanılan besiyerinde hazırlanan farklı kuru *Spirulina* ağırlığına sahip çözeltiler için (g/L) 670 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk değerleri kullanılarak biyokütle konsantrasyonu-optik yoğunluk standart eğrisi çizilmiştir. Her biyokütle konsantrasyonu için üç tüp hazırlanmıştır. Doğrunun regresyon analizi yapılarak  $R^2$  değeri 0,9992 olarak (n=5) bulunmuştur.

#### 3.2. Deney Ortamı ve Düzenegi

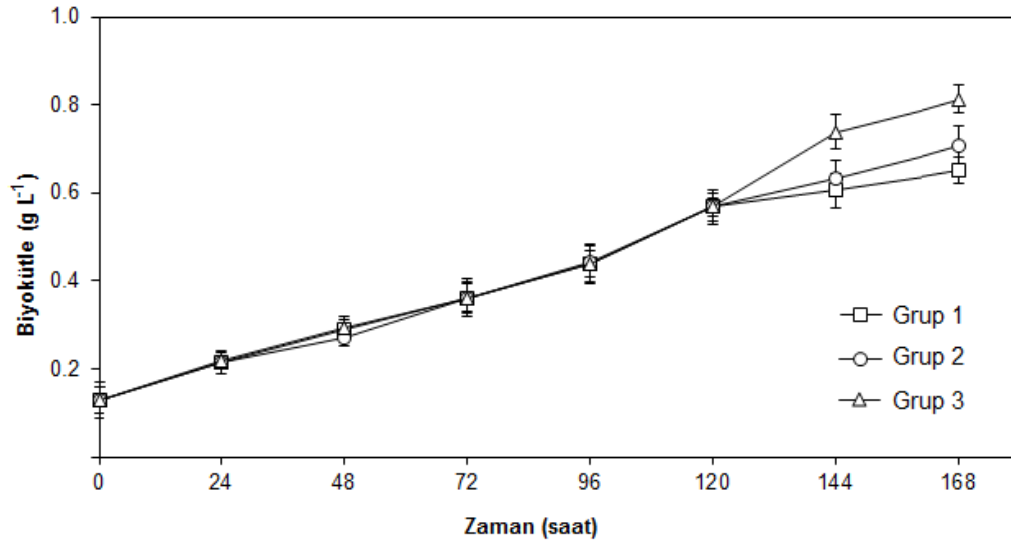
*Spirulina* biyokütle konsantrasyonu-optik yoğunluk standart eğrisi kullanılarak *Spirulina* biyokütle konsantrasyonu 0,12 g/L olacak şekilde "Spirulina besi ortamı" içeren kültür ortamlarına daha önceden belirtilen kültür şartlarına adapte edilen kültürden steril koşullarda alınarak inokule edilmiştir. Deney için iklimlendirme dolabı 3 bölüme ayrılmıştır. Her bölüme aynı şekilde 3'er adet kültür ortamı yerleştirilmiştir.  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ışık şiddeti,  $30^{\circ}\text{C}$  sıcaklık, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodu sağlanarak inkübasyon başlatılmıştır. 24 saat aralıklarla gruplardaki kültürlerden steril koşullar altında alınan örneklerin 670'nm'deki absorbans değerleri ölçülerek biyokütle yoğunlukları hesaplanmıştır. Kültürün yoğun

olduğu koşullarda örnek seyreltilerek kültür konsantrasyonu hesaplanmıştır. İnkübasyonun 120. saatindeki biyokütle yoğunluklarının ölçümünden sonra Grup 1'deki kültürlerin ışık şiddeti  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'de sabit bırakılırken, Grup 2 ve Grup 3'deki kültürlerin ışık şiddetleri sırasıyla,  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  olacak şekilde artırılmıştır. İnkübasyonun 164. saatinin sonunda üretim işlemi durdurulmuştur.

Bu süre sonunda en yüksek biyokütle yoğunluğu ( $X_{max}$ )  $0,8092 \pm 13 \times 10^{-4} \text{ g/L}$  ile  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde, en düşük biyokütle yoğunluğu ise  $0,6486 \pm 4 \times 10^{-4} \text{ g/L}$  ile  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde görülmüştür.  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde ise biyokütle yoğunluğu  $0,7011 \pm 55 \times 10^{-4} \text{ g/L}$  olarak bulunmuştur. Bu durum artan ışık şiddeti ile birlikte biyokütle yoğunluğunun da arttığını göstermektedir.

### 3.3. Büyüme kinetiği

Yirmi dört saat aralıklarla her gruptaki kültürler için hesaplanan biyokütle konsantrasyonu (g/L) değerleri kullanılarak kültürlerin büyüme eğrileri çizilmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** İnkübasyondan 120 saat sonra farklı ışık şiddetleriyle inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin zamana (saat) karşı değişen biyokütle ( $\text{g L}^{-1}$ ) yoğunlukları

Büyüme eğrileri incelendiğinde daha önceden aynı ortam koşullarına ve besiyerine adapte edilen taze kültürden inokulasyon yapıldığı için belirgin bir lag fazının olmadığı gözlenmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalar da bu bulguyu doğrulamaktadır (Colla vd., 2007 ; Radmann vd., 2007).

İnkübasyonun ilk 120 saatlik süreci sonunda, aynı sabit ışık şiddetinde inkübe edilen gruplar için ayrı ayrı hesaplanan büyüme oranları  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemiştir ( $p>0,05$ ) ve  $0,01236 \pm 7 \times 10^{-5}$  olarak bulunmuştur. İnkübasyon sürecininin 120. saatinden sonra Grup 2' deki kültürlerin ışık şiddeti  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'ye, Grup 3' deki kültürlerinki ise  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'ye yükseltilmiştir. Bu saatten sonra her grup için ayrı ayrı hesaplanan büyüme oranları istatistiksel açıdan anlamlı bir fark ortaya koymuştur ( $p<0,01$ ). Bu değerler Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin büyüme oranları ( $\mu$ ), produktivite (mg gün<sup>-1</sup>)

Grup No	Büyüme Oranı $\mu$ ( $h^{-1}$ )			Prodüktivite (mg gün <sup>-1</sup> )
	120-144 saat	144-168 saat	0-168 saat	
1	$0,003175 \pm 5 \times 10^{-6}$	$0,00294 \pm 114 \times 10^{-6}$	$0,0099 \pm 1 \times 10^{-4}$	$77,3561 \pm 0,0585$
2	$0,00536 \pm 4 \times 10^{-5}^{**}$	$0,00436 \pm 5 \times 10^{-5}^{**}$	$0,0103 \pm 1 \times 10^{-4}^{*}$	$85,4195 \pm 0,80252^{**}$
3	$0,0132 \pm 6 \times 10^{-6}^{**}$	$0,0038 \pm 7 \times 10^{-5}^{**}$	$0,0112 \pm 2 \times 10^{-4}^{**}$	$100,81 \pm 0,1948^{**}$

‘\*’ kontrol ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde farklılığı ve ‘\*\*’  $p < 0,01$  düzeyinde farklılığı ifade etmektedir. **Grup 1:** Sabit ışık şiddeti ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) **Grup 2:** 120.saat’de ışık şiddeti  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  **Grup 3:** 120.saat’de ışık şiddeti  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$

İnkübasyonun 120.-144. saatleri arasında her bir grup için hesaplanan büyüme oranları karşılaştırıldığında ışık şiddetindeki artışın en çok olduğu Grup 3’deki kültürlerin en yüksek büyüme oranına, sabit ışık şiddeti altında inkübe edilen Grup 1’deki kültürlerin ise en düşük büyüme oranına sahip olduğu görülmüştür. Fotosentetik doyum seviyesine kadar artan ışık şiddetiyle doğru orantılı olarak

büyüme oranlarının da arttığını ortaya koyan benzer çalışmalar bu sonucu destekler niteliktedir (Vonshak vd., 1982; Hihara vd., 2001; Danesi vd., 2004; Bhandari ve Sharma, 2006).

İnkubasyonun 144-168. saatleri arasında hesaplanan büyüme oranları incelendiğinde tespit edilen değerlerin bir önceki zaman aralığında hesaplanana göre kayda değer ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç Vonshak ve arkadaşlarının (1982) yaptığı bir araştırmanın sonuçlarıyla da uyumludur. Bu araştırma kapsamında Vonshak ve arkadaşları 0,40-1,0 g/L aralığındaki biyokütle yoğunluğuna sahip *Spirulina* kültürlerinde hücrelerin birbirleri üzerindeki gölgelendirme etkisinin fotosentetik potansiyelde bir azalmaya neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Fotosentetik potansiyeldeki bu azalma büyüme oranlarındaki azalmaya da yansımıştır. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında Grup 3'deki kültürler için hesaplanan büyüme oranındaki daha fazla azalma; bu grupta bir önceki inkubasyon periyodunda ışık şiddetinin daha fazla artmasıyla görülen yüksek fotosentetik aktivitenin bir sonucu olarak besiyerinin içeriğinin daha fazla azalmasından kaynaklanabilir.

Toplam 168 saatlik inkubasyon periyodu değerlendirildiğinde en yüksek biyokütle konsantrasyonu, büyüme oranı ve produktivite değerlerinin Grup 3'deki kültür örneklerinde tespit edildiği görülmüştür. Bu sonuç uyguladığımız iki basamaklı kesikli kültür üretimi yöntemiyle daha yüksek produktiviteye sahip *S. platensis* kültürlerinin elde edilebileceğini göstermektedir.

### **3.4. Biyokütle Analizi**

#### **3.4.1. Total Karbonhidrat ve Protein Miktarları**

##### **3.4.1.1. Total karbonhidrat miktarları**

0,1 M fosfat tamponunda (pH=7,4) ultrasonikasyon işlemi yoluyla elde edilen özütlerin içerdiği total karbonhidrat miktarı fenol sülfirik asit metoduna göre yapılmıştır. Total karbonhidrat miktarlarının hesaplanabilmesi için 0,1 M fosfat tamponunda (pH=7,4) farklı glukoz konsantrasyonları için 3 tekrarlı olarak bu metoda göre hazırlanan örnekler ile bu örneklerin 490 nm' de verdikleri absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki kullanılarak standart eğri çizilmiştir ( $R^2=0,9989$ ,  $n=4$ ). Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen alg kültürlerinden bu metoda göre

hazırlanan örneklerin 490 nm’de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğriden karbonhidrat miktarları hesaplanmıştır. Deney 3 tekrarlı olarak yapılarak hesaplanan değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edilmiştir. Her grup için elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür ( $p < 0,01$ ). Buna göre; 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinin içerdiği karbonhidrat miktarı  $104,22 \pm 2,65 \text{ mg/g}$  iken 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde bu değer  $157,1 \pm 3,5 \text{ mg/g}$ , 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde ise  $222,12 \pm 6,61 \text{ mg/g}$  olarak tespit edilmiştir.

#### **3.4.1.2. Total protein miktarları**

0,1 M fosfat tamponunda hazırlanmış olan *S. platensis* özütlerinin protein miktarlarının ‘Hartree Lowry Protokolü’ ile spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için önce 0,1 M fosfat tamponunda hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA (Bovine Serum Albumin)’ çözeltilerinin bu protokole göre belirlenen absorbansları kullanılarak “protein yoğunluğu-absorbans” standart eğrisi çizilmiştir. Doğrusal regresyon analizi sonucunda  $R^2 = 0,9910$  olarak bulunmuştur. Bu standart eğri yoluyla “protein yoğunluğu-absorbans” doğrusal ilişkisi kullanılarak hesaplanan total protein miktarları, her örnek için bulunan değerlerin ortalaması  $\pm$  standart hata olarak ifade edilmiştir. Her gruptaki kültür örnekleri için elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür ( $p < 0,01$ ). Buna göre; 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinin içerdiği protein miktarı  $641,25 \pm 3,5 \text{ mg/g}$  iken, 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde bu değer  $457,71 \pm 5,3 \text{ mg/g}$ , 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde ise  $323,83 \pm 1,84 \text{ mg/g}$  olarak tespit edilmiştir.

#### **3.4.2. Total klorofil ve karotenoid miktarları**

40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinden elde edilen metanol özütlerinin içerdiği klorofil-a miktarlarının Welburn’a göre hesaplanan ortalama değerleri sırasıyla  $16,494 \pm 4,09 \text{ mg/g}$ ,  $16,085 \pm 3,212 \text{ mg/g}$  ve  $15,81 \pm 3,329 \text{ mg/g}$  olarak bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



Total karotenoid miktarının tespit edilmesi için hazırlanan metanol özütlerinin 475 nm'deki absorbansı ölçülerek Zou ve Richmond'a göre hesaplama yapılmıştır. Buna göre 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinin içerdiği total karotenoid miktarı  $5,52 \pm 3,019 \text{ mg/g}$  iken 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde bu değer  $5,64 \pm 4,012 \text{ mg/g}$ , 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde ise  $7,0092 \pm 3,007 \text{ mg/g}$  olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerler istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ).

### 3.4.3. Total Fikosiyanin Miktarları

0,1 M fosfat tamponunda (pH=7) Patel ve arkadaşlarına (2005) göre ultrasonikasyon yöntemiyle ekstrakte edilen 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin içerdiği total fikosiyanin miktarları sırasıyla  $67,1 \pm 2,1 \text{ mg/g}$ ,  $266,4 \pm 5,08 \text{ mg/g}$  ve  $224,15 \pm 3,07 \text{ mg/g}$  olarak tespit edilmiştir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0,01$ ).

### 3.4.4. Total Fenolik Bileşik Miktarları

Total fenolik bileşik miktarlarının hesaplanabilmesi için standart bir fenolik bileşik olan gallik asitin farklı konsantrasyonlarında 3 tekrarlı olarak bu metoda göre hazırlanan örnekler ile bu örneklerin 765 nm'de verdikleri absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki kullanılarak çizilen standart eğrinin doğrusal regresyon analizi sonucu  $R^2$  değeri 0,9984 (n=4) olarak bulunmuştur.

Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen alg örneklerinden elde edilen özütlerin bu metoda göre 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak standart eğriden fenolik madde miktarları hesaplanmıştır. Üç tekrarlı olarak yapılan deney sonucu hesaplanan değerler "mg/g Gallik Asit Eşdeğeri=GAE" olarak ifade edilmiştir. Buna göre; 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinin içerdiği fenolik madde miktarı  $6,32 \pm 3,89 \text{ mg/g GAE}$  iken 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde bu değer  $25,73 \pm 3,16 \text{ mg/g GAE}$ , 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinde ise  $49,83 \pm 5,56 \text{ mg/g GAE}$  olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değerler istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ).

### 3.5. Malondialdehit (MDA) Miktarları

40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sabit ışık şiddeti altında inkübe edilen alglerde tespit edilen MDA miktarı  $1,8375 \pm 0,646 \mu\text{mol MDA/g}$  bulunmuştur. Işık şiddetinin 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'e çıkarıldığı alg grubunda bu değer  $3,5935 \pm 1,756 \mu\text{mol MDA/g}$  iken 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alglerde ise bu değer  $5,4565 \pm 3,619 \mu\text{mol MDA/g}$  'dır. Bu değerler birbirinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ( $p < 0,01$ ).

Üç grup halinde farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin biyokütle içerikleri Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

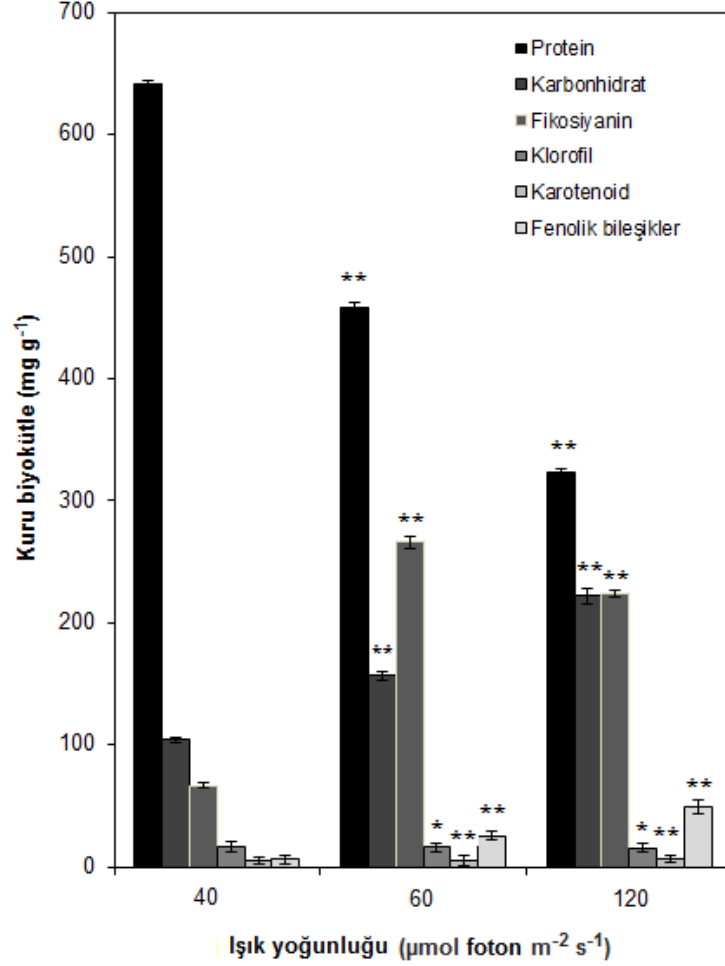
İnkübasyonun 120. saatinde ışık şiddetinin sırasıyla 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetine arttırıldığı Grup 2 ve Grup 3'deki kültürlerin biyokütle içerikleri incelendiğinde, sabit ışık şiddeti (40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) altında inkübe edilen Grup 1'deki kültürlere göre total karbonhidrat, karotenoid, fikosiyanın ve fenolik madde miktarlarında ciddi oranda artışların olduğu, total klorofil ve protein miktarlarında ise azalmaların olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum ışık şiddetinin aniden arttırılmasıyla ortaya çıkan yüksek ışık şiddeti ve Nitrojen eksikliğinin muhtemel sonucu olarak görülmektedir.

Nitrojen fikosiyanın gibi önemli hücresel birimlerin ve proteinleri oluşturan amino asitlerin yapısında yer alır. Nitrojen eksikliğinin mavi yeşil alglerde tüm karbonhidrat fraksiyonlarının sentezini uyardığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Fresnedo ve Serra, 1992; De Philippis ve Vincenzini, 1998).

Olguin ve arkadaşları (2001), yüksek ışık şiddeti ve Nitrojen eksikliğini, *Spirulina* sp. biyokütlesinin yüksek polisakkarit içeriğe sahip olmasına neden olan temel indükleyiciler olarak önermektedir.

Tomaselli ve arkadaşları (1997), yüksek ışık şiddeti altında çok daha fazla pigment birikiminin fotosentetik aktivitenin yüksek olmasına dolayısıyla da hücrelerin hızlıca karbonhidrat formunda fotosentetik olarak karbonu fikse etmesine neden olduğunu bildirmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda da daha yüksek ışık yoğunluğunun daha yüksek karbonhidrat ve daha düşük protein miktarına neden olduğu gösterilmiştir (Konopka ve Schnur, 1980; Tadros vd., 1993). Tüm bu çalışmalar,

sabit ışık şiddeti ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) altında inkübe edilen Grup 1'deki kültürlerle göre ışık şiddetinin sırasıyla  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetine arttırıldığı Grup 2 ve Grup 3'deki kültürlerde daha fazla total karbonhidrat ve daha düşük total protein miktarlarının tespit edilmesini desteklemektedir.



**Şekil 3.2.** Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin biyokütle içerikleri

‘\*’ Kontrol grubu ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sabit ışık şiddetinde inkübe edilen grup) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde farklılığı ifade eder.

‘\*\*’ Kontrol grubu ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sabit ışık şiddetinde inkübe edilen grup) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak  $p < 0,01$  düzeyinde farklılığı ifade eder.

Fotosentetik hücrelerde fazla ışık emiliminden kaçınmaya karşı olan korunma stratejisinin bir gereği olarak, yüksek ışık şiddetinin aksesuar pigment miktarında artışa neden olurken klorofil miktarında ise azalmaya neden olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Hihara vd., 2001; Orosa vd., 2001).

Işık şiddetinin sırasıyla 60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve 120  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetine arttırıldığı Grup 2 ve Grup 3'de bulunan kültürlerin biyokütle içerikleri, sabit ışık şiddeti altında (40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkübe edilen Grup 1'deki kültürlerin biyokütelleri ile karşılaştırıldığında klorofil miktarında azalma tespit edilmiştir. Bu azalma oranı ışık şiddetinin daha fazla arttırıldığı Grup 3'deki kültürlerde daha fazladır.

Hihara ve arkadaşları (2001) düşük ışık şiddetinden yüksek ışık şiddetine transfer edilen bir mavi-yeşil alg türü olan *Synechocystis sp.*'in alışma sürecinde öncelikle ışık emilimi ve fotokimyasal reaksiyonlarda yer alan genlerin ifade edilme düzeylerinin azaldığını sonrasında ise daha yüksek hücre bölünmesini sağlayan genlerin ifadesinin arttığını göstermiştir. Bunun yanında aşırı ışık enerjisinin emiliminden kaçınmak için klorofil miktarının azaltılmasının yüksek ışık şiddetinden korunmada etkili bir yöntem olarak başvurulduğu gösterilmiştir. Bir çok çalışma yüksek ışık şiddetinin klorofil miktarında azalmaya düşük ışık şiddetinin ise klorofil miktarında artışa neden olduğunu göstermiştir (Tomaselli vd., 1997; Olguin vd., 2001; Danesi vd., 2004; Garbayo vd., 2008). Stres koşullarının da klorofil miktarında azalmaya neden olduğu ayrıca belirtilmiştir (Tomaselli vd., 1997; Garbayo vd., 2008).

Yoğun ışıklandırma yoluyla oluşturulan oksidatif stresin alglerde karotenoidlerin birikimini indüklemeye etkili olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Yüksek ışık altında oluşan aşırı fotooksidasyonun reaktif oksijen moleküllerinin oluşumuna yol açtığı, bunun bir sonucu olarak da hücreleri oksidatif zarardan korumak için antioksidan karotenoidlerin biriktiği ifade edilmiştir. (Lers vd., 1990; Hirschberg vd., 1997; Orset ve Young, 1999; Boussiba, 2000; Orosa vd., 2001; Bohne ve Linden, 2002; Del Campo vd., 2007).

Yapılan çalışmalarda ROT'nin belirli transkripsiyon faktörlerinin ve sinyal transdüksiyon moleküllerinin ifade edilebilmesi için ikincil bir mesajcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Martindale ve Holbrook, 2002). Tuz stresi, sıcaklık stresi, ağır metal stresi gibi diğer stres koşullarında da ROT'nin arttığı bildirilmektedir (Boussiba, 2000; Nikookar vd., 2005; Sabatini vd., 2009).

Yapılan çalışmalar mikroalg türlerinden *Dunaliella sp.*'in yüksek miktarda  $\beta$ -karoten

sentezinde tuz stresi, besin sınırlaması yanında yüksek ışık şiddetine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. Bu durum karoten sentezinde ilgili genlerin ifadesinin ROT tarafından indüklenmesi ile açıklanmıştır (Ye vd., 2008).

Birçok çalışma yüksek ışık şiddeti, azot eksikliği gibi çevresel stres faktörleri altında mikroalg türlerinde ksantofil biriktirildiğini ortaya koymaktadır. Ksantofil oluşma oranını etkileyen çevresel koşullar arasında en önemli olanlarının ısı ve ışık olduğu ifade edilmiştir (Del Campo vd., 2000; Eonsen vd., 2003).

Ma ve Chen'in yaptığı bir çalışmada (2001) kimyasal yolla ROT oluşumu sağlanarak oluşturulan oksidatif stresin bir mikroalg türü olan *Chlorococcum zofingiensis*'in astaksantin üretimindeki rolü araştırılmıştır. Kültüre eklenen 0,1 mM hidrojen peroksitin kontrol grubuna göre sekonder karotenoid türlerinden biri olan astaksantin üretimini önemli oranda arttırdığı bulunmuştur. Astaksantin primer karotenoidler gibi fotosentetik birimde uyarılmış klorofilin fotokimyasal olarak yatıştırılmasında görev almaktan ziyade oksidatif hasarın önlenmesinde koruyucu olarak işlev gördüğü bildirilmektedir.

Her üç grupta bulunan kültürleri total karotenoid ve total fikosiyanın miktarları açısından karşılaştırdığımızda bu kültürlerden ışık şiddetinin aniden arttırıldığı Grup 2 ve Grup 3'deki kültürlerde Grup 1'deki kültürlere göre total fikosiyanın ve total karotenoid miktarlarında önemli ölçüde artışların olduğu gözlenmiştir. Bu durum fazla ışık şiddetinin zararlı etkilerinden korunmak için *S. platensis* kültürlerinde aksesuar pigment artışının beklenen sonucudur. Total karotenoid miktarındaki bu artışın, ışık şiddetinin  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'a arttırıldığı Grup 2'ye göre ışık şiddetinin  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'a arttırıldığı Grup 3'deki kültürlerde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Total fikosiyanın miktarları karşılaştırıldığında ise tam tersi bir durum söz konusudur. Işık şiddetinin  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'a arttırıldığı Grup 3'deki kültürlerde, ışık şiddetinin  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'a arttırıldığı Grup 2'deki kültürlere göre total fikosiyanın miktarı daha az artmıştır.

Daha fazla oranda artan ışık şiddeti fotosentetik aktiviteyi daha da arttırarak besiyerinde nitrojen eksikliğine bunu takiben de nitrojen rezervi olarak işlev gören fikosiyanın yıkımına neden olmuş olabilir. Bu durum, büyüme sürecindeki nitrojen eksikliğinin pigment kompozisyonunu etkileyerek fikosiyanın miktarında azalmaya,

karotenoid miktarında ise artmaya neden olduğunu ortaya koyan çalışmaları destekler niteliktedir (Loura vd., 1987; Bhandari ve Sharma, 2006).

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) oksidatif stresin indikatörü olarak kabul görmektedir. Sabit ışık şiddeti ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) altında inkübe edilen Grup 1'deki kültürler göre ışık şiddetinin sırasıyla  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetine arttırıldığı Grup 2 ve Grup 3'deki kültürlerde ışık şiddetindeki artışa paralel olarak daha fazla MDA miktarı tespit edilmiştir. Literatürde oksidatif stres altındaki hücrelerde MDA miktarının anlamlı derecede arttığını belirten birçok çalışma mevcuttur (Hodges vd., 1999; Malanga ve Puntarulo, 2006; Choudhary vd., 2007).

Işık şiddetinin aniden arttırılmasıyla MDA miktarının da istatistiksel açıdan anlamlı bir oranda ( $p < 0,01$ ) arttığı bulgusu ve yüksek ışık stresi altındaki hücrelerde yüksek karbonhidrat, düşük protein miktarının saptanması ışık şiddetinin aniden arttırılmasının *S. platensis* kültüründe bir strese neden olduğunu ortaya koymuştur.

Bitkilerde stres koşullarında sekonder metabolit olarak sentezlenen fenolik bileşikler bugün farmasötik biyoteknoloji kapsamında en çok ilgi çeken biyoaktif moleküllerin başında gelmektedir (Martins vd., 2011). Bugüne kadar *S. platensis*'in antioksidan aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar genellikle karotenoid, klorofil ve fikosiyanın üzerine odaklanmıştır (Miranda vd., 1998; Gonzalez vd., 1999; Estrada vd., 2001; Wu vd., 2005; Gershwin ve Belay, 2008).

Mikroalglerde fenolik bileşikler şu ana kadar düşük miktarlarda tespit edildiği için fazla ilgi çekmemiştir. İleri yapılı bitkilerde fenolik bileşikler ile antioksidan aktivite arasında pozitif korelasyon tespit edilirken mikroalglerde bu konuyla ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır (Evans vd., 1997).

Onofrejova ve arkadaşları (2010) mavi yeşil alglerde  $3,6 \mu\text{g g}^{-1}$  fenolik madde tespit etmişler ve fenolik maddelerin maviyeşil alglerde düşük miktarda sentezlendiğini ifade etmişlerdir. Hajimahmoodi ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada 12 adet topraktan izole edilen mikroalg türlerinde total fenolik madde miktarı  $0,00$  ile  $19,15 \pm 0,04 \text{ mg GAE g}^{-1}$  arasında bulunmuştur. Li ve arkadaşları (2007) ise 23 mikroalg türünün farklı fraksiyonlarının total fenolik madde miktarlarını incelemişler ve  $0,01-39,87 \pm 1,92 \text{ mg GAE g}^{-1}$  arasında çeşitlilik gösteren fenolik

madde miktarları tespit etmişleridir. Colla ve arkadaşları (2007) farklı sıcaklık ve nitrojen uygulamalarının bir sonucu olarak *S. platensis* biyokütlesinin total fenolik madde içeriğini  $2,42 \pm 0,21$  mg GAE  $g^{-1}$  ile  $4,99 \pm 0,29$  mg GAE  $g^{-1}$  arasında değişen değerlerde bulmuşlardır. Bu çalışmada ise sabit ışık şiddeti ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) altında inkübe edilen Grup 1 deki kültürler göre ışık şiddetinin sırasıyla  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetine artırıldığı Grup 2 ve Grup 3'deki kültürlerde total fenolik madde miktarının da artan ışık şiddetiyle birlikte anlamlı oranda ( $p < 0,01$ ) arttığı bulunmuştur. Kontrol grubuna göre, ışık şiddetinin  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'ye artırıldığı Grup 2'deki kültürlerde fenolik madde miktarı 4,071 kat artarken ışık şiddetinin  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'ye artırıldığı Grup 3'deki kültürlerde bu artış 7,88 kat olarak bulunmuştur.

### **3.6. *In vitro* Antioksidan Aktivite Testleri**

#### **3.6.1. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Temizleme Deneyi**

Öncelikle bu test yöntemi ile spektrofotometrik olarak “% DPPH İnhibisyonu-antioksidan konsantrasyonu” değerlerinin bulunabilmesinde kalibrasyon amacıyla BHT çözeltilisinin farklı konsantrasyonlarının bu metoda göre tespit edilen absorbansları kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Eğrinin regresyon analizi yapılarak 5 değer için  $R^2 = 0,9925$  olarak bulunmuştur.

Farklı ışık şiddetinde inkübe edilen alg örneklerinden elde edilen metanol özütlerinin her birinin 5 farklı konsantrasyonu için bu metod 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Her metanol özütünün, % 50 DPPH inhibisyonu sağlayan konsantrasyonu olan “ $IC_{50}$  değeri” hesaplanmıştır.  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alglerin metanol özütlerinin “ $IC_{50}$  değerleri” sırasıyla  $101,34 \pm 0,65 \mu\text{g/ml}$ ,  $49,05 \pm 2,99 \mu\text{g/ml}$ ,  $26,90 \pm 1,33 \mu\text{g/ml}$  olarak tespit edilmiştir.

#### **3.6.2. ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesi**

Farklı ışık şiddetinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin ABTS radikalini inhibe etme yüzdesinin bu protokolle spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için “Trolox Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )- % ABTS İnhibisyonu” standart eğrisi çizilmiştir. ( $R^2 = 0,9909$ ,  $n=4$ ). Bu eğriye göre;  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{mol foton}$

$m^{-2} s^{-1}$ ,  $120 \mu mol$  foton  $m^{-2} s^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alglerin metanol özütlerinin sırasıyla  $31,41 \pm 3,27 \mu mol/g$ ,  $48,20 \pm 0,58 \mu mol/g$  ve  $54,16 \pm 1,16 \mu mol/g$  Troloxa eşdeğer olduğu bulunmuştur.

### 3.6.3. İndirgeme Gücü Tayini

Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin indirgeme gücü tayininin bu protokolle spektrofotometrik olarak hesaplanabilmesi için “Askorbik Asit Konsantrasyonu (mM)-700 nm’deki absorbans” standart eğrisi çizilmiştir. ( $R^2 = 0,9984$ ,  $n=4$ ). 700 nm’de artan absorbans demir indirgeme gücünün arttığını göstermektedir. Bu eğriye göre;  $40 \mu mol$  foton  $m^{-2} s^{-1}$ ,  $60 \mu mol$  foton  $m^{-2} s^{-1}$ ,  $120 \mu mol$  foton  $m^{-2} s^{-1}$  ışık şiddetinde inkübe edilen alglerin sırasıyla  $25,63 \pm 0,35 \mu M/g$ ,  $28,61 \pm 1,46 \mu M/g$  ve  $35,57 \mu M/g \pm 1,03$  Askorbik Asite eşdeğerde (AAE) indirgeyici gücünün olduğu bulunmuştur.

Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin metanol özütlerinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri Tablo 3.2.’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** Farklı ışık şiddetlerinde inkübe edilen *S. platensis* kültürlerinin metanol özütlerinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri

Kültürlerin Grup Numarası	DPPH Temizleme Deneyi IC <sub>50</sub> ( $\mu g$ /ml)	ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesi ( $\mu mol$ Trolox $g^{-1}$ )	Demir İndirgeme Gücü Tayini ( $\mu M$ AAE $g^{-1}$ )
1	$101,34 \pm 0,65$	$31,41 \pm 3,27$	$25,63 \pm 0,35$
2	$49,05 \pm 2,99^{**}$	$48,20 \pm 0,58^*$	$28,61 \pm 1,46^*$
3	$26,90 \pm 1,33^{**}$	$54,16 \pm 1,16^*$	$35,57 \pm 1,03^*$

‘\*’ Kontrol grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ( $p < 0,05$ ) düzeyinde farklılığı belirtir.

‘\*\*’ Kontrol grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak  $p < 0,01$  düzeyinde farklılığı ifade eder.

**Grup 1:** Sabit ışık şiddeti ( $40 \mu mol$  foton  $m^{-2} s^{-1}$ ) altında inkübe edilen kültürler  
**Grup 2:** İnkübasyonun 120. saatinde ışık şiddetinin  $60 \mu mol$  foton  $m^{-2} s^{-1}$ ’e arttırıldığı kültürler  
**Grup 3:** İnkübasyonun 120. saatinde ışık şiddetinin  $120 \mu mol$  foton  $m^{-2} s^{-1}$ ’e arttırıldığı kültürler



### 3.7. Fenolik madde miktarı ile diğer parametrelerin korelasyonunun araştırılması

Fenolik madde miktarı ile araştırma kapsamında incelenen diğer parametreler (DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi, Fe İndirgeme Gücü Tayini, ABTS Radikal Katyon Temizleme Aktivitesi, total karbonhidrat, total protein, total karotenoid, total klorofil ve total fikosiyenin miktarları) arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ve regresyon analizi kullanılarak incelenmiş ve Tablo 3.3.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.3.** Fenolik madde miktarı ile araştırma kapsamında incelenen diğer parametreler arasındaki ilişkinin Pearson korelasyon katsayıları ve *p* değerleri

	Pearson korelasyon katsayısı $R^2$	<i>p</i> değeri
MDA miktarı	0,987	0,000
Total protein miktarı	0,977*	0,000
Total karbonhidrat miktarı	0,967	0,000
Total klorofil miktarı	0,749*	0,000
Total karotenoid miktarı	0,915	0,000
Total fikosiyenin miktarı	0,694	0,000
DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi	0,942	0,001
ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi	0,920	0,002
Demir İndirgeme Gücü	0,942	0,038

‘\*’ Negatif korelasyon belirtir.

Fenolik madde miktarı ile total karbonhidrat miktarı, karotenoid miktarı, MDA miktarı arasında iyi derecedeki pozitif korelasyon ile total protein ve klorofil miktarları arasındaki negatif yöndeki korelasyon fenolik madde üretimiyle bu parametrelerin ilişkisine de ışık tutmaktadır.

Mikroalglerde fenolik madde üretimiyle ilgili bilgiler çok kısıtlıdır. Bu veriler doğrultusunda *S. platensis*'de MDA miktarındaki, total karbonhidrat, karotenoid miktarındaki artışlar ile total protein ve klorofil miktarlarındaki azalmalara neden olan fizyolojik koşulların fenolik bileşiklerin sentezini indüklediği kanısına varılabilir.

*S. platensis* kültürlerinin fenolik madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon incelendiğinde, her üç antioksidan aktivite testi için de pozitif yönde yüksek Pearson korelasyon katsayısı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar fenolik

maddelerin *S. platensis*'in antioksidan aktivitesine önemli oranda katkı sağlayan bileşenler olduğunu göstermektedir.

Literatürde mikroalglerin antioksidan aktiviteleri ile fenolik madde içeriklerinin ilişkisi ile ilgili sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. Yakın zamanda Hajimahmoodi ve arkadaşları (2010) topraktan izole ettikleri 12 adet mikroalg türünün içerdiği fenolik madde miktarını ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, mikroalglerde fenolik madde içeriğiyle antioksidan aktivite arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, Li ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

Yapılan bu çalışmada Hajimahmoodi ve arkadaşlarının bildirdiği sonuçlar desteklenmektedir. Bu sonuçların aksine fenolik madde miktarıyla antioksidan aktivite arasında korelasyon olmadığını bildiren çalışmalarda araştırılan mikroalg türlerinin laboratuvar şartlarında herhangi bir strese maruz kalmadan optimum koşullarda yetiştirilen türler olması düşük fenolik bileşik miktarına sahip olmalarının ve fenolik madde içerikleriyle antioksidan aktiviteleri arasında bir korelasyon bulunamamasının nedenidir. Çünkü birçok biyoaktiviteye sahip sekonder metabolitler olan fenolik bileşiklerin miktarı, biyotik ve abiyotik stres koşullarında stresten korunmak için artmaktadır (Grace ve Logan, 2000; Hajimahmoodi vd., 2010).

Mikroalgler, evrimsel olarak ilk fotootrofik canlılardan olduğu için yüksek bitkilerde fenolik madde üreten aynı temel biyokimyasal yollara sahiptirler (Duval vd., 2000). Klejdus ve arkadaşları (2009) tarafından *S. platensis*'i de içeren bazı Cyanophyta suşlarında basit fenolik bileşikler incelenmiştir.

Bu çalışma kapsamında *S. platensis* ve *Spongiosachloris spongiosa*'da düşük miktarda benzoik asit ve sinamik asit türevleri ile hidroksil benzaldehidler tanımlanmıştır. Bu fenolik bileşikler, fotosentetik organizmalardaki diğer biyoaktif fenoliklerin sentezinde önemli öncül fenoller olarak bilinmektedir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Fenilalaninden sinamik asit biyosentezini kontrol eden "Fenilalanin amonyum liyaz (PAL)" ilk defa Cyanophyta'da bulunmuştur (Moffitt vd., 2007). Bu enzim, fenolik

bileşikleri sentezleyen fenilpropanoit yolağında öncül olarak görev almaktadır (Taiz ve Zeiger, 2008).

Abd El-Baky ve arkadaşları (2009) ise L-fenilalanin takviye edilen besiyerinde üretilen *S. platensis* kültürlerinin daha fazla fenolik bileşik içeriğine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, *Spirulina*'da fenolik bileşiklerin oluşumuyla ilgili metabolik yollar henüz tam olarak bilinmemektedir (Colla vd., 2007).

Fenolik maddelerin sentezindeki ilk basamaklar, fenilpropanoit yolu aracılığıyla karbon akışını içermektedir. Grace ve Logan (2000) stres koşullarında fenolik bileşiklerin biyosentezinin fotokimyasal enerjinin yayılması için alternatif bir yol olabileceğini ifade etmektedir. Ayrıca fenolik bileşiklerin sentezinin yüksek ışık koşullarında, fotokimyasal indirgeyici gücü harcamak suretiyle alternatif karbon gideri olarak işlev görerek ek bir fotokoruma sağladığını ortaya koymuşlardır. Elde ettiğimiz sonuçlar bu görüşü desteklemektedir.

Farmasötik biyoteknolojideki temel araştırma alanlarından biri de doğal kaynaklardan yeni biyoaktif moleküllerin araştırılması ve izole edilmesidir. Bu yüzden de bitkisel farmasötiklerinin araştırılması ve uygulamalarının yapılması bugün farmasötik ve nutrasötik gıda endüstrisinde büyük ilgi uyandırmaktadır. Bununla birlikte, bitkilerden elde edilen farmasötiklerle ilgili olarak GMP (İyi Üretim Uygulamaları) kurallarının arazide yetiştirilen bitkiler için tam anlamıyla adapte edilememesi, pestisit veya diğer çevresel kirleticilerin kalıntılarının kalması ihtimali gibi bazı kaygılar bu alandaki ilgiyi yüksek bitkiler yerine mikroalgler yönlendirmiştir (Ma vd., 2005).

Bioreaktörlerde herhangi bir çevresel kirletici içermeyen, kontrol edilebilen besiyerlerinde endüstriyel ölçekte kolayca üretimi yapılabilen mikroalglerin bitkilere göre olan bu avantajları onları daha ilgi çekici kılmaktadır (Li vd., 2007).

Mikroalgler arasında *S. platensis* içerdiği birçok antioksidanın yanında, yüksek protein içeriği, yüksek büyüme oranı, toksin üretmemesi gibi özelliklerinden dolayı yaygın olarak endüstriyel ölçekte üretimi yapılabilen bir mikroalgdir.

“*S. platensis* kültüründe ışık şiddetinin inkübasyon sürecinin logaritmik fazında aniden artırılmasıyla yüksek ışık stresi oluşumuna bağlı olarak antioksidan özellikli

biyoaktif moleküllerin sentezinin artacağı” hipotezinden yola çıkarak yürütülen bu çalışmada elde edilen veriler bu hipotezi doğrular niteliktedir.

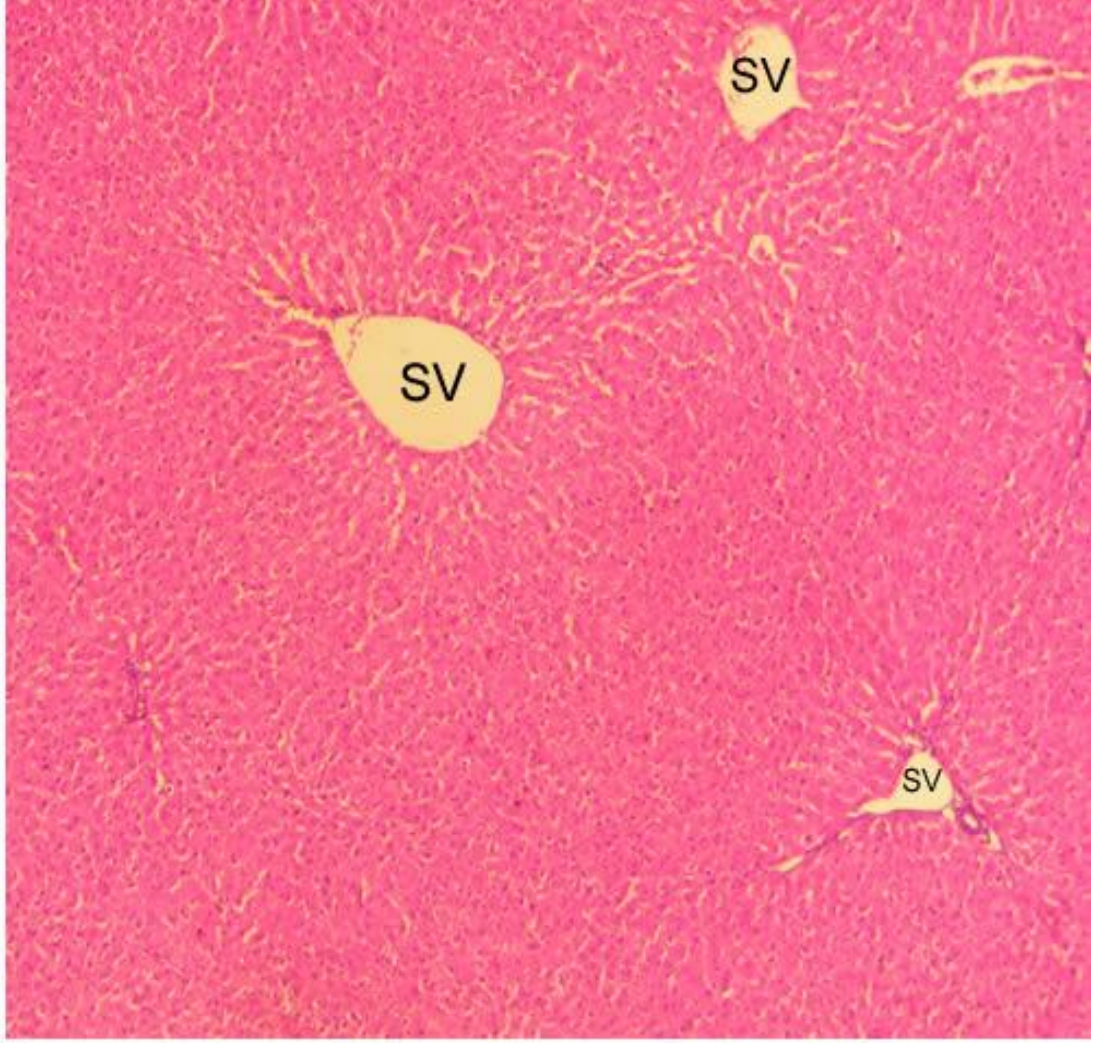
Daha önce ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi ışık şiddetinin aniden artırılmasıyla MDA miktarının da istatistiksel açıdan anlamlı bir oranda ( $p < 0,01$ ) arttığı bulgusu ve yüksek ışık stresi altındaki hücrelerde yüksek karbonhidrat, düşük protein miktarının saptanması ışık şiddetinin aniden artırılmasının *S. platensis* kültüründe bir strese neden olduğunu ortaya koymuştur.

Bu stres neticesinde alg kültürlerinde fikosiyanın ve karotenoid miktarlarındaki artışın yanında önemli sekonder metabolitler arasında yer alan fenolik madde miktarının da çok ciddi oranda arttığı bulunmuştur. Yapılan *in vitro* antioksidan aktivite testleri neticesinde fenolik madde miktarındaki bu artışa paralel olarak ışığın aniden artırıldığı alg kültürlerinde ışık şiddetiyle orantılı olarak antioksidan aktivitenin de önemli oranda arttığı tespit edilmiştir.

*In vitro* antioksidan aktivite testleri ile kontrol grubuna göre daha yüksek antioksidan aktiviteye ve daha fazla miktarda fenolik madde, karotenoid ve fikosiyanın miktarına sahip olduğu tespit edilen Grup 3'deki *S. platensis* kültürlerinin *in vivo*'daki antioksidan aktivitesi ratlarda CCl<sub>4</sub> ile indüklenmiş akut karaciğer hasar modeli oluşturulması yoluyla ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilmiştir.

### **3.8. Işık Mikroskobu Bulguları**

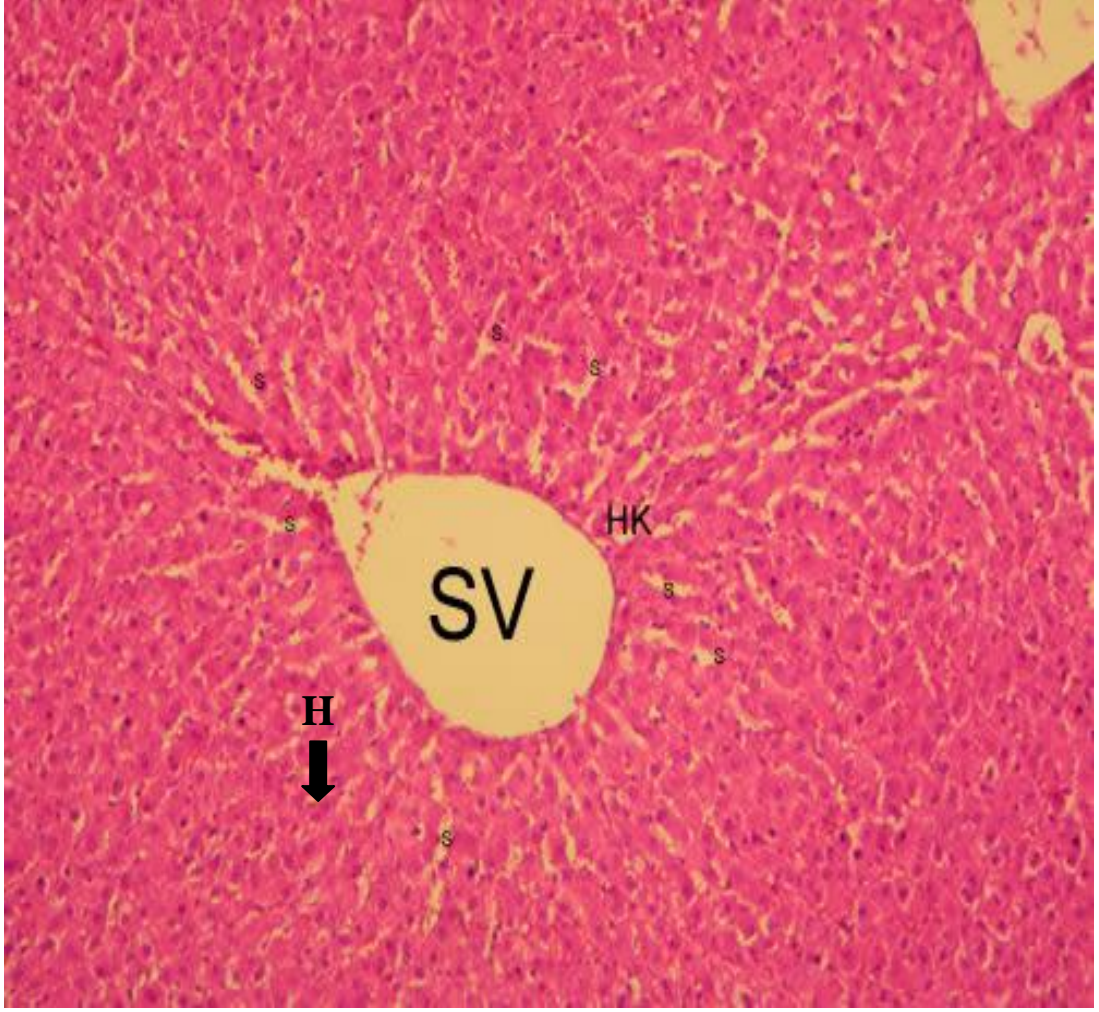
Negatif kontrol grubuna (Grup 1) ait karaciğer kesitleri histolojik olarak incelendiğinde normal parankimal yapı gözlenmiştir. Parankimayı oluşturan hücreler (hepatositler) santral ven etrafında başlayıp lobülün periferine ve portal alanlara doğru ışınsal olarak uzanan kordonlar oluşturmuştur (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.3.** Negatif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 1) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (4 X 10).SV: Sentral Ven

Bir ya da iki hücre genişliğindeki bu hücre kordonları arasında hepatik sinüzoidler olarak bilinen kan damarları görülmüştür. Nükleusları geniş, yuvarlak ve düzgün yüzeyli olan hepatositlerin nükleus sayıları genelde bir olup yer yer çift nükleoluslu hücrelere de rastlanmıştır.

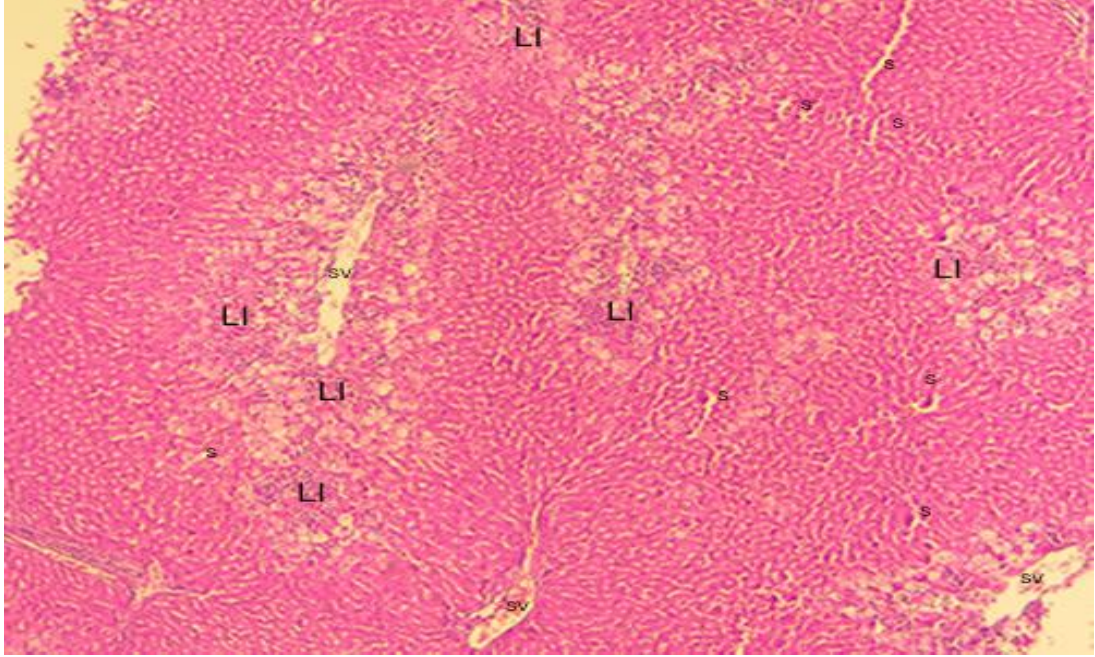
İyi korunmuş hepatosit kordonları ve sinüsoidal aralıkları içeren normal parankimal yapı görülmüştür. Hepatositlerin çekirdekleri belirgin, sitoplazmaları iyi korunmuştur (Şekil 3.4.).



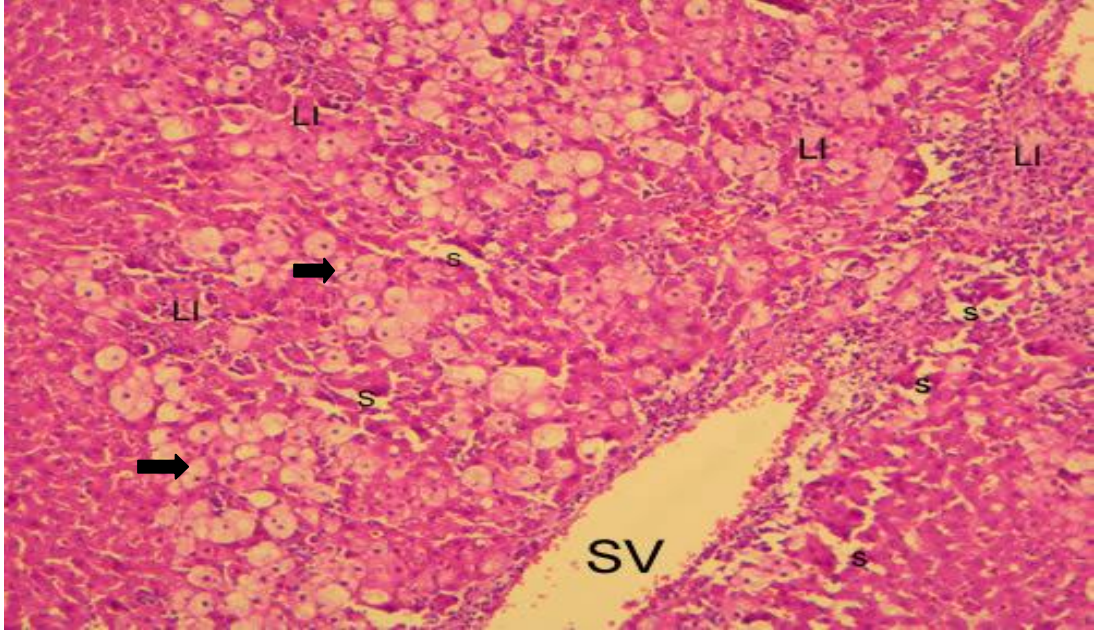
**Şekil 3.4.** Negatif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 1) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (10X10). **H:** Hepatosit **HK:** Hepatosit Kordonları **S:** Sinusoid **SV:** Sentral Ven

Sadece CCl<sub>4</sub> verilerek akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubundaki (Grup 2) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan preparatlarda yaygın karaciğer hasarı gözlenmiştir.

Lenfositik infiltrasyonun eşlik ettiği yaygın sentilobüler nekroz, sinusoidlerde dilatasyon ve karaciğer parankimal yapısında düzensizlik görülmüştür (Şekil 3.5., Şekil 3.6.).



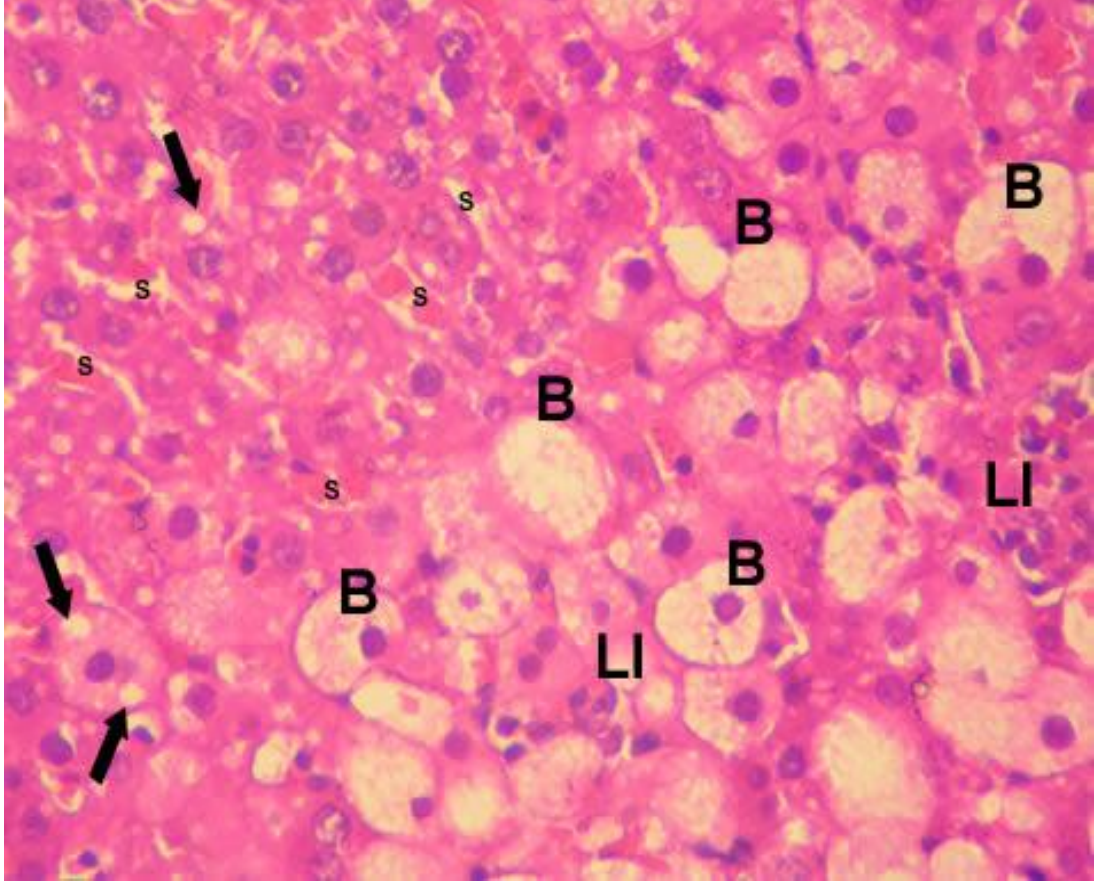
**Şekil 3.5.** Pozitif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 2) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (4X10) **LI:** Lenfositik infiltrasyon **SV:** Sentral Ven **S:** Sinusoid



**Şekil 3.6.** Pozitif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 2) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (10X10) **LI:** Lenfositik infiltrasyon **SV:** Sentral Ven **S:** Sinusoid

Yoğun lenfositik infiltrasyon bölgeleri (LI), balonlaşma şeklinde görülen hepatosit dejenerasyonu (oklar), sinusoidlerde dilatasyon izlenmiştir.

Hepatositlerde balonlaşma şeklinde görülen hidropik dejenerasyon (stoplazmik vakuolizasyon) ve mikrovesiküler steatosis şeklinde yağlanma dejenerasyonu tespit edilmiştir (Şekil 3.7.).

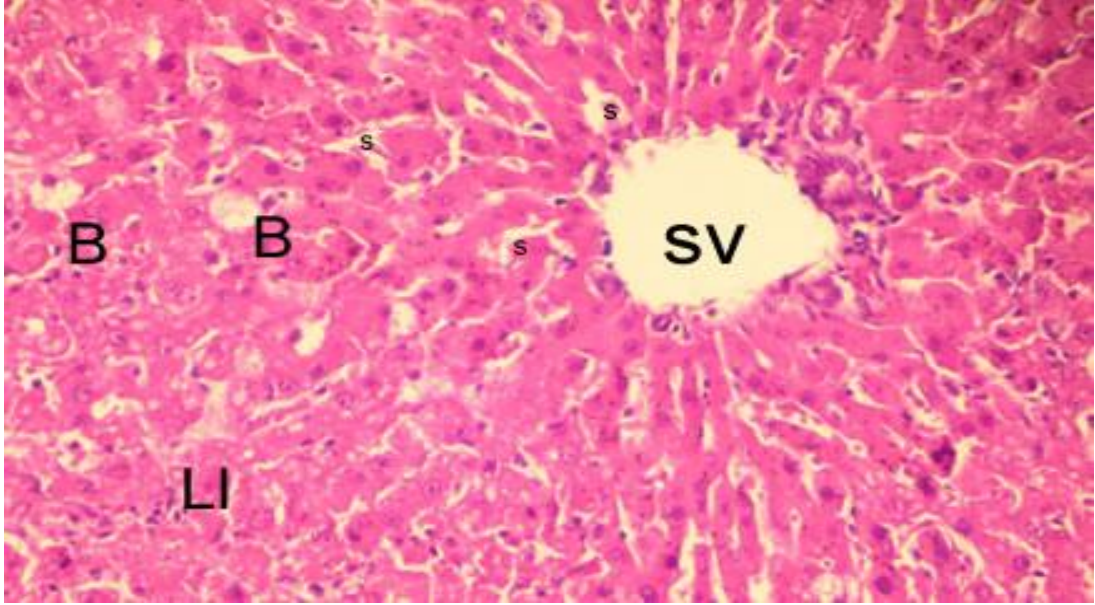


**Şekil 3.7.** Pozitif kontrol grubundaki ratlardan (Grup 2) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40X10) **B:** Balonlaşma dejenerasyonu, **LI:** Lenfositik İnfiltrasyon, **S:** Sinusoid

Hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu (B) ve mikrovesiküler steatosis şeklindeki yağlanma dejenerasyonu (oklar) net bir şekilde görülmüştür. Dejenere hepatositlerin arasındaki lenfositik infiltrasyon bölgeleri dikkat çekicidir.

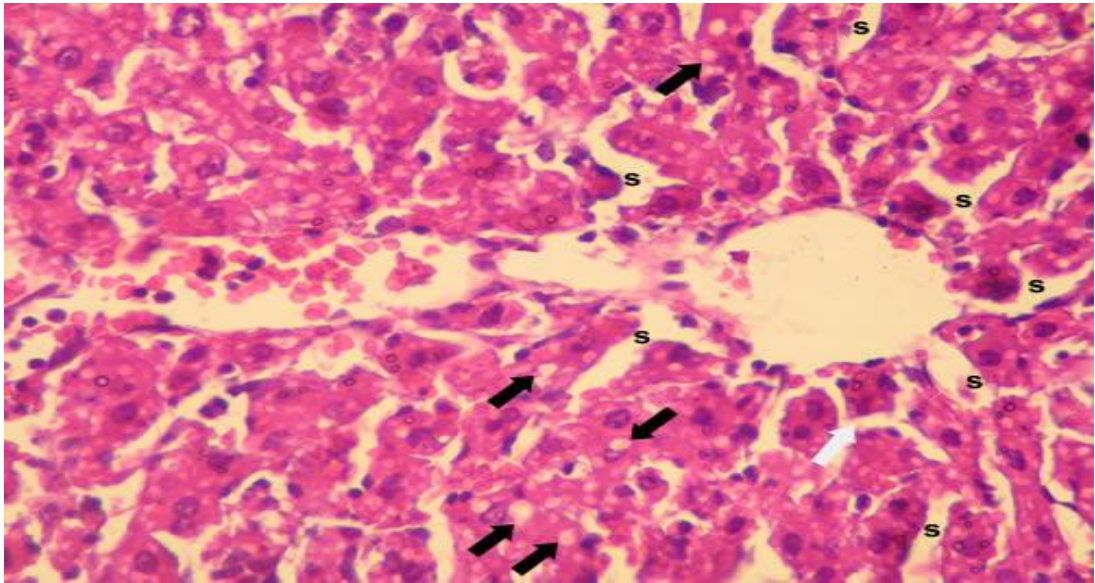
CCl<sub>4</sub> verilerek akut karaciğer hasarı oluşturulmadan önce bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi verilen Grup 3'deki ratların karaciğer örnekleri histolojik olarak incelendiğinde Grup 2'ye göre daha az nekrotik alan göze çarpmakla birlikte yine vakuolizasyon ve mikrovesiküler steatosis şeklinde hepatosit dejenerasyonu gözlenmiştir (Şekil 3.8., Şekil 3.9.).





**Şekil 3.8.** Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi verilen ratlardan (Grup 3) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (20X10) **B**:Balonlaşma dejenerasyonu **S**: Sinusoid **SV**: Sentral Ven **LI**: Lenfositik İnfiltrasyon

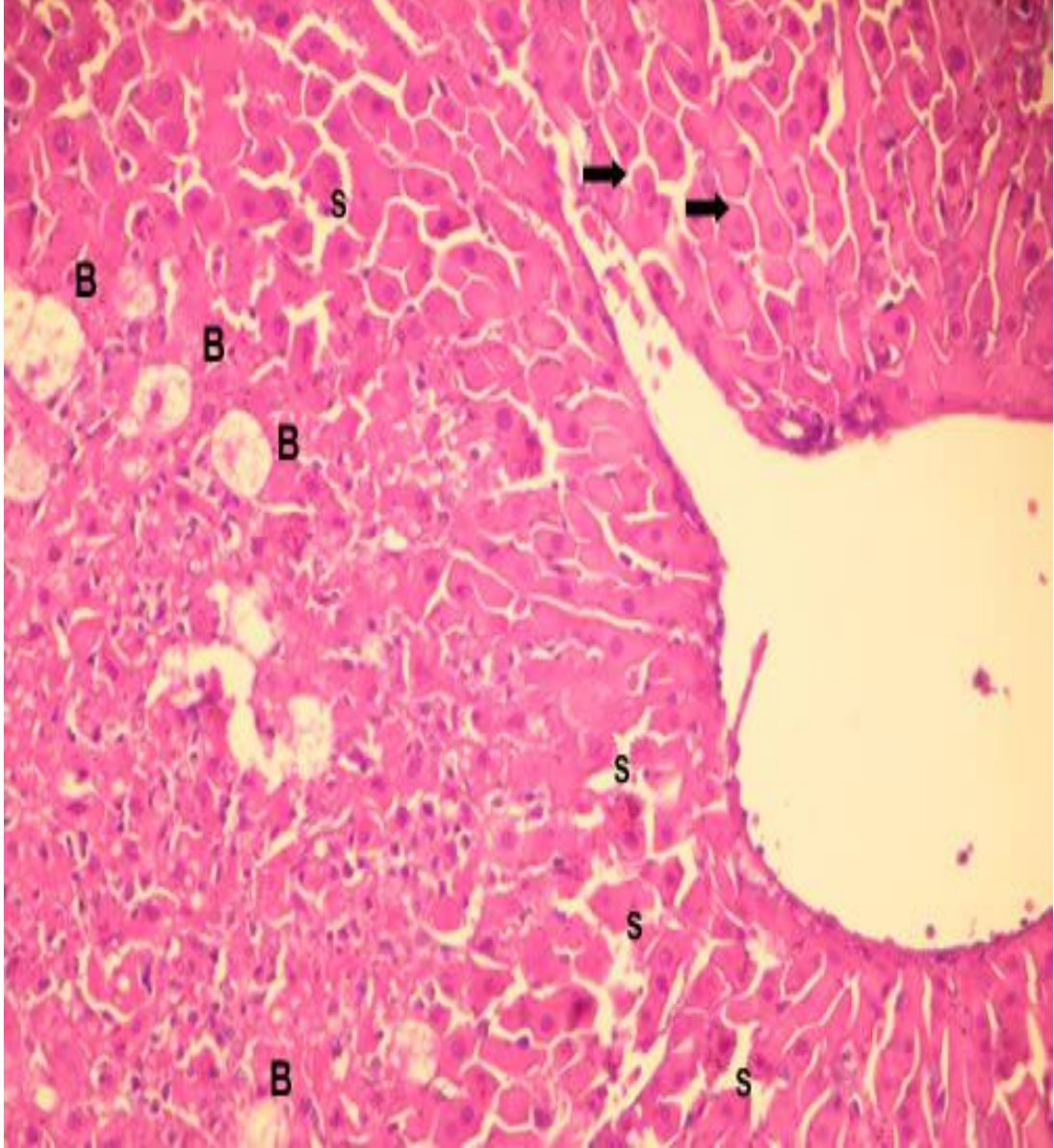
Parankimal yapıyı oluşturan hepatik kordlarda yer yer balonlaşma şeklinde hidropik dejenerasyon ve lenfositik infiltrasyon bölgeleri gözlenmiştir



**Şekil 3.9.** Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi verilen ratlardan (Grup 3) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40X10) **S**: Sinusoid

Hepatosit kordonlarını oluşturan hepatositler arasında kopmalar (beyaz ok) ve mikrovesiküler steatozis şeklindeki hepatosit dejenerasyonları (siyah ok) görülmüştür.

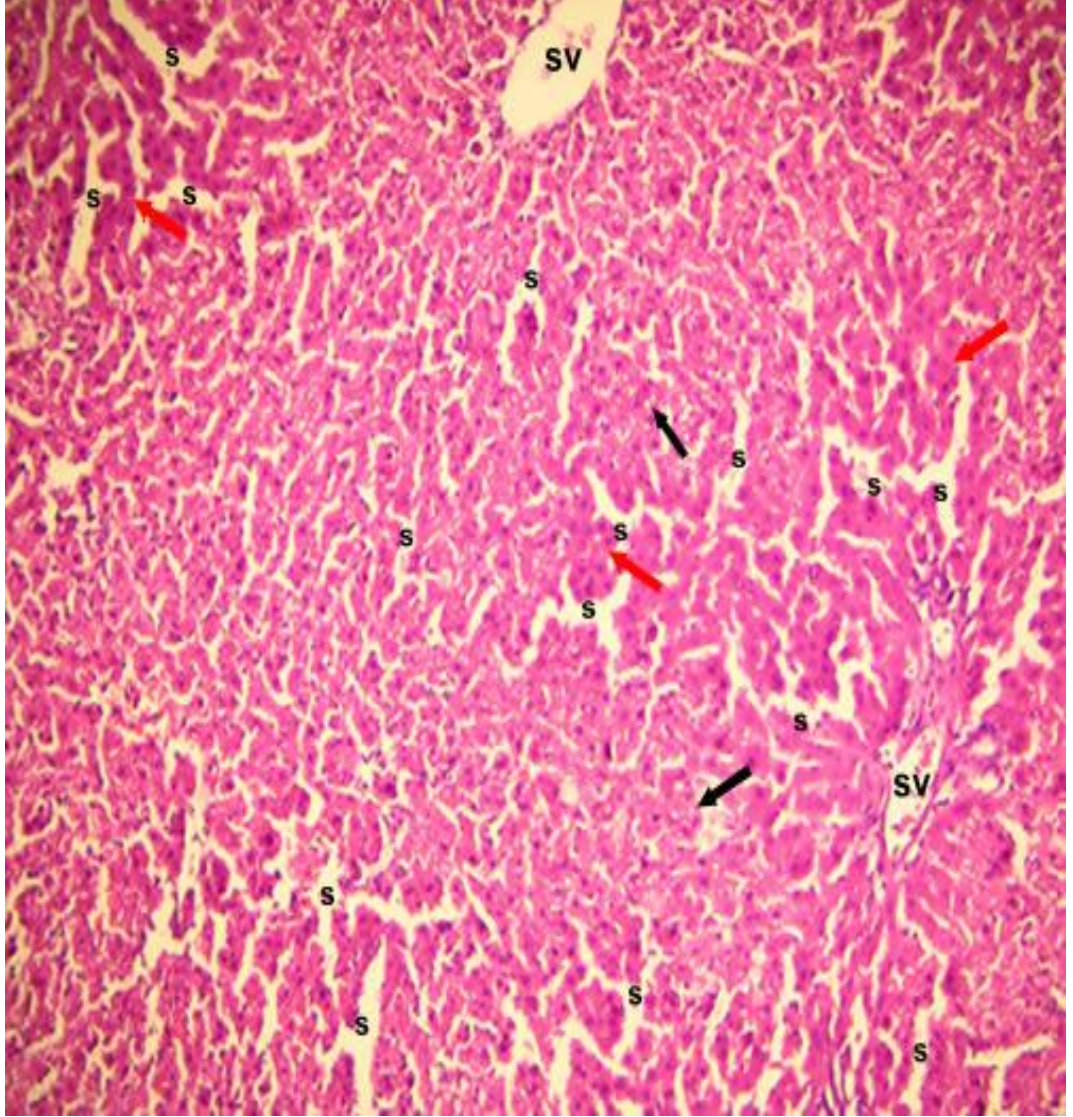
Ayrıca santral ven etrafında başlayıp lobülün periferine ve portal alanlara doğru ışınsal olarak uzanan kordonları oluşturan hepatositler arasında yer yer kopmalar ve sinusoidlerde dilatasyon görülmüştür (Şekil 3.10.).



**Şekil 3.10.** Bir ay boyunca sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi verilen ratlardan (Grup 3) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40X10) **B**: Balonlaşma dejenerasyonu **S**: Sinusoid

Santral ven etrafında başlayıp lobülün periferine ve portal alanlara doğru ışınsal olarak uzanan kordonları oluşturan hepatositler arasında yer yer kopmalar (oklar) ve balonlaşma dejenerasyonu (B) ile sinusoidlerde dilatasyon görülmüştür.

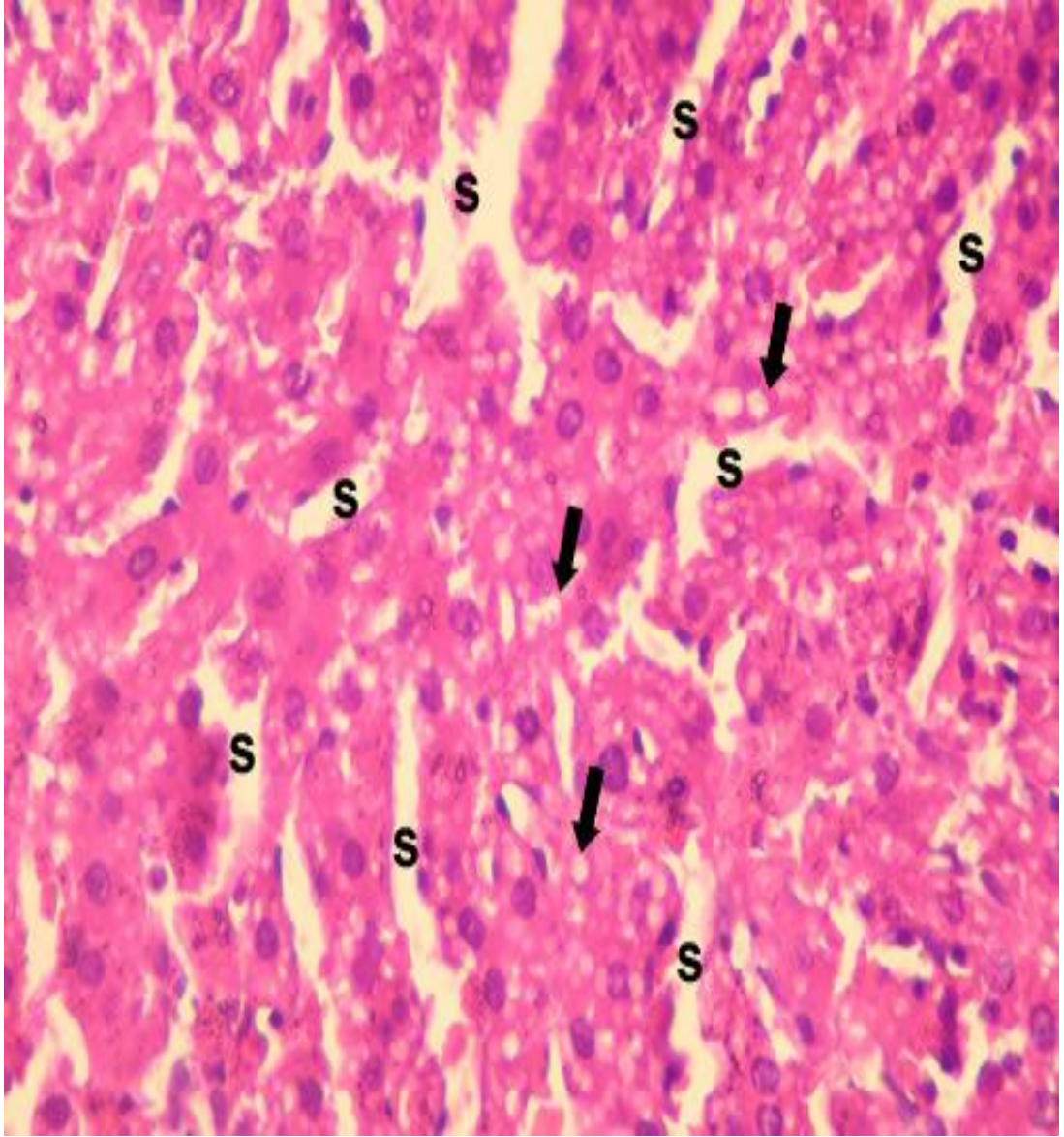
CCl<sub>4</sub> verilerek akut karaciğer hasarı oluşturulmadan önce bir ay boyunca antioksidan içeriği arttırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen Grup 4'deki ratlarda ise yine sinusoidlerde dilatasyon gözlenmiştir (Şekil 3.11.).



**Şekil 3.11.** Bir ay boyunca antioksidan içeriği arttırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen ratlardan (Grup 4) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (4 X10) S: Sinusoid SV: Sentral Ven

Santral ven etrafında başlayıp lobülün periferine ve portal alanlara doğru ışımsal olarak uzanan hepatosit kordonları ve sinusoidlerde dilatasyon görülmüştür. Parankimayı oluşturan kordonlarda çoğunlukla yağlanma dejenerasyonu gösteren hepatositler (siyah oklar) yer alırken normal görünümlü hepatositler (kırmızı oklar) de izlenmiştir.

Akut karaciğer hasarı oluşturulmadan önce bir ay süresince antioksidan içeriği arttırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen Grup 4'deki ratlardan elde edilen karaciğer doku örneklerinden hazırlanan preparatlar incelendiğinde daha çok mikrovasküler steatozis şeklinde bir hepatosit hasarının olduğu tespit edilmiştir. Balonlaşma dejenerasyonuna uğramış hepatositlere rastlanmamıştır (Şekil 3.12.).

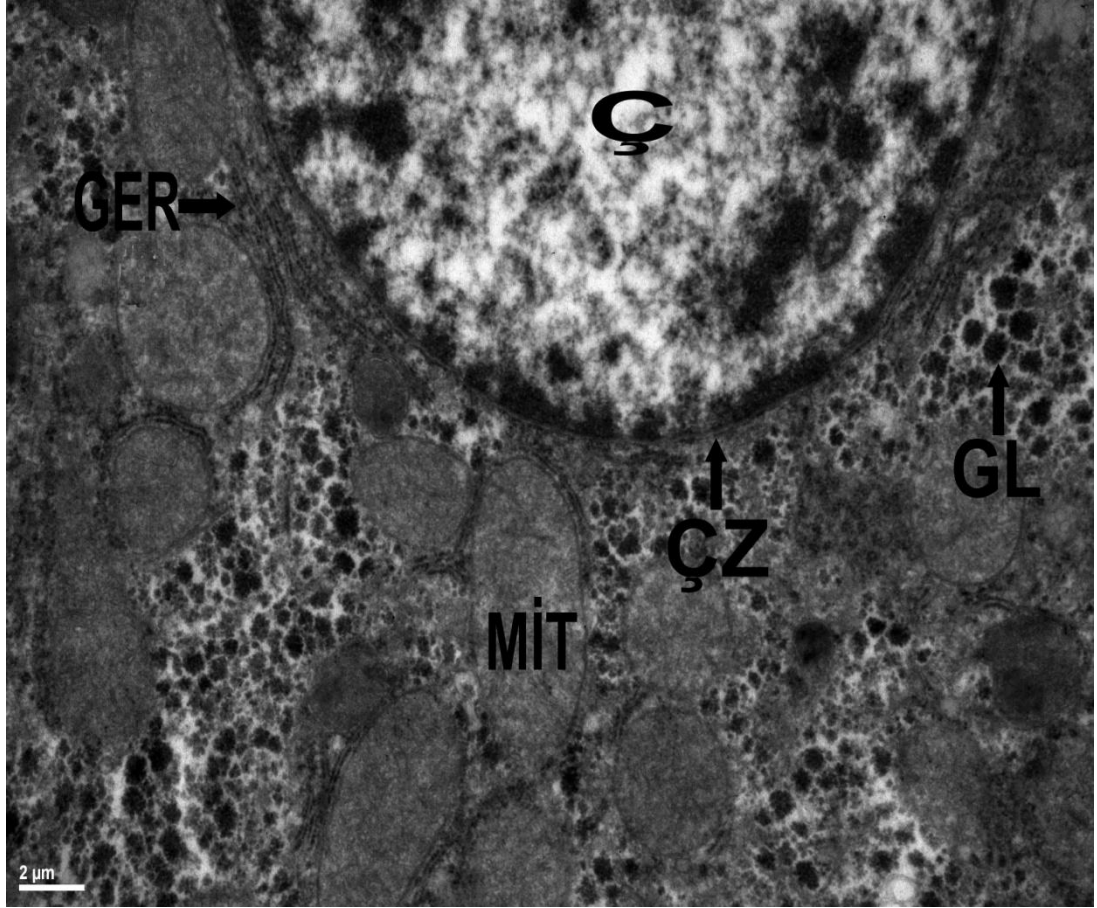


**Şekil 3.12.** Bir ay boyunca antioksidan içeriği arttırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen ratlardan (Grup 4) elde edilen karaciğerin ışık mikroskopik görünümü (40 X10) S: Sinusoid

Düzenli kordonlar oluşturan hepatositlerde mikrovasküler steatozis şeklinde (oklar) yağlanma dejenerasyonu gözlenmiştir.

### 3.9. Elektron Mikroskobu Bulguları

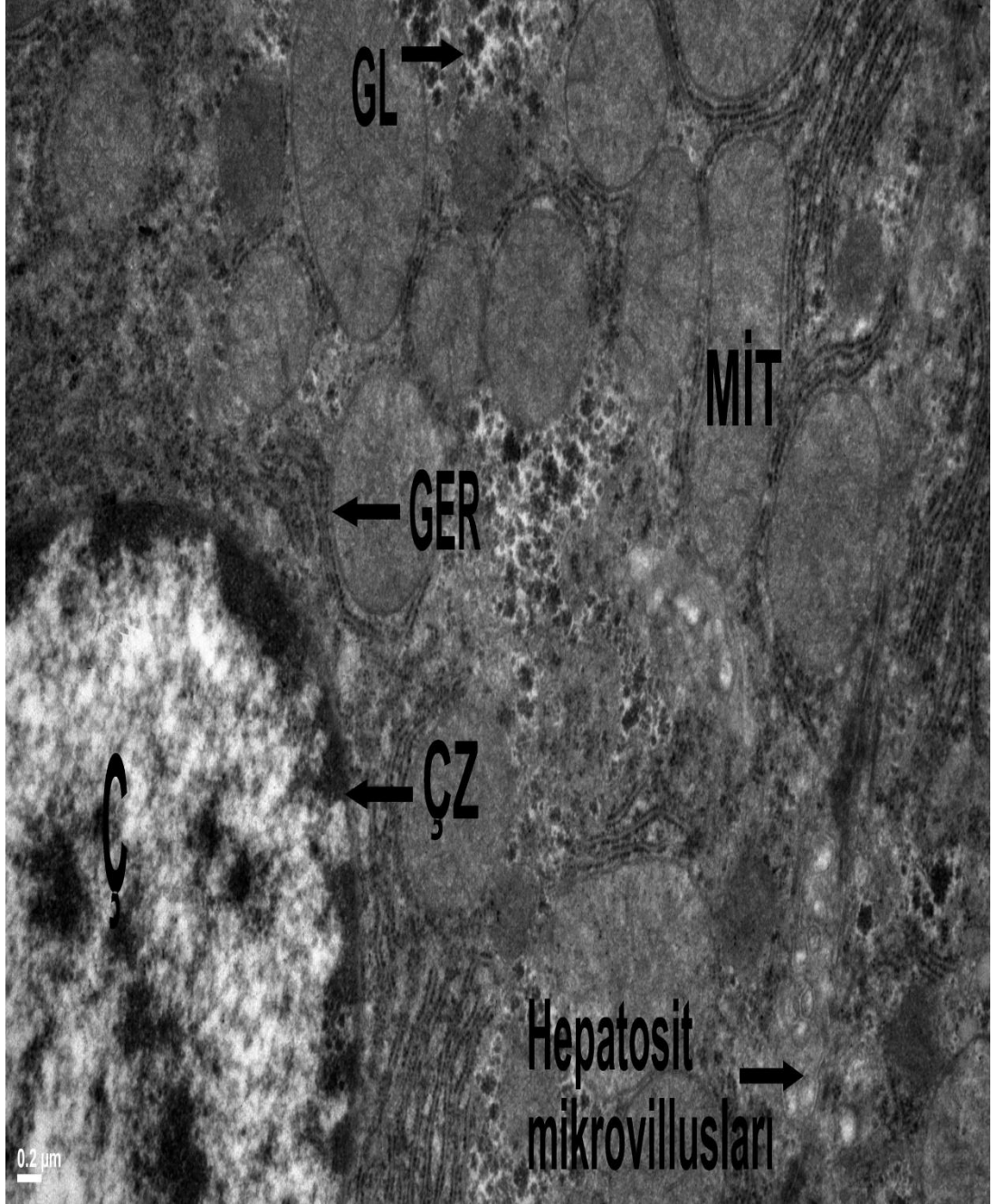
Negatif kontrol grubundaki (Grup 1) ratlara ait karaciğer örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesi sonucunda hepatositlerin poligonal şekilde, nükleuslarının ise yuvarlak ve düz yüzeyle olduğu ve belirgin bir ya da iki tane nükleolus içerdikleri görülmüştür. Hepatositlerin sitoplazmalarında ise bol miktarda mitokondrilere rastlanmıştır. Nükleusa yakın yerleşimli granüllü endoplazmik retikulumun (GER) ve glikojen granüllerinin normal bir dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Yüksek büyütmelerde yapılan incelemelerde ise nükleusun çift membran yapısının net, GER üzerindeki ribozomların yerleşimlerinin normal olduğu görülmüştür (Şekil 3.13.).



**Şekil 3.13.** Negatif kontrol grubundaki (Grup 1) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X15000) **GER:** Granüllü Endoplazmik Retikulum **GL:** Glikojen Granülleri **Ç:** Çekirdek **ÇZ:** Çekirdek Zarı **MİT:** Mitokondri

Hepatositlerin çekirdeklerinin yuvarlak ve düzgün olduğu, sitoplazmalarında ise bol miktarda mitokondrilerin yer aldığı izlenmiştir. Nükleusa yakın yerleşimli granüllü endoplazmik retikulumun (GER) ve glikojen granüllerinin dağılımının normal olduğu görülmüştür. Çift membran yapısındaki çekirdek zarının net, GER üzerindeki ribozomların yerleşimlerinin de normal olduğu tespit edilmiştir.

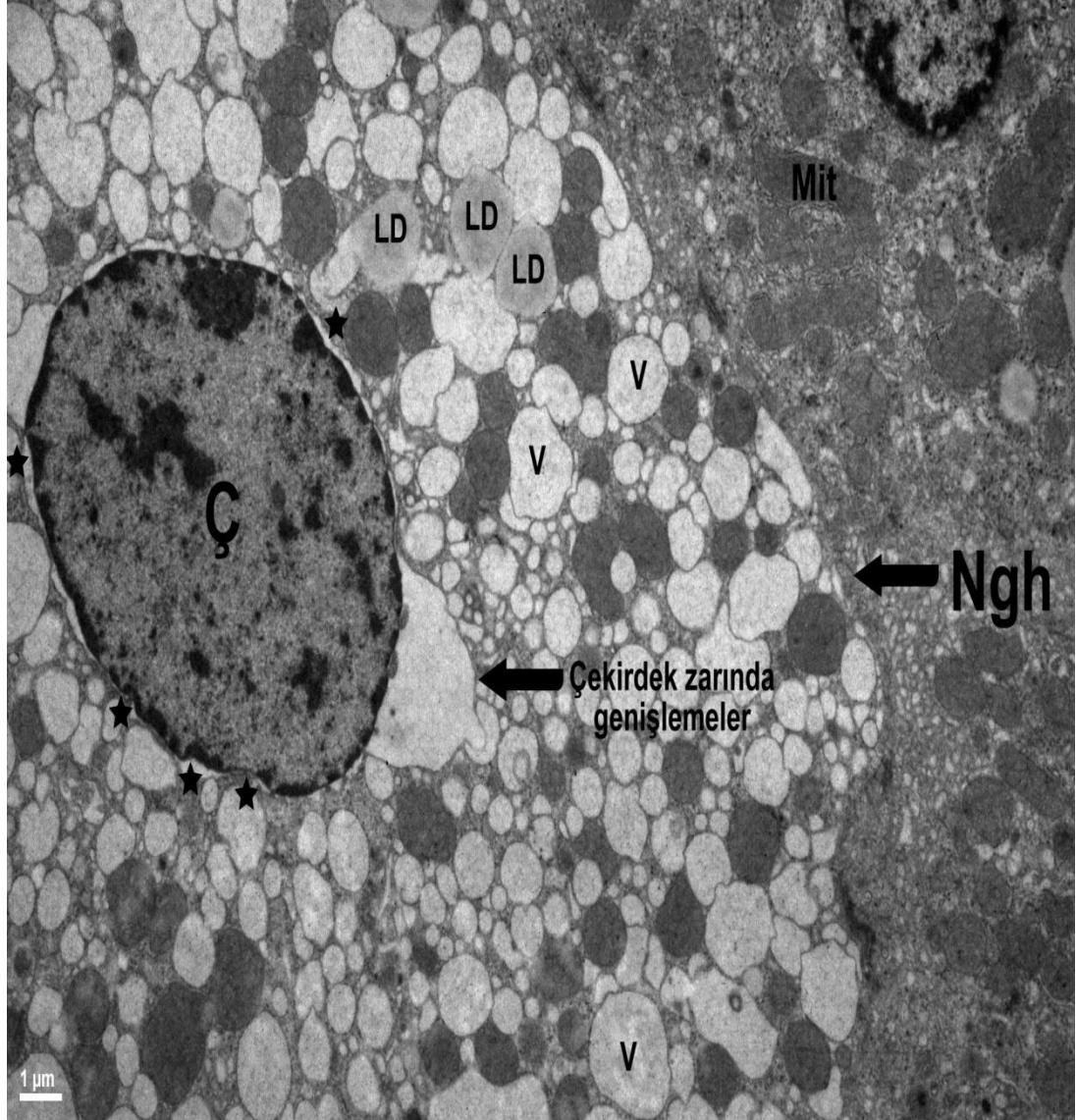
Hepatositlerin birbiriyle olan komşu yüzeylerinde ise hücre membran bütünlüğünün ve hücreler arası bağlantılar ile de normal karaciğer yapı bütünlüğünün korunduğu belirlenmiştir (Şekil 3.14.).



**Şekil 3.14.** Negatif kontrol grubundaki (Grup 1) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X25000) **GER:** Granüllü Endoplazmik Retikulum **GL:** Glikojen Granülleri **Ç:** Çekirdek **ÇZ:** Çekirdek Zarı **MİT:** Mitokondri

Hepatositlerin birbiriyle olan komşu yüzeylerinde hücre membran bütünlüğünün, mikrovillusların yapı bütünlüğünün korunduğu görülmektedir.

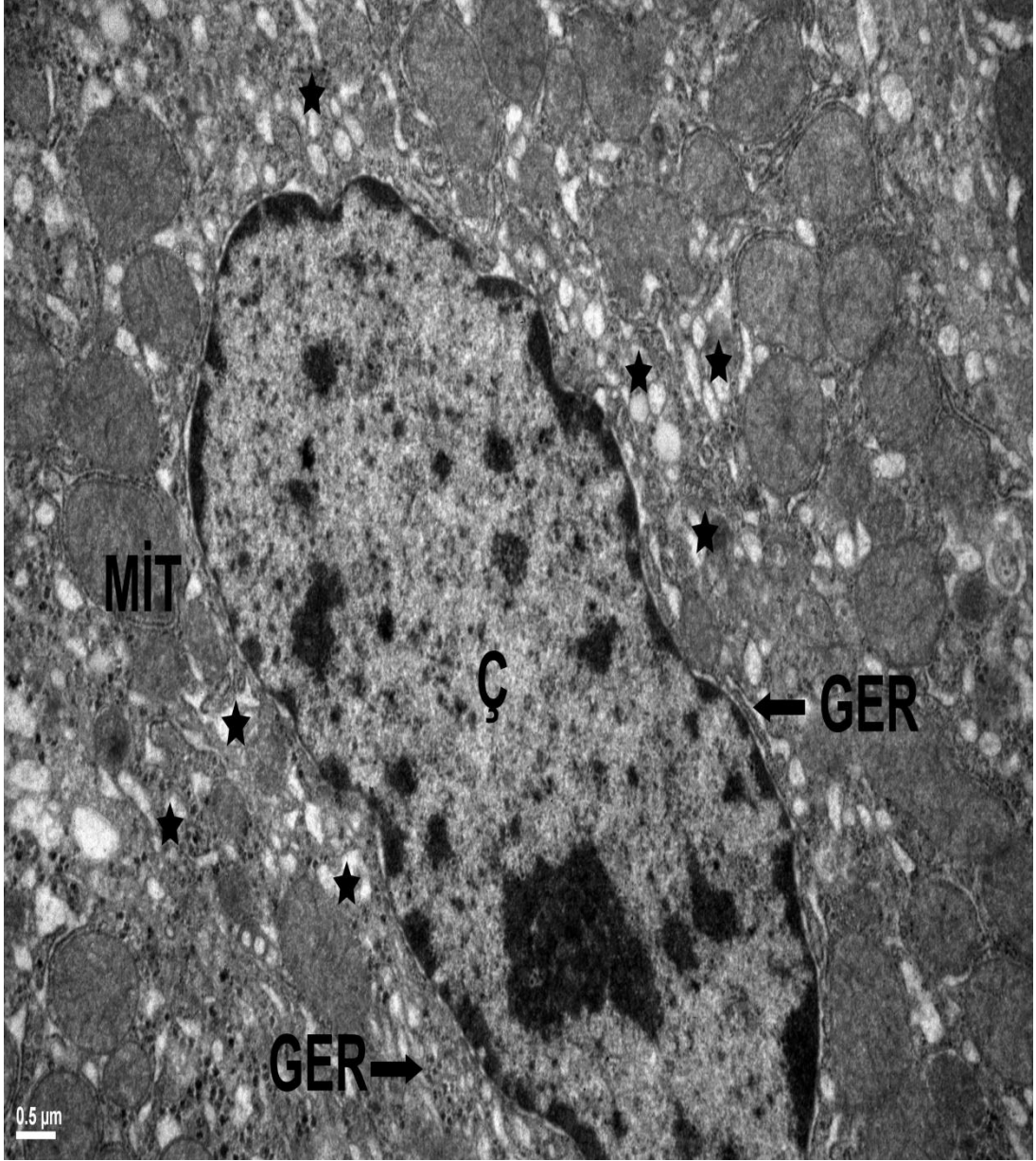
Sadece CCl<sub>4</sub> uygulanarak akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubundaki (Grup 2'deki) ratların karaciğerlerinden elde edilen elektron mikrograflarında göze çarpan ilk bulgu hepatosit sitoplazmalarındaki yoğun nekrotik alanların varlığı olmuştur. Nükleusun düzgün yüzeyini kaybettiği ve yer yer nükleus zarında genişlemelerin olduğu görülmüştür. Sitoplazmada çok sayıda vakuol ve lipit damlacıklarının mevcut olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.15.)



**Şekil 3.15.** CCl<sub>4</sub> ile akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubuna (Grup 2) ait ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X8000)  
Ç: Çekirdek LD: Lipit Damlaları V: Vakuol Mit: Mitokondri Ngh: Nekroza Giden Hücre

Çekirdeğin düzgün yüzeyli olmadığı, yer yer büzölmelerin (yıldızlar) ve çekirdek zarında genişlemelerin olduğu, sitoplazmada lipit damlacıkları ve çok sayıdaki vakuolün gözleendiği nekroza giden hücreler görülmüştür

Ayrıca çekirdekte kromatin kümeleşmeleri ve stoplazmik organellerden GER ve SER membranlarında aşırı genişlemeler dikkat çekmiştir. Sitoplazmada glikojen dağılımı azalmış ve düzensizleşmiştir (Şekil 3.16.).

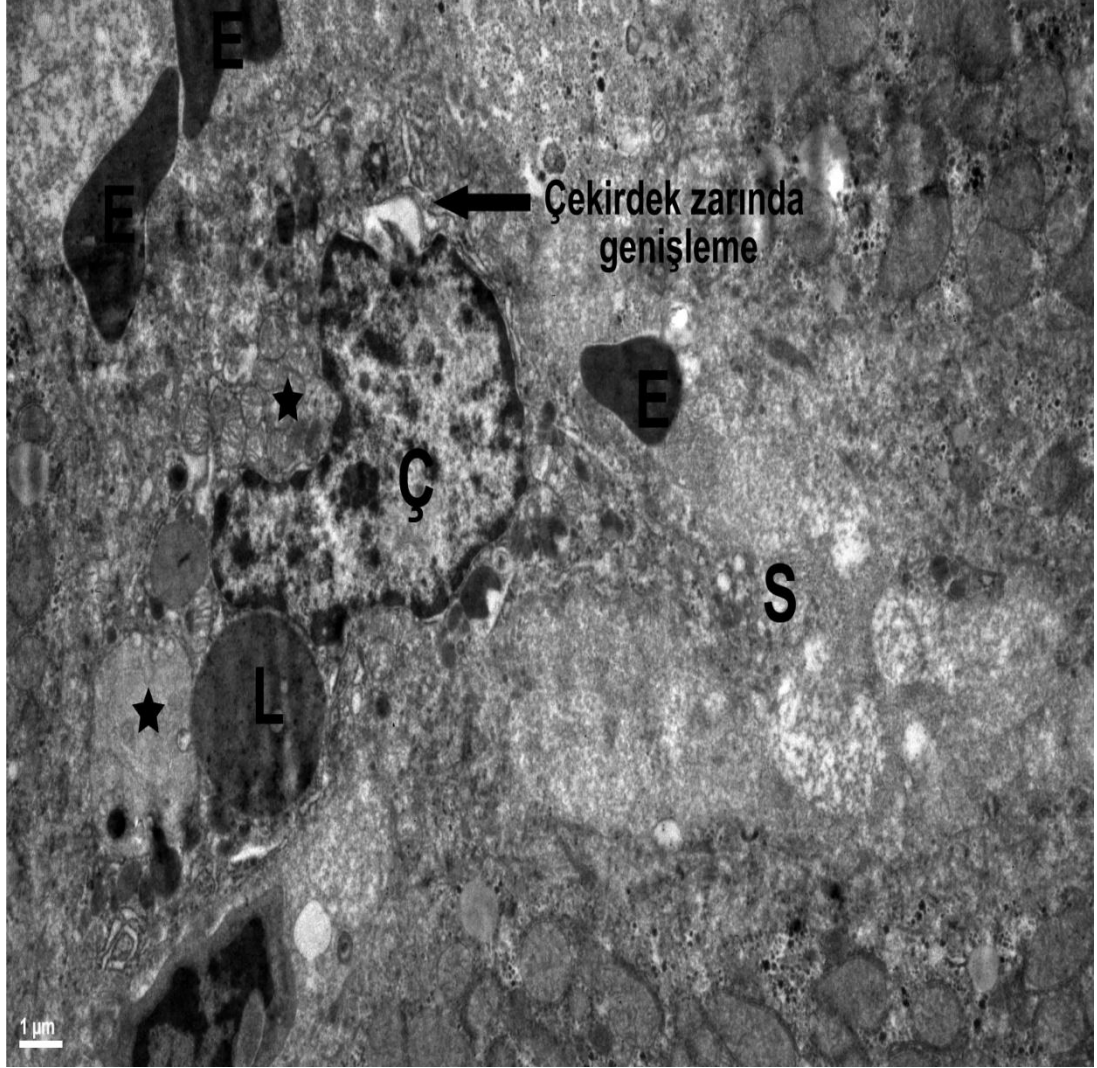


**Şekil 3.16.** CCl<sub>4</sub> ile akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubuna (Grup 2) ait ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X15000)  
**GER:** Granüllü Endoplazmik Retikulum **Ç:** Çekirdek **MİT:** Mitokondri

Endoplazmik retikulumların yapısını oluşturan lamellerin bozularak dilatasyon ve vakuolizasyon şeklinde dejenere bir görünüme sahip olduğu (yıldızlar), çekirdeğin düzgün yuvarlak görünümünü kaybederek yer yer büzölmelerin ve kromatin kümeleşmesinin olduğu görölmüştür.



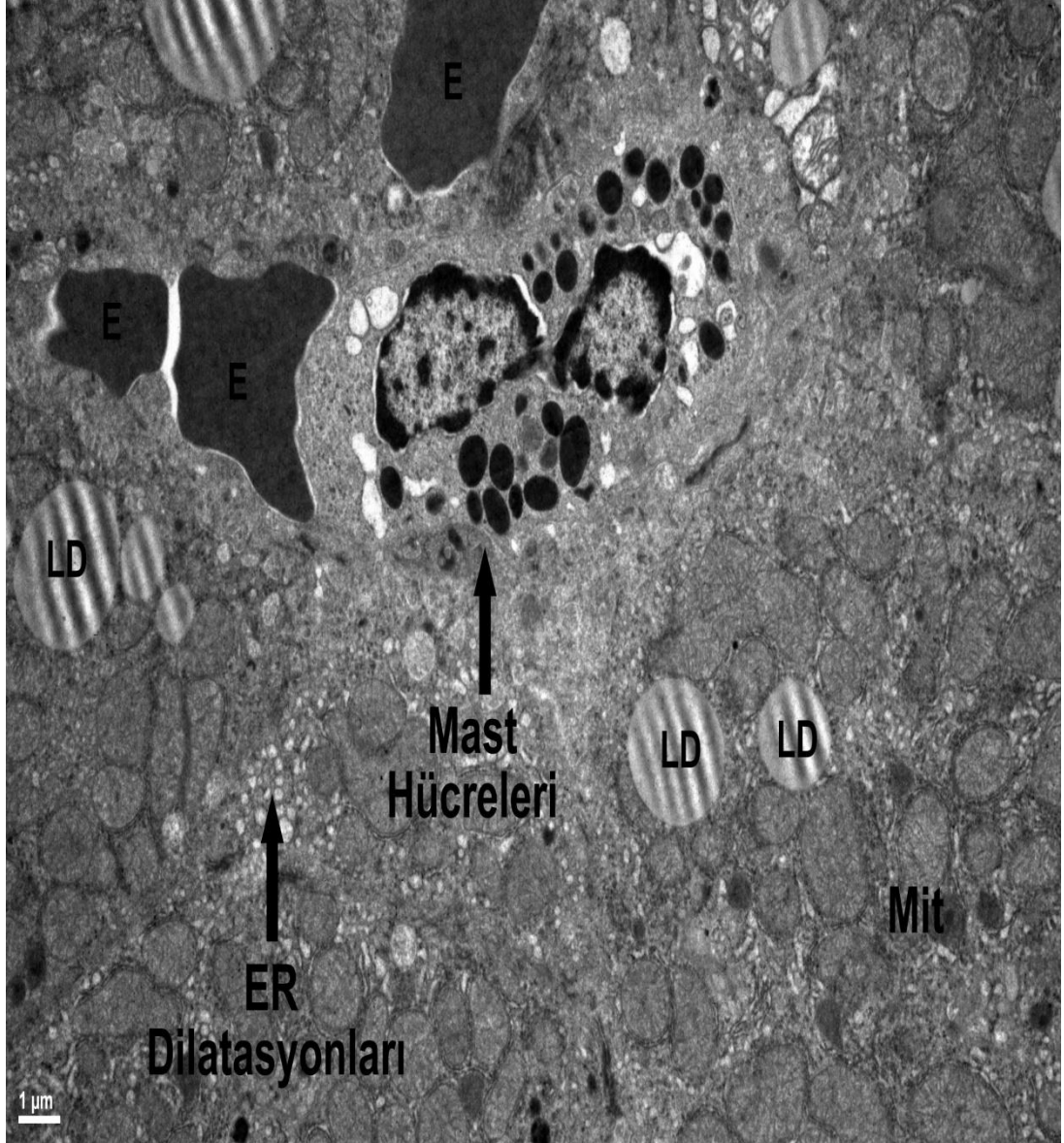
CCl<sub>4</sub> uygulanmadan önce bir ay süreyle sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi ile beslenen Grup 3'deki ratların karaciğerleri ultrayapısal düzeyde değerlendirildiğinde Grup 2'deki ratlara göre nekrotik alanlarda dikkat çekici düzeyde bir azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte, hücre çekirdek ve organellerinde yer yer litik bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 3.17).



**Şekil 3.17.** Bir ay boyunca, sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi verilmiş ratların (Grup 3) karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X8000) S: Sinusoid E: Eritrosit Ç: Çekirdek L: Lizozom

Pleomorfik görünümdeki çekirdekte düzensiz dağılıma sahip kromatinin yer yer kümelenmeler gösterdiği, çekirdeğin düzgün yuvarlak görünümünü kaybettiği ve çekirdek zarında genişlemelerin olduğu izlenmiştir. Sitoplazmadaki lizozom ve çevresindeki litik alanlar (yıldız) nekrotik bölgelerin varlığını göstermektedir.

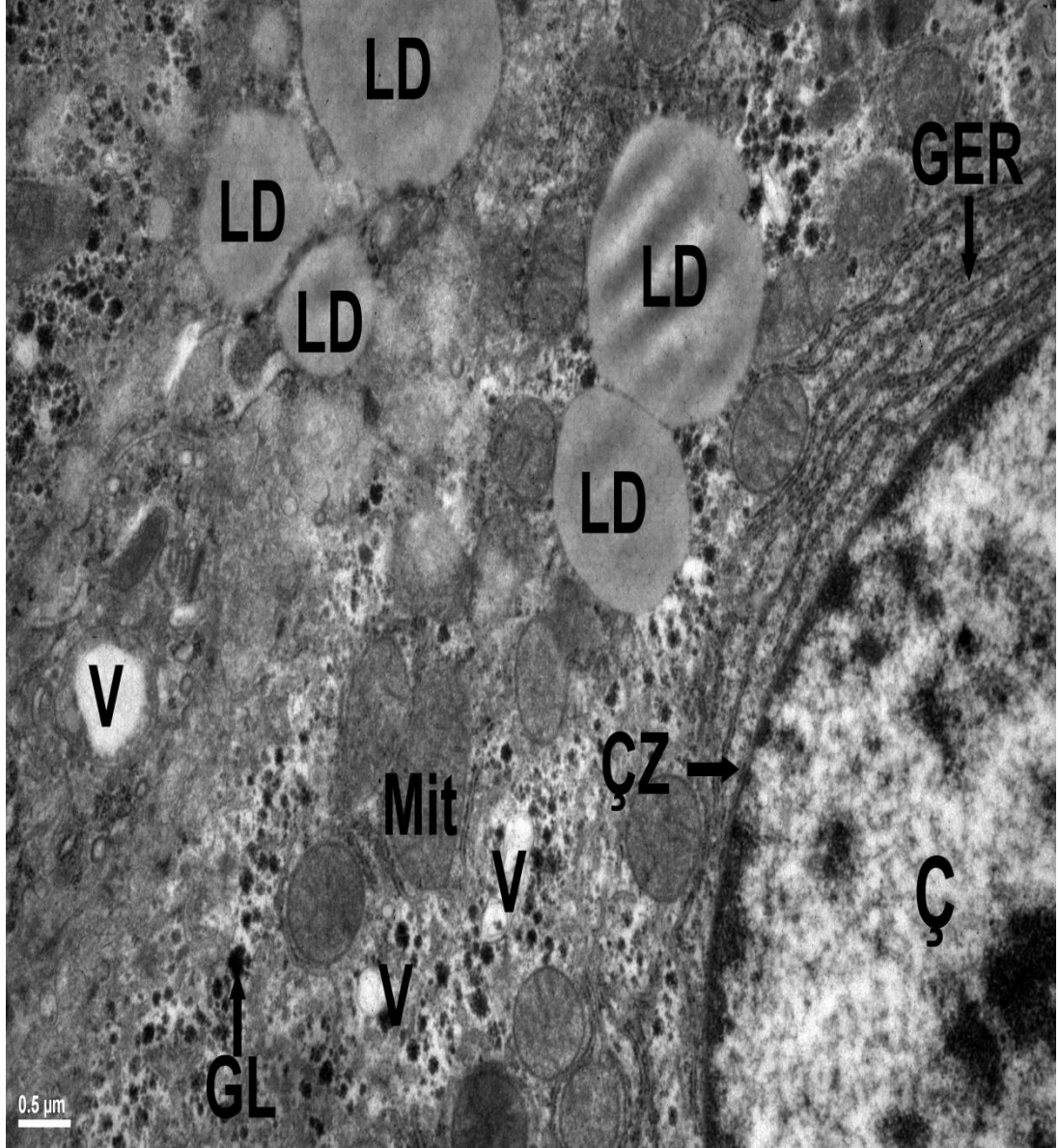
Bazı hücrelerin çekirdek zarında görülen dilatasyon ve vakuolizasyonun yanında GER ve SER membranlarında da genişlemelerin olduğu görülmüştür. Sitoplazmada düzenli bir glikojen dağılımının olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.18.).



**Şekil 3.18.** Bir ay boyunca, sabit ışık şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi verilmiş ratların (Grup 3) karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromigrograf (X8000) **LD**: Lipit Damlları **E**: Eritrosit **ER**: Endoplazmik Retikulum **Mit**: Mitokondri

Endoplazmik retikulumların dilatasyonları ve çok sayıdaki lipit damlacığı hepatositteki hasarı göstermektedir. Bu hasara karşı artan mast hücreleri görülmüştür.

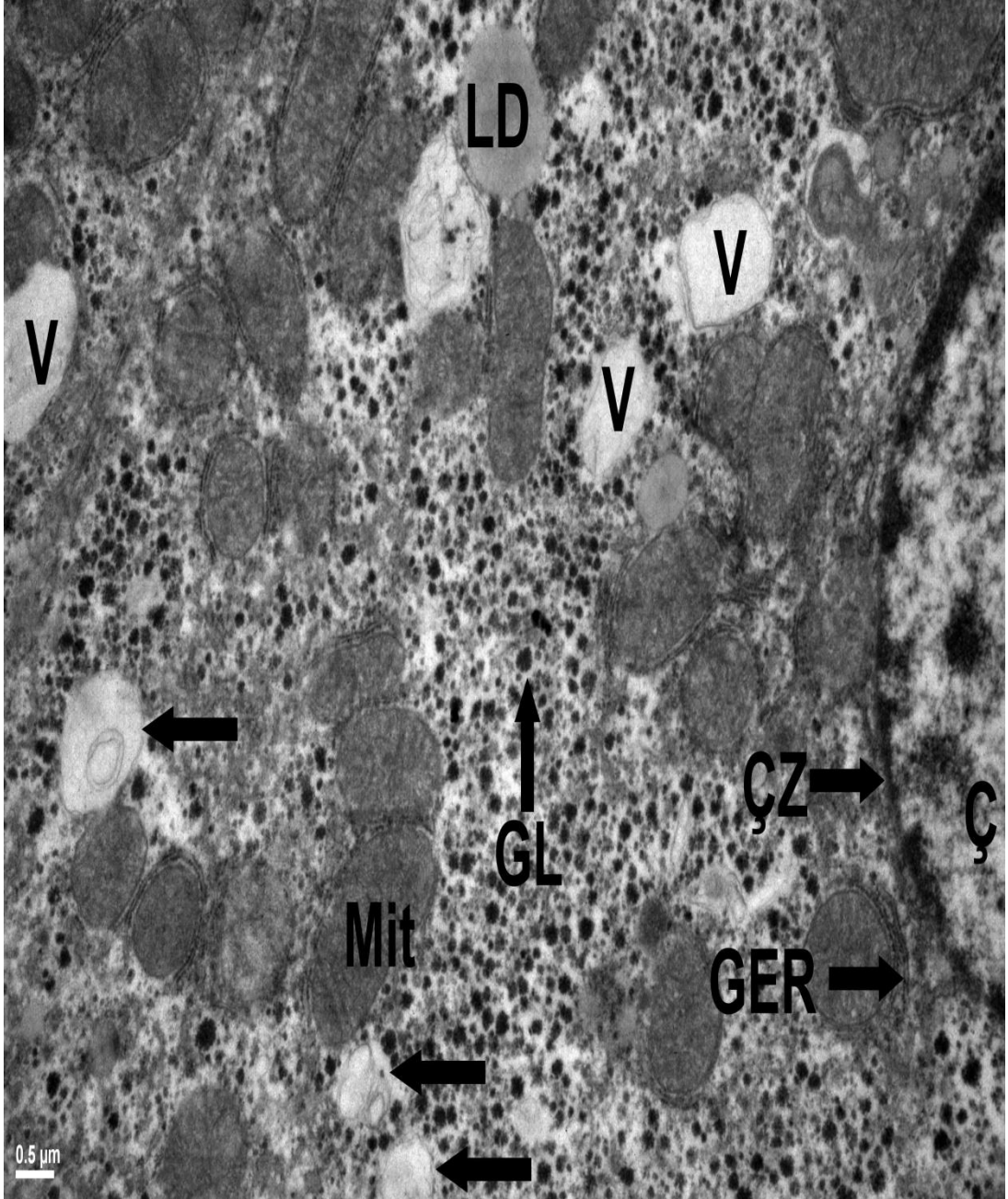
CCl<sub>4</sub> uygulanmadan önce bir ay süreyle antioksidan üretimi indüklenmiş *S. platensis* biyokütlesi ile beslenen Grup 4'deki ratlara ait elektron mikrografları incelendiğinde hücrelerin kontrol grubundaki hepatositlerle benzer özellikler gösterdikleri, hepatosit sitoplazma içeriğinin korunduğu görülmüştür (Şekil 3.19.).



**Şekil 3.19.** Bir ay boyunca, antioksidan içeriği artırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen (Grup 4) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X20000) **GER:** Granüllü Endoplazmik Retikulum **LD:** Lipit Damlları **V:** Vakuol **GL:** Glikojen Granülleri **Ç:** Çekirdek **ÇZ:** Çekirdek Zarı **Mit:** Mitokondri

Hepatositlerin çekirdeklerinin düzgün ve yuvarlak bir görünüme sahip olduğu, çekirdek zarının membran bütünlüğünü koruduğu ve sitoplazma içeriğinin korunduğu görülmüştür. Bununla birlikte, sitoplazmada vakuolar dejenerasyon ve lipit damlları gözlenmiştir.

Bununla birlikte, sitoplazmada vakuolar dejenerasyon, membranöz yapılar ve lipitlerin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.20.).



**Şekil 3.20.** Bir ay boyunca, antioksidan içeriği artırılmış *S. platensis* biyokütlesi verilen (Grup 4) ratların karaciğer örneklerinden hazırlanan elektromikrograf (X15000) **GL:** Glikojen Granülleri **Ç:** Çekirdek **ÇZ:** Çekirdek Zarı **LD:** Lipit Damlaları **V:** Vakuol **Mit:** Mitokondri **GER:** Granüllü Endoplazmik Retikulum

Hepatositlerin sitoplazma içeriğinin korunduğu, glikojen dağılımının homojen olduğu görülmekle beraber sitoplazmada çok sayıda lipit damlaları, vakuoller ve membranöz yapılar (oklar) görülmüştür.

Eksojen yollarla vücuda alınan toksik maddelerin organizmada metabolize edilmesi sonucu hücrede açığa çıkan serbest radikaller karaciğer nekrozuna sebep olabilir. CCl<sub>4</sub> serbest radikal üretimi ile hücresel hasar oluşturabilen, insan ve hayvanlarda hepatotoksisiteye neden olabilen bir ksenobiyotiktir (Weber vd., 2003).

CCl<sub>4</sub> biyoaktivasyonu serbest radikaller ile indüklenen kimyasal toksisiteye iyi bir model oluşturur. CCl<sub>4</sub> metabolizmasının ilk basamağı sitokrom p-450 enzim sistemi aracılığı ile CCl<sub>3</sub>•<sup>-</sup> (triklorometil) serbest radikalinin oluşmasıdır (Poli vd., 1990). Açığa çıkan CCl<sub>3</sub>•<sup>-</sup> mikrozomal lipitlere ve diğer hücresel makromoleküllere direkt olarak tutunur, membran yapısının bozulmasına, hücre enerji kaynaklarının azalmasına ve protein sentezinin baskılanmasına sebep olur (Mc Donald ve Gang, 2003; Wong vd., 2003; Jeon vd., 2003). Hücre membran yapısının bozulmasıyla oluşan hepatik hasarı selüler enzimlerin hızlıca kan dolaşımı içine salınımı, inflamasyon ve perisentral nekroz oluşumu izler (Wills ve Asha, 2006; Wang vd., 2008; Bhadauria vd., 2009; Liu vd., 2011; Eidi vd., 2011).

Bu çalışma kapsamında akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubundaki (Grup 2) ratların karaciğerlerinin ışık mikroskopunda histolojik değerlendirmeleri sonucunda sentral ven çevresinde tespit edilen lenfositik infiltrasyon bölgeleri ve perisentral nekroz alanları bu bilgilerle paralellik göstermiştir. Buna ek olarak hepatositlerdeki hidropik dejenerasyonun (stoplazmik vakuolizasyon) bir sonucu olarak balonlaşan hepatositler sentral ven çevresinde yoğun bir şekilde gözlenmiştir. Bu durum Grup 3'deki ratlarda bazı bölgelerde seyrek olarak görülürken Grup 4'deki ratlarda ise görülmemiştir. Hepatositlerin bu dejenerasyonu mitokondrilerdeki hasarın bir sonucu olarak hücre içi ATP üretiminin belirgin olarak azalmasına bağlanabilir. Çünkü böyle bir azalma durumunda stoplazmik serbest Ca<sup>+2</sup>,daki artışla beraber plazma membranının ATP enerjili sodyum pompasının aktivitesi azalır. Bunu sodyumun hücre içinde birikimi ve potasyumun hücre dışına geçişi izler. Sodyum eriyiğinin net artışı, suyun isoosmatik artışı ile birlikte olup akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükü daha da artar (Kumar vd., 1997).

Elektron mikroskopik değerlendirme sonucu Grup 4'deki ratların diğer gruplarla karşılaştırıldığında negatif kontrol grubundakine benzer şekilde mitokondrilere sahip

olduğu bulgusu bu açıklamayı destekler niteliktedir. Sitokrom p-450, Granülsüz Endoplazma Retikulumu (SER) içerisinde yer alan, yağ asitleri, kolestrol, steroid biyosentezi ve detoksifikasyonu için gereken hidroksilasyon mekanizmasını gerçekleştiren birçok enzimin yer aldığı bir elektron taşıma sistemidir. Sitokrom p-450 sistemi akciğer, böbrek ve bağırsak gibi organlara nazaran en çok karaciğerde bulunur. Sitokrom p-450 tarafından gerçekleştirilen hidroksilasyon mekanizması yabancı maddelerin ara metabolitler haline dönüştürülerek vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayan bir reaksiyondur (Kumar vd., 1997).

Bu alışma kapsamında CCl<sub>4</sub> ile akut karaciğer hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubundaki ratların ve CCl<sub>4</sub> uygulanmadan önce sabit ışık Şiddetinde kültüre edilmiş *S. platensis* biyokütlesi ile bir ay süreyle beslenen Grup 3'deki ratların karaciğerlerinden hazırlanan mikrograflarda yoğun bir Şekilde gözlenen SER dilatasyonları bu bilgiyi desteklemiştir. Antioksidan aktivitesi arttırılmış *S. platensis* biyokütlesi ile beslenen Grup 4'deki ratların karaciğer elektron mikrograflarında ise bu dilatasyonların ciddi oranda düzelmesi *in vitro*da arttığı gösterilen antioksidan özellikli karotenoid, fikosiyanın ve fenolik bileşiklerin *in vivo*da da serbest radikallere karşı etkinlik gösterdiğini ifade etmektedir.

Elektron mikroskopik inceleme sonucu elde edilen diğer bir bulgu da mikrovesiküler steatosis Şeklinde görülen hepatositlerdeki yağlanma dejenerasyonudur. Yağ dokusundan veya sindirimle alınan yiyeceklerden gelen serbest yağ asitleri normal olarak hepatositlere taşınır. Burada trigliseritlere esterleşir, kolestrol veya fosfolipitlere çevrilir ya da keton cisimlerine oksitlenir. Hepatositlerden trigliseritlerin çıkışı apoproteinlerle birleşip lipoproteinlerin oluşturulmasını gerektirir. CCl<sub>4</sub> ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmasına neden olarak apoproteinlerin sentezini azaltır. Bu durumun bir sonucu olarak da lipoprotein yapımını gerçekleştirmeyen hücrelerde lipit birikimi görülür (Kumar vd., 1997; Wang vd., 2008; Bhadauria vd., 2009; Eidi vd., 2011).

CCl<sub>4</sub> toksisitesinin hepatik mitokondrilerde önemli bir Ca<sup>+2</sup> konsantrasyon düşüklüğü, hepatik hücre elektrolit dağılımında bozukluk ve hücre glikojen molekül içeriğinde ciddi oranlarda düşüş meydana getirdiği kaydedilmiştir (Muriel vd., 2001; Krahenbuhl vd.,1991; Bhadauria vd., 2009; Chvez vd., 2010).

Bu çalışmada da CCl<sub>4</sub> verilen Grup 2 ve Grup 3'deki ratların karaciğer örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesi sonucu sitoplazmada glikojen granüllerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Birçok araştırmacı oksidatif strese dayalı karaciğer doku hasarının altında yatan hücrel mekanizmaları açıklamak ve bunların önüne geçebilmek için pek çok sitotoksikite modeli oluşturmuştur. Antioksidan tedavilerle de bu hasarı önlemeye ya da geri çevirmeye çalışmışlardır (Wong vd., 2003; Jeon vd., 2003; Lin ve Huang, 2000; Sheweita vd., 2003). ROT tarafından oluşturulan lipit peroksidasyonunun hücre membranlarının hasara uğramasına ve membranların yapısal bütünlüğünün ve biyokimyasal fonksiyonlarının değişmesine neden olduğu bilinmektedir (Kumar vd., 1997). Dolayısıyla ultrayapı düzeyinde meydana gelen bu hasara karşı önerilen antioksidanların koruyucu etkisi de yine ultra yapı düzeyinde yapılan incelemelerle desteklenmelidir. Bu çalışma ile *S. platensis* biyokütlesinin antioksidan aktivitesi organel düzeyinde yapılan ultrayapısal doku incelemesiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular *in vitro* deneylerle antioksidan aktivitesinin arttığı gösterilen *S. platensis* biyokütlesinin CCl<sub>4</sub> ile oluşturulmuş karaciğer hasarına karşı daha fazla koruyucu etkisinin olduğunu ortaya koymaktadır.

## BÖLÜM 4

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mikroalgler arasında *S. platensis* içerdiği birçok antioksidanın yanında, yüksek protein içeriği, yüksek büyüme oranı, toksin üretmemesi gibi özelliklerinden dolayı yaygın olarak endüstriyel ölçekte üretimi yapılabilen bir mikroalgdir.

“*S. platensis* kültüründe ışık şiddetinin inkübasyon sürecinin logaritmik fazında aniden artırılmasıyla yüksek ışık stresi oluşumuna bağlı olarak antioksidan özellikli biyoaktif moleküllerin sentezinin artacağı” hipotezinden yola çıkarak yürütülen bu çalışmada şu sonuçlar bulunmuştur;

1. Işık şiddetinin  $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'de sabit tutulduğu kontrol grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında, ışık şiddetinin aniden sırasıyla  $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'ye artırıldığı Grup 2 ve Grup 3'deki *S. platensis* kültür örneklerinde total karbonhidrat, karotenoid, fikosiyenin, malondialdehit ve fenolik madde içeriklerinde dikkate değer ölçüde artışlar ( $p<0,01$ ) tespit edilirken total protein ( $p<0,01$ ) ve klorofil miktarlarında ( $p<0,05$ ) ise ciddi azalmalar bulunmuştur.

Bu bulgular ışık şiddetinin aniden artırılmasının *S. platensis* kültüründe bir strese neden olduğunu ve bu stresten kurtulmak için fotokoruma mekanizmalarının devreye girdiğini göstermektedir.

2. Işık şiddetinin aniden artırılmasıyla ortaya çıkan oksidatif stresin bir sonucu olarak önemli sekonder metabolitler arasında yer alan fenolik bileşiklerin kontrol grubuna göre ışık şiddetinin en fazla artırıldığı Grup 3'deki kültürlerde yaklaşık 8 kat arttığı tespit edilmiştir.

Bitkilerde stres koşullarında sekonder metabolit olarak sentezlenen, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar etki gibi birçok önemli biyolojik aktiviteye sahip oldukları bilinen fenolik bileşikler bugün farmasötik biyoteknoloji kapsamında en çok ilgi çeken biyoaktif moleküllerin başında gelmektedir. Şimdiye kadar



*S. platensis*'in antioksidan aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar genellikle karotenoid, klorofil ve fikosiyanın üzerine odaklanmıştır. Bu çalışma bu yönüyle literatürdeki bu boşluğu doldurmaktadır.

Fenolik bileşiklerce zenginleştirilmiş biyokütle elde edilen bu iki basamaklı kesikli kültür yöntemi bu konudaki çalışmalara ışık tutacaktır. Buna ek olarak, herhangi bir kimyasal indükleyici olmadan ışık şiddetinin çevresel bir indükleyici olarak kullanıldığı bu kültürasyon modeli diğer mikroalg türleri için de örnek model olarak kullanılabilir. Bu sayede mikroalgal biyoteknoloji kapsamında normal koşullarda üretilmeyen önemli sekonder metabolitlerin üretilmesi ve bu metabolitlerin yapılacak *in vivo* deneylerle fizyolojik etkilerinin araştırılması sağlanabilir.

3. *S. platensis*'de MDA miktarındaki, total karbonhidrat, karotenoid miktarındaki artışlar ile total protein ve klorofil miktarlarındaki azalmalara neden olan fizyolojik koşullarda fenolik bileşiklerin sentezinin arttığı bulunmuştur.

*Spirulina*'da fenolik bileşiklerin oluşumuyla ilgili metabolik yollar henüz ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Fenolik madde miktarı ile total karbonhidrat miktarı, karotenoid miktarı, MDA miktarı arasında tespit edilen iyi derecedeki pozitif korelasyon ile total protein ve klorofil miktarları arasındaki negatif yöndeki korelasyon fenolik madde üretimiyle bu parametrelerin ilişkisine de ışık tutmaktadır.

4. Yapılan *in vitro* antioksidan aktivite testleri neticesinde fenolik madde miktarındaki bu artışa paralel olarak ışığın aniden arttırıldığı alg kültürlerinde ışık şiddetiyle orantılı olarak antioksidan aktivitenin de önemli oranda arttığı bulunmuştur.

*S. platensis* kültürlerinin fenolik madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, pozitif yönde yüksek Pearson korelasyon katsayıları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar fenolik maddelerin *S. platensis*'in antioksidan aktivitesine önemli oranda katkı sağlayan bileşenler olduğunu göstermektedir. Literatürde mikroalglerin antioksidan aktiviteleri ile fenolik madde içeriklerinin ilişkisi ile ilgili sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. Bu çalışma bu yönüyle de literatürdeki eksikliği gidermekte ve bu konudaki diğer çalışmalara da ışık tutmaktadır.

5. Toplam 168 saatlik inkubasyon periyodu değerlendirildiğinde en yüksek biyokütle konsantrasyonu, büyüme oranı ve produktivite değerlerinin Grup 3'deki kültür (ışık şiddetinin aniden  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'ye artırıldığı kültür grubu) örneklerinde tespit edildiği görülmüştür. Bu sonuç, bu çalışmada uygulanan iki basamaklı kesikli kültür üretimi yöntemiyle daha yüksek produktiviteye sahip *S. platensis* kültürlerinin elde edilebileceğini göstermektedir.

6. Elde edilen bulgular, *in vitro* deneylerle antioksidan aktivitesinin arttığı tespit edilen *S. platensis* biyokütlesinin *in vivo* da aynı etkiyi koruyarak  $\text{CCl}_4$  ile oluşturulmuş karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir.

Alkol ve diğer toksik maddelerin detoksifikasyon olayının meydana geldiği karaciğer, serbest radikal oluşumuna dolayısıyla da oksidatif stresin indüklediği hasara sıklıkla maruz kalır. Bugün klinikte başarılı sonuçlar veren birçok ilacın kullanımını hepatotoksisite oluşturduğu için sınırlıdır. Alkol metabolizmasının bir sonucu olarak alkolün indüklediği oksidatif stresin karaciğerde ciddi hasara yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca son yıllarda artan miktarda pestisitler, metal iyonları ve aflatoksinler gibi mikotoksinler ile kontamine olan besinlerin hem direk olarak hem de besin zinciri yoluyla dolaylı yoldan tüketilmesi özellikle karaciğerde ROT oluşumu yoluyla oksidatif strese neden olarak hasar oluşturmaktadır. Bu yüzden hepatotoksisiteye karşı yeni, güçlü ve doğal antioksidan kaynaklarının keşfi ve bunların farmasötik biyoteknoloji kapsamında kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır.

Bu kültür yöntemi ile elde edilen fikosiyanın, fenolik bileşikler ve karotenoidler bakımından daha zengin bir içeriğe sahip antioksidan aktivitesi artmış *S. platensis* biyokütlesi önemli farmasötikler için ham madde kaynağı olabilir. Bu kapsamda uygulanan bu iki aşamalı kültürasyon yöntemi, endüstriyel ölçekli, antioksidan üretimi indüklenmiş *S. platensis* biyokütle üretimi için bir model oluşturmaktadır. Bu çalışma sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidan kaynağı olarak *S. platensis* üretiminin önünü açarak ülkemizde de üniversitelerde küçük ölçekte üretimi yapılan bu mikroalgin üniversite-sanayi işbirliği ile büyük ölçekte üretiminin yapılması için bir örnek teşkil edebilir.

## BÖLÜM 5

### KAYNAKLAR

Abd El-Baky, H.H., El Baz, F.K., El-Baroty, G.S. (2009). Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *African Journal of Biotechnology*, **8**, 7059-7067

Akao, Y., Ebihara, T., Masuda, H., Saeki, Y., Akazawa, T., Hazeki, K., Hazeki, O., Matsumoto, M., Seya, T. (2009). Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered *Spirulina* extract in mice. *Cancer Science*, **100**, 1494-1501

Akkuş, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Konya: Mimoza yayınları, 13-19

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 601- 639

Aslan, D. (2005). *Klinik Kimyada Temel İnkeler*. (Burtis C.A.,Edward, A.R.), Beşinci Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 748-760

Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T.W., Ruprecht, R.M. (1998). Inhibition of HIV-1 Replication by an Aqueous Extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, **18**, 7-12

Bandyopadhyay, U., Dipak D., Ranajit, K. (1999). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, **77**, 658-666

Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S. (2001). Pesticide Induced Oxidative Stress: Perspective and Trends. *Reviews on Environmental Health*, **16**, 1-40

Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Psychology*, **5**, 235-240

Bennett, A., Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga. *Journal of Cell Biology*, **58**, 419-435

Bhadauria, M., Nirala, S.K., Shrivastava, S., Sharma, A., Johri, S., Chandan, B.K., Singh, B., Saxena, A.K., Shukla, S. (2009). Emodin reverses CCl4 induced hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymatic and ultrastructural changes: The *in vivo* evidence. *Hepatology*, **39**, 290-300

Bennett, A., Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga. *Journal of Cell Biology*, **58**, 419-435

Bhadoria, M., Nirala, S.K., Shrivastava, S., Sharma, A., Johri, S., Chandan, B.K., Singh, B., Saxena, A.K., Shukla, S. (2009). Emodin reverses CCl<sub>4</sub> induced hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymatic and ultrastructural changes: The *in vivo* evidence. *Hepatology*, **39**, 290-300

Bhandari, R., Sharma, P.K (2006). High-light–induced Changes on Photosynthesis, Pigments, Sugars, Lipids and Antioxidant Enzymes in Freshwater (*Nostoc spongiaeforme*) and Marine (*Phormidium corium*) Cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, **82**, 702-710

Bhat, V.B., Madyastha, K.M. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **13**, 262-266

Blé-Castillo, J.L., Rodriguez-Hernandez, A., Miranda, Z.R., Juarez-Oropeza, M.A., Diaz-Zagoza, J.C. (2002). *Arthrospira maxima* prevents the acute fatty liver induced by the administration of simvastatin, ethanol and a hypercholesterolemic diet to mice. *Life Sciences*, **70**, 2665-2673

Bohne, F., Linden, H. (2002). Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1579**, 26-34

Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, **108**, 111-117

Boyunağa H., Çelik C.(1996). Serbest Radikaller ve Hücresel Denge. *Bilim Teknik Dergisi*, **347**, 98-100

Bozcuk, S. (1999). *Bitki Fizyolojisi*. Ankara :Hatiboğlu Basım Yayın

Chávez, E., Segovia, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., Vergara, P., Sánchez, L.C., Salazar, E.P., Mario, G., Moreno, M.G., Muriel, P. (2010). Antifibrotic and fibrolytic properties of celecoxib in liver damage induced by carbon tetrachloride in the rat. *Liver International*, **30**, 969-978

Chen, L.L., Zhang, S.F., Huang, D.N., Tan, J.Q., He, S.H. (2005) .Experimental study of *Spirulina platensis* in treating allergic rhinitis in rats. *Journal of Central South University*, **30(1)**, 96-98

Choudhary, M., Jetley, U.K., Khan, M.A., Zutshi, S., Fatma, T. (2007). Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **66**, 204-209

Clément, G., Giddey, C., Menzi, R. (2006). Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **18**, 497-501

Cohen, Z., (1997). The Chemicals From *Spirulina*. In: *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology, and Biotechnology*, Vonshak, A., Ed., London: Taylor and Francis, 175-204

Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C., Costa, J.A.V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, **98**, 1489-1493

Dalle, D.I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases [Review]. *Trends in Molecular Medicine*, **9**, 169-176

Danesi, E., Yagui, R., Sato, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, **26**, 329-335

Dasgupta, T., Banerjee, S., Yadav, P.K., Rao, A.R. (2001). Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **226**, 27-38

Dat J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*. **57**, 779-795

Davies, M.J. (2005). The oxidative environment and protein damage [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1703**, 93-109

De Philippis, R., Vicenzini, M. (1998) .Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**, 151-175

Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation [Review]. *Biochemistry Journal*, **324**, 1-18

Del Campo, J.A., García-González, M., Guerrero, M.G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**, 1163-1174

Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae. Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, **76**, 51-59

Dernmig-Adams, B., Adams, W.W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology*, **43**, 599-626

- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*, **18**, 655-673
- Dillard, C.J., German, J.B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1744–1756
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological of the cell function. *Physiological Reviews*, **82**, 47-95
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, K. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356
- Duval, B., Shetty, K., Thomas, W.H. (2000). Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology*, **11**, 559-566
- Eidi, A., Eidi, M., Al-Ebrahim, M., Rohani, A.H., Mortazavi, P. (2011). Protective effects of sodium molybdate on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **25**, 67-71
- Eonseon, J., Polle, J., Lee, H., Hyun, S., Chang, M. (2003). Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**, 165-174
- Estrada, J.E.P, Bescos, P.B., Fresno, A.M.V. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. II *Farmaco*, **56**, 497-500
- Evans, R.C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**, 152-159
- Ferreira-Hermosillo, A., Torres-Duran, P.V., Juarez-Oropeza, M.A. (2010). Hepatoprotective effects of *Spirulina maxima* in patients with non alcoholic fatty liver disease: acase series. *Journal of Medical Case Reports*, **103**, 1-5
- Finkel, T., Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*, **208**, 239-248
- Forlani, G., Prearo, V., Wiczorek, D., Kafarski, P., Lipok, J. (2010). Phosphonate degradation by *Spirulina* strains: cyanobacterial biofilters for the removal of anticorrosive polyphosphonates from wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, **48**, 299-305
- Foti, M., Piatelli, M., Amico, V., Ruberto, G. (1994). Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **26**, 159-164
- Fox, D. R. (1996) .*Spirulina* Production and Potential, Edisud Press, 16
- Fresnedo, O., Serra, J.L., (1992). Efect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology*, **28**, 786-793

- Garbayo, I., Cuaresma, M., Vilchez, C., Vega, J. (2008). Effect of abiotic stress on the production of lutein and  $\beta$ -carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochemistry*, **43**, 1158-1161
- Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inze, D., Camp, V., Toneva V., Minkov, I. (2003). Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology*, **160**, 509-515
- Gershwin, M.E., Belay, A. (2008) *Spirulina* in Human Nutrition and Health. CRC press. New York: Taylor and Francis Group, 101-119
- Gonzalez, R., Rodriguez S., Romay C., Gonzalez, A., Armesto, J., Ramirez, D., Merino, M. (1999). Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological Research*, **39**, 55-59
- González de Rivera, C., Miranda-Zamora, R., Díaz-Zagoya, J.R., Juárez Oropeza, M.A. (1993). Preventive effect of *Spirulina maxima* on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat, a preliminary report, *Life Sciences*, **53**, 57-61
- Grace, S.C., Logan, B.A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions Royal Society London B*, **355**, 1499-1510
- Graßmann, J. (2005). Terpenoids as Plant Antioxidants. *Vitamins and Hormones*, **72**, 505-535
- Grune, T. (2005). *Oxidants and Antioxidant Defence Systems*. Düsseldorf: Springer Science and Business, 2-16
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (1996). *Tıbbi Fizyoloji*. (Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.Ç.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 797-800
- Güler, F., Gülmez, B. (2008). *Spirulina sp.* ve kullanım alanları üzerine bir araştırma. Kemaliye 5. Geleneksel Su Ürünleri Bilimsel ve Kültürel Platformu
- Gürdol, F., Ademoğlu, E. (2006). *Biyokimya*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri. 1. baskı, 817-827
- Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R. (2008). A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. No. 1034. Rome, FAO. (Food and Agriculture Organization Of The United Nations)
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M., Mohammad, N., Soltani, N., Oveisi, M., Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, **22**, 43-50
- Halliwell, B. (2001). Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. *Drugs and Aging*, **18**, 685-716

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Pres. Oxford, 86-123

Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, **48**, 422-427

Hayashi, O., Hirahashi, T., Katoh, T. (1998). Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **44**, 841-851

Herrero, M., Ibanez, E., Señoráns, J., Cifuentes, A. (2004). Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga: Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, **27**, 195-203

Herrmann, K.M., Weaver, L.M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, **50**, 473-503

Hihara, A., Kamei, M.K., Aaron, K., Masahiko, I. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell*, **13**, 793-806

Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobillin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, **12**, 435-439

Hirschberg, J., Cohen, M., Harker, M., Lotan, T., Mann, V., Pecker, I. (1997). Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure and Applied Chemistry*, **69**, 2151-2158

Hodges, D.M., Delong, J.M., Forney, C.F., Frange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, **207**, 604-611

Hu, Q., Westerhoff, P., Vermaas, W. (2000). Removal of nitrate from groundwater by cyanobacteria: quantitative assessment of factors influencing nitrate uptake. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 133-139

Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., Tatematsu, M. (1986). Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, **24**, 1071-1082

Iwata, K., Inayama, T., Kato, T., (1990). Effects of *Spirulina* on plasma lipoprotein lipase activity in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **36**, 165-171

Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, **73**, 285-290



- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, **53**, 26-36
- Jeon, T., Hwang, S.G., Park, N.G., Jung, Y.R., Shin, S.I., Choi, S.D., Park, D.K. (2003). Antioxidative effects of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*, **187**, 67-73
- Jeyaprakash, K., Chinnaswamy, P. (2005). Effect of *Spirulina* and Liv-52 on cadmium induced toxicity in albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, **43(9)**, 773-781
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2003). Basic Histology, 10th Ed. USA: Lange, 332-344
- Kaçar, B., Katkat, A.V., Öztürk, Ş. (2006). Bitki Fizyolojisi. Ankara: Nobel Yayınları, 527-528
- Karadeniz, A., Cemek, M., Şimşek, N. (2009). The effects of Panax ginseng and *Spirulina platensis* on hepatotoxicity induced by cadmium in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 231-235
- Kato, T., Takemoto, K. (1984). Effects of *Spirulina* on hypercholesterolemia and fatty liver in rats. *Saitama Medical College, Japan. Nutritional Foods Journal*, **37**, 321-325
- Khan, Z., Bhadouria, P., Bisen, P. (2005). Nutritional and Therapeutic Potential of *Spirulina*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **6**, 373-379
- Kierszenbaum, A.L. (2003). Histology and Cell Biology, 1st Ed. Mosby, U.S.A.
- Kim, H.M., Lee, E.H., Cho, H.H., Moon, Y.H. (1998). Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Spirulina*. *Biochemical Pharmacology*, **55**, 1071-1076
- Klejduš, B.J., Kopecký, L., Benešová, J.V. (2009). Solid-phase/supercritical fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 763-771
- Kobayashi, M. (2000). *In vivo* antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**, 550-555
- Konopka, A., Schnur, M., (1980). Effects of light intensity on macromolecular synthesis in cyanobacteria. *Microbiol Ecology*, **6**, 291-301
- Krahenbuhl, S., Weber, J.R., Brass, E.P. (1991). Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology*, **14**, 1189-1195

- Kronik, M., Grossman, P. (1983). Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clinical Chemistry*, **29**, 1582-1586
- Kukreja, R.C., Hess, M.L. (1992). The oxygen free-radical system—From equations through membrane–protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovascular Researchs*, **26**, 641-655
- Kumar, M., Sharma, M.K., Kumar, A. (2005). *Spirulina fusiformis*: a food supplement against mercury induced hepatic toxicity. *Journal of Health Science*, **51(4)**, 421-430
- Kumar, W., Cotran, R.S, Robbins, S.L. (1997). Basic Pathology. Philadelphia: W.B.Saunders
- Laisk, A., Edwards, G.E., (1998). Oxygen and Electron Flow in C<sub>4</sub> Photosynthesis: Mehler Reaction, Photorespiration and CO<sub>2</sub> Concentration in The Bundle Sheath. *Planta*, **205**, 632-645
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 251-275
- Lauro, I.C., Dubacq, J.P., Thomas, J.C. (1986). The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of Cyanobacteria. *Plant Physiology*, **83**, 838-843
- Lee, W.M. (2003). Drug Induced Hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine*, **349**, 474-485
- Leema, J.T.M., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N.V., Dheenan, P.S., Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, **101**, 9221-9227
- Lers, A., Biene, Y., Zamir, A. (1990). Photoinduction of massive  $\beta$ -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, **93**, 389-395
- Li, H., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**, 771-776
- Lin, C.C., Huang, P.C. (2000). Antioxidant and Hepatoprotective effects of *Acanthopanax senticosus*. *Phytotherapy Research*, **14**, 489-494
- Liu, Q., Kong, B., Li, G., Liu, N., Xia, X. (2011). Hepatoprotective and antioxidant effects of porcine plasma protein hydrolysates on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 1316-1321
- Long, S., Humphries, S., Falkowski, P. G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **45**, 633-662

- Ma, J.K., Chikwamba, R., Sparrow, P., Fischer, R., Mahoney, R., Twyman, R.M. (2005). Plant-derived pharmaceuticals – the road forward. *Trends in Plant Science*, **10**, 580-585
- Ma, R.Y.N., Chen, F. (2001). Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum sp.* *Process Biochemistry*, **36**, 1175-1179
- Malanga G., Puntarulo, S. (2006). Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*, **94**, 672-679
- Manoj, G., Venkataraman, L.V., Srinivas, L. (1992). Antioxidant properties of *Spirulina (Spirulina platensis)*. In: Seshadri and Bai. *Spirulina*. MCRC. 48-154
- Mao, T.K., Water, V., Gershwin, M.E. (2005). Effect of a *Spirulina*-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. *Journal of Medicinal Food*, **8(1)**, 27-30
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, **192**, 1-15
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Jose, A., Teixeira, J.A. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*, **29**, 365-373
- Mathew, B., Sankaranarayanan, R., Nair, P.P., Varghese, C., Somanathan, T., Amma, B.P., Amma, N.S., Nair, M.K. (1995). Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutritional Cancer*, **24**, 197-202
- Mc Donald, W.L.K., Garg, M.L. (2003). Vitamin E supplementation in the mitigation of carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **14**, 211-218
- Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M., Filho, J.M. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **31**, 1075-1079
- Mittler, R. (2002). Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405-410
- Moffitt, M.C., Louie, G.V., Bowman, M.E., Pence, J., Noel, J.P., Moore, B.S. (2007). Discovery of two Cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: Kinetic and structural characterization. *Biochemistry*, **46**, 1004-1012
- Muriel, P., Alba, N., Perez-Alvarez, V.M., Shibayama, M., Tsutsumi, V.K. (2001). Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **130**, 219-226

- Müller, P., Li, X.R., Niyogi, K.K. (2001). Non-photochemical quenching: A response to excess light energy. *Plant Physiology*, **125**, 1558-1566
- Nadkarni, G.D., Souza, N.B. (1988). Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **40**, 42-45
- Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., Yamamoto, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy*, **37**, 16-28
- Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagenics in food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **29**, 273-300
- Nayaka, N., Homa, Y., Goto, Y. (1988). Cholesterol lowering effect of *spirulina*. *Nutrition Reports International*, **37**, 1329-1337
- Nikookar, K., Moradshahi, A., Hosseini, L. (2005). Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomolecular Engineering*, **22**, 141-146
- Noctor, G., Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 249-279
- Olguin, E., Galicia, S., Guerrero, O., Hernandez, E. (2001). The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*, **77**, 19-24
- Olinescu, R., Smith, L.T. (2002). *Free Radicals in Medicine*. Newyork: Nova Publisher , 1-31
- Onofrejova, L., Vašíčková, J., Klejdusa, B., Stratil, P., Mišurcova, L., Kráčmar, S., Kopecky, J., Vaceka, J. (2010). Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**, 464-470
- Orosa, M., Valero, J.F., Herrero, C., Abalde, J. (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters*, **23**, 1079-1085
- Orset, S.C., Young, A.J. (1999). Low-temperature-induced synthesis of  $\alpha$ -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **35**, 520-527
- Ou, Y., Zheng, S., Lin, L., Jiang, Q., Yang, X. (2010). Protective effect of C-phycocyanine against carbontetrachloride induced hepatocyte damage *in vitro* and *in vivo*. *Chemico Biological Interactions*, **185**, 94-100
- Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C.A. (1999). The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does aserving constitute? *Free Radical Research*, **30**, 153-162

- Patel, A., Sandhya, M., Richa, P., Ghosh, P. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, **40**, 248-255
- Parikh, P., Mani, U.V., Iyer, U.M. (2001). Role of *Spirulina* in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food*, **4(4)**, 193-199
- Pinero, E., Bermejo, B., Villar del Fresno, A.M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, **56**, 497-500
- Placer, C.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C. (1990). Estimation of production of lipid peroxidation in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, **16**, 259-264
- Poli, G. (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, **21**, 49-98
- Poli, G., Cottalasso, D., Pronzato, M.A., Chiarpotto, E., Marinari, U.M. (1990). Lipid peroxidation and covalent binding in early functional impairment of liver golgi apparatus by carbon tetrachloride, *Cell Biochemistry and Function*, 8-10
- Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**, 635-648
- Radmann, E.M., Reinehr, C.O., Costa, J.A.V. (2007). Optimization of the repeated batch cultivation of microalgae *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, **265**, 118-126
- Ranga, R., A., Harshavardhan, R. A., Aradhya, S.M. (2010). Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* micro algal extracts. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, **4**, 809-819
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237
- Recknagel, R., Glende, E.A., Dolak, J.A., Waller, R.L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology Therapeutics*, **43**, 139-154
- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science, 312-351
- Rodriguez-Hernandez, A., Ble-Castillo, J.L., Juarez Oropeza, M.A., Diaz-Zagoya, J.C. (2001). *Spirulina maxima* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes, *Life Science*, **69**, 1029-1037
- Romay, C., Ledón, N., González, R. (1998a). Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation, *Inflammation Research*, **47**, 334-338

- Romay, C.J., Armesto, J.D., Ramirez, R., Gonzalez Garcia, I. (1998b). Antioxidant and anti-inflammatory properties of c-phycocyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, **47**, 36-41
- Romay, C., Gonzalez, R. (2001). Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxy radicals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **52**, 367-368
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Ramirez, D., Rimbau, V. (2003). c-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein Peptide Science*, **4(3)**, 207-216
- Ross, H.M., Romrell, L.J., Kaye, G.I. (1995). *Histology- Text and Atlas*. 3rd Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Newyork.
- Sabatini, S.E., Juárez, Á.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., Molina, M.C. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **27**, 1200-1206
- Samuels, R, Mani, U.V., Iyer, U.M., Nayak, US. (2002). Hypocholesterolemic effect of *Spirulina* in patients with hyperlipidemic nephritic syndrome. *Journal of Medicinal Food*, **5**, 91-96
- Sanchez, M., Mantel, C., Rodriguez, M., Ossa, M., Lubian, L., Montero, O. (2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, **77**, 948-952
- Sarada, R., Pillai, M.G., Ravishankar, G.A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, **34**, 795-801
- Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medical Chemistry*, **8**, 721-738
- Schlösser, U.G. (1982). Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **95**, 181-276
- Senoo, H. (2004). Structure and function of hepatic stellate cells. *Medical Electron Microscopy*, **37**, 3-15
- Seven, A., Candan G. (1996). Antioksidan Savunma Sistemleri. *Cerrahpasa Journal of Medicine*, **27**, 41-50
- Sheweita, S.A., El-Gabar, M.A., Bastawy, M., Ozbek, H., Uygan, I., Gunduz, H. (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Journal of Veterinary Medicine A*, **50**, 264-268

- Sheweita, S.A., Abd el Gabar, M., Bastawy, M. (2001). Carbon tetrachloride induced changes in the activity of phase II drug metabolising enzyme in the liver of male rats: Role of antioxidants. *Toxicology*, **165**, 217-224
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, **91**, 31-38
- Singh, S., Bhushan, N., Kate, U., Banerjee, C. (2005) Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, **25**, 73-95
- Singh, S., Singh, R.P. (2008). *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International*, **24**, 392-415
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-153
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Zilli, M., Converti, A. (2008). Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, **39**, 369-375
- Solisio, C., Lodi, A., Torre, P., Converti, A., Del Borghi, M. (2006). Copper removal by pre-treated non-living biomass of *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, **97**, 1756-1760
- Spolaore, P., Cassan, C.J., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**, 87-96
- Stadtman, E.R., (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 1105-1112
- Tadros, M.G., Smith, W., Joseph, B., Phillips, J. (1993). Yield and quality of cyanobacteria *Spirulina maxima* in continuous culture in response to light intensity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **39**, 337-347
- Taiz, L., Zeiger, E. (2008). *Plant Physiology*. Sinauer Associations Inc, 111-292
- Thrall, K.D., Vucelick, M.E., Gies, R.A. (2000). Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, **60**, 531-548
- Tokuşoğlu, O., Ünal, M.K. (2003). Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, **68** (4), 1144-1148
- Tomaselli, L. (1997). Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In Vonshak, A., ed.

*Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1-16

Tomaselli, L., Boldrini, G., Margheri, M. (1997). Physiological behaviour of *Arthrospira maxima* during acclimation to changes in irradiance. *Journal of Applied Phycology*, **9**, 37-43

Torres-Durán, P.V., Miranda-Zamora, R., Paredes-Carbajal, M.C., Mascher, D., Diaz-Zagoya, J.C., Juárez-Orepeza M.A. (1998). *Spirulina maxima* prevents induction of fatty liver by carbon tetrachloride in the rat. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **44**, 787-793

Torres-Durán, P.V., Paredes-Carbajal, M.C., Mascher, D., Zamora-González, J., Díaz-Zagoya, J.C., Juárez-Orepeza, M.A. (2006). Protective Effect of *Arthrospira maxima* on Fatty Acid Composition in Fatty Liver. *Archives of Medical Research*, **37**, 479-483

Torres-Duran, P.V., Hermosillo, A.F., Juárez-Orepeza, M. (2007). Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: a preliminary report. *Lipids in Health and Disease*, **6**, 1-8

Upasani, C.D., Khera, A., Balaraman, R. (2001). Effect of lead with vitamin E, C, or *Spirulina* on malondialdehyde, conjugated dienes and hydroperoxides in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, **39**(1), 70-74

Vadiraja, B.B., Gaikward, N.W., Madyastha, K.M. (1998). Hepatoprotective effect of C-phycoyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochemistry Biophysics Researches*, **249**, 428-431

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84

Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S., Richmond, A. (1982) Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, **2**, 175-185

Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, **116**, 240-248

Wang, T., Sun, N.L., Zhang, W.D., Li, H.L., Lu, G.C., Yuan, B.J., Jiang, H., She, J.H., Chuan Zhang, C. (2008). Protective effects of dehydrocavidine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **117**, 300-308

Weber, L.W., Boll, M., Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity anmechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**, 105-136



Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 307-313

Wills, P.J., Asha, V.V. (2006). Protective effect of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. extract against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**, 320-326

Wong, C.K., Ooi, V.E.C., Wong, C.K. (2003). Protective Effects of N-acetylcysteine against carbon tetrachloride and trichloroethylene-induced poisoning in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **14**, 1-8

Wu, L.C., Ho, J.A., Shieh, M.C., Lu, I.W. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4207-4212

Yamagishi, S., Edelstein, D., Du, X.L., Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*, **50**, 1491-1494

Yang, H.N., Lee, E.H., Kim, H.M. (1997). *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Science*, **61**, 1237-1244

Ye, Z.W., Jiang, J.G., Wu, G.H. (2008). Biosynthesis and Regulation of Carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and Prospects. *Biotechnology Advances*, **26**, 352-360

Zhi-gang, Z., Zhi-li, L., Xue-xian, L. (1997). Study on the isolation, purification, and antioxidation properties of polysaccharides from *Spirulina maxima*. *Acta Botanica Sinica*, **39**, 77-81

Zou, N., Richmond, A. (2000). Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Journal of Applied Phycology*, **12**, 349-354

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİ

**Adı – Soyadı:** Remziye Aysun Kepekçi

**Doğum yeri ve yılı:** Kilis, 07.03.1980

**Medeni hali:** Bekâr

**E-posta adresi:** [aysun@gantep.edu.tr](mailto:aysun@gantep.edu.tr)

### EĞİTİM

Derece	Fakülte/Enstitü	Eğitim yılı
Yüksek Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyolojik Bilimler	2003-2006
Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	1999-2003

### YER ALDIĞI PROJELER

K5 tipi öldürücü maya toksik proteininin insan ve bitki patojenik mantarları üzerindeki inhibisyon etki tayini ve endüstriyel amaçlı kullanımı için formülasyon geliştirilmesi (TUBİTAK Projesi, Yardımcı Araştırmacı, 2004)

Gaziantep İline Bağlı Bazı İlçelerde Tarım Alanlarının Sulanmasında Kullanılan Akarsu Sistemlerinde Organik ve İnorganik Kirleticilerin Kalitatif ve Kantitatif Belirlenmesi ile Bu Kirleticiler Elemanların Toksikite Düzeylerinin Araştırılması (DPT Projesi, Yardımcı Araştırmacı, 2006)

### YAYINLAR

#### **SCI Kapsamındaki Dergi Yayınları**

İzğü, D. A., Kepekçi, R. A., İzğü, F. (2010). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo- $\beta$ -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 88-91. (SCI)

Kepekçi, R. A., Saygıdeğer, S. D. (2011). Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. Journal of Applied Phycology DOI: 10.1007/s10811-011-9710-3 (SCI)

### **Ulusal ve Uluslararası Kongre Yayınları**

İzğü, F., Altınbay, D., Kepekçi, A., Yücebey, M., Gönen, T. (2006). *In vitro* activity of panomycocin, a novel exo- $\beta$ -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against post-harvest plant pathogens and Gram-positive pathogenic bacteria. 20. Uluslararası IUBMB Molekuler Biyoloji ve Biyokimya Kongresi, Kyoto, Japonya

İzğü, F., Altınbay, D., Kepekçi, A. (2007). *In vitro* and *in vivo* activities of panomycocin against postharvest plant pathogenic fungi. 32. FEBS Uluslararası Kongre, Viyana, Avusturya

Saygıdeğer, S., Doğan, M., Pehlivan, M., Deniz, F., Kepekçi, R. A. (2007). Gaziantep Organize Sanayi Bölgesinin Atık Suları İle Kontamine Olan Su, Toprak, Sediment ve Bitki Örneklerinde Cd ve Pb Düzeyleri. VII. Ekoloji ve Çevre Kongresi, Malatya

### **KATILDIĞI KURSLAR VE KONGRELER**

Hücre Füzyonu Yöntemiyle Monoklonal Antikor Üretimi Uygulamalı Eğitim Kursu (2006, Tubitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü)

Bilimsel Araştırmalarda Deney Hayvanları Kursu (2009, Gaziantep Üniversitesi)

19.Uluslararası Katılımlı Elektron Mikroskopi Kongresi (2009, Trabzon)

Uluslararası Katılımlı I.Kök Hücre Kursu ve 5.Kök Hücre Sempozyumu (2010, Ankara)