

Su Ürünleri Dergisi J.Fish.Aquat.Sci.	Cilt No.18/1 Vol.18/1	Özel Sayı Suppl.	71 - 77 71 - 77	İzmir – Bornova 2001 İzmir – Bornova 2001
--	--------------------------	---------------------	--------------------	--

***Spirulina platensis* Ham Ekstraktının L929 Fare Fibroblast Hücrelerinin Üremesine Etkisi**

S. İsmet Deliloğlu Gürhan¹ Meltem Conk Dalay¹ Mete Yılmaz²
Bayram Turgut³

- ¹ Ege Üniv., Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 35100, İzmir, Türkiye.
² Ege Üniv., Su Ürünleri Fakültesi, 35100, İzmir, Türkiye.
³ Alsancak Devlet Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Alsancak, İzmir, Türkiye.

Abstract : *The Effect of Spirulina platensis Crude Extract on the Growth of L929 Mouse Fibroblasts.* The aim of this study was detection of the in vitro growth stimulating effect of the *Spirulina platensis* on the cell cultures.

After harvesting the *Spirulina platensis* grown in Zarrouk's media, crude extract was prepared by freezing - thawing and steam treatment. Following filter sterilisation of the extract, 10 fold dilutions were prepared in cell growth medium and the growth stimulation effect of it was detected with mouse fibroblast (L929) cell cultures in stationary culture conditions.

The results indicated that $1\mu\text{g ml}^{-1}$ dilution of the crude extract of *S. platensis* microalgae stimulates the growth of L929 cell-line whereas; growth inhibition was detected in more dense concentrations.

Key Words : *Spirulina platensis*, crude extract, effect on cell growth, cell culture, L929.

Özet : Bu çalışmanın amacı *Spirulina platensis*'in laboratuvar şartlarında in vitro ortamlarda hücre kültürlerinin üremeleri üzerine etkisini incelemektir.

Zarrouk ortamında üretilen *Spirulina platensis*, hasat edildikten sonra dondurma-çözme yöntemi ve su buharı uygulanarak ham ekstraktı elde edildi. Membran filtrasyonu yöntemi ile sterilize edildikten sonra hücre üretme ortamı içinde 10 katlı dilusyonlar hazırlanarak L929 fare fibroblast hücre kültürlerinin üremelerine etkileri durağan kültür ortamında incelendi.

Elde edilen değerler *Spirulina platensis* alginin ham ekstraktının $1\mu\text{g ml}^{-1}$ dilusyonda hücre üremesini stimüle edici, daha yoğun konsantrasyonlarda ise inhibe edici etkisi olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler : *Spirulina platensis*, ham ekstrakt, hücre üremesine etki, hücre kültürleri, L929.

Giriş

Spirulina platensis, mavi-yeşil algler (Cyanophyta)' den yenilebilir bir mikroorganizmadır. Önemli bir protein kaynağı olduğu bilindiği için ticari olarak büyük miktarlarda üretilmekte ve geniş kitlelerce kullanılmaktadır (Conk-Dalay 1998).

Spirulina alginin yapısında in vitro hücre kültürü vasatlarının bileşimine giren temel amino asit ve vitaminlerin pek çoğu bulunmaktadır (Conk-Dalay 1998, Freshney 1994). Bu noktadan hareketle, bu mikroalgden elde edilecek ekstraktların hücre üremesini stimüle edebileceği düşünülmüştür.

Bu mikroalgin antiviral, antitumoregenic, antioksidan etkilerinin yanında yaşlanmayı geciktirici ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinin varlığı da çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Miranda ve diğ. 1998, M ittal ve diğ. 1999, Romay ve diğ. 1998).

Bu çalışmanın amacı, *S. platensis*'in ham ekstraktının tümörejenik özelliği olmayan devamlı hücre kültürlerine etkisini incelemektir. Bu amaçla model olarak L929 fare fibroblast hücre kültürleri seçilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Spirulina platensis : Bu çalışmada kullanılan *S. platensis*' in orijini Peru' daki Parachas gölüdür. Saf kültürü Dr. Ripley Fox , ACMA (Associaation pour Combatre la Malnutrition par Algoculture), Fransa'dan sağlanmış olup, Ege Üniversitesi Bilim – Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), İzmir' de bulunan seralarda üretilmiştir. Üretim Zarroauk ortamı

içinde, gün ışığında ve pedallı karıştırma sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Üreyen algler filtrasyon yöntemi ile hasat edilmişlerdir.

Ham ekstraktın hazırlanması: (100µg ml⁻¹) : *S. platensis* ham ekstraktı dondurma-çözdürme yöntemi ile hazırlanmıştır. Fosfat buffer solusyonu (pH7.0) içinde -24°C de dondurulan alg süspansiyonu 4°C de hızla çözdürülmüştür. Üç kez tekrarlanan bu işlemin ardından süspansiyon santrifugasyonla (9000 rpm 30 dakika) katı partiküllerinden ayrılmış ve kademeli filtrasyonla (0.8µm, 0.45µm, 0.22µm) sterilize edilmiştir.

Hücre kültürü : Çalışmada kullanılan non-tumorojenik özellikli fare fibroblast hücre kültürü (L929 cell-line), Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK), Şap Enstitüsü, Ankara'dan sağlanmıştır. Monolayer kültürler %10 fetal bovin serum, (Biochrom, Germany) içeren, antibiyotiksiz Dulbecco' nun Modifiye Eagle's vasatı (DME, Sigma, USA) ile hazırlanmıştır.

Sitotoksisite testi : *S. platensis* ham ekstraktının L929 hücrelerinin üremesine etkisinin incelenmesinde iki değişik yöntemle sitotoksisite testi uygulanmıştır:

I- Üremenin İnhibisyonu : Aktif üreme fazındaki L929 hücreleri 25cm² yüzeyli hücre kültürü flaskları (Greiner, Germany)' na 0.5x10⁴ hücre/cm² yoğunlukta ve 5ml/flask olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 37°C de 4 gün süre ile inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda vasatları boşaltılan flasklara *Spirulina* ham ekstraktının üretme vasatı içerisinde hazırlanmış on katlı dilüsyonları koyuldu (5ml/flask), her dilüsyon için dört flask kullanıldı, dört flaska sadece taze üretme vasatı konularak kontrol olarak ayrıldı ve

Spirulina platensis Ham Ekstraktının L929 Fare Fibroblast Hücrelerinin Üremesine Etkisi

tüm kültürler 37°C de 6 gün süre ile (kontrol flasklarda %99-100 monolayer üreme gözleninceye kadar) inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler yüzeyden ve birbirlerinden enzimatik muamele (%0.25 tripsin) ayrıldı ve hücre canlılığı (C_T) “trypan blue dye exclusion” tekniği ile belirlendi (Freshney 1994). *S. platensis* ham ekstraktının hücre üremesini inhibe etme oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Üremenin inhibisyonu (Üİ)

$$\text{Üİ(\%)} = 100 - \frac{\text{test } C_T}{\text{kontrol } C_T} \times 100$$

II- Üreme kinetiğinin belirlenmesi: Bu amaçla L929 hücrelerinin üretme vasatı içerisindeki suspansiyonu 9 cm² yüzeyli doku kültürü petri kutularına (Greiner, Germany) 2.2x10⁴ hücre/cm² yoğunlukta ve 2ml/petri olarak taksim edilerek 37°C, %5CO₂, %99 rutubetli ortamda 2 saat bekletilerek hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. Süre sonunda vasatları pipet yardımıyla çekilen kültürler *S. platensis* ham ekstraktının üretme vasatı içindeki taze hazırlanmış 10 katlı dilüsyonları ilave edildi. Her dilüsyon için 22 petri kullanıldı. 22 petriye ise sadece üretme

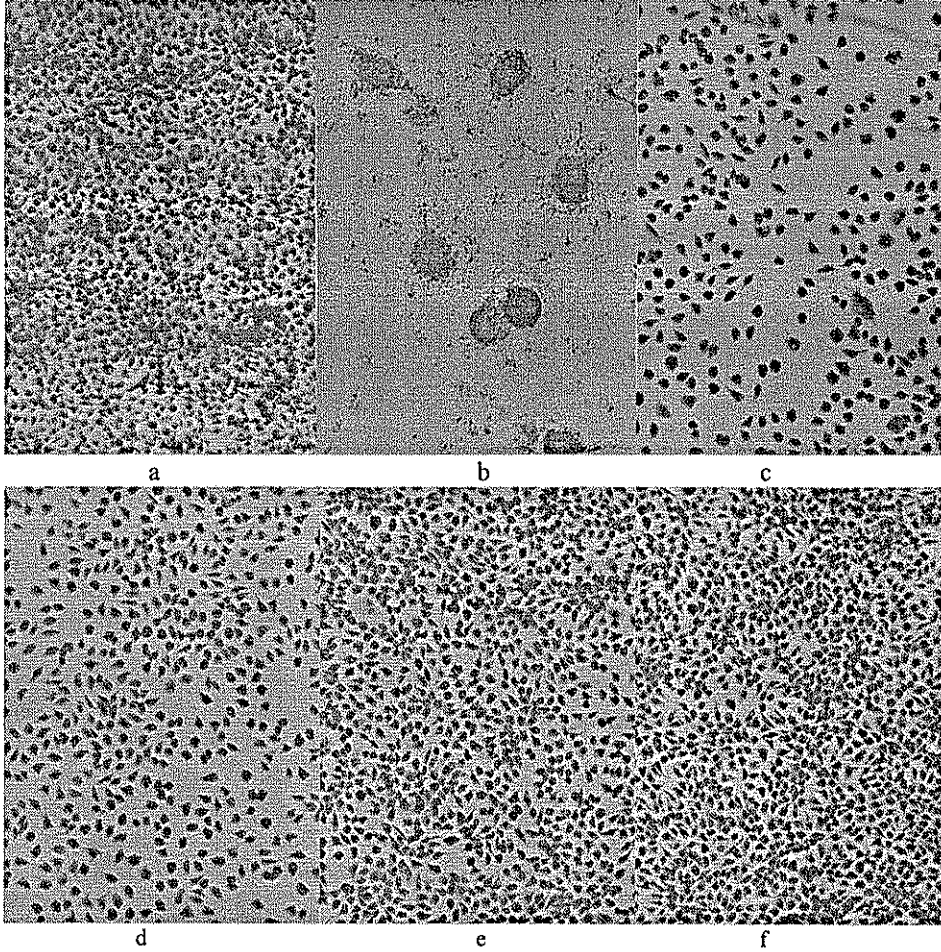
vasatı konularak kontrol olarak ayrıldı. Tüm kültürler 37°C, %5CO₂, %99 rutubetli ortamda inkube edildi. 24 saat aralıklarla her dilüsyon için iki petri alınarak enzimatik yöntemle (%0.25 tripsin) hücreler yüzeyden ayrıldı ve hücre canlılığı (C_T) “trypan blue dye exclusion” tekniği ile belirlendi.

Bulgular

I-Üremenin İnhibisyonu: L929 hücreleri *S. platensis*'in ham ekstraktının 10 katlı dilüsyonlarını içeren ortamlarda kültive edildiğinde 100 µg ml⁻¹ ham ekstrakt içeren ortamda tüm hücrelerin birkaç saat içerisinde öldüğü gözlemlendi. 10 µg ml⁻¹ ekstrakt içeren ortamda 6 gün inkubasyon sonunda hücrelerin çoğunun nekroze olduğu, pek az sayıda hücrenin canlılığını sürdürdüğü görüldü ve kontrol karşısında üreme inhibisyonu % 88 olarak hesaplandı. Daha düşük konsantrasyonlarda (1 µg ml⁻¹, 0.1 µg ml⁻¹ ve 0.01 µg ml⁻¹) ise hücre üremesinin inhibe edilmediği aksine stimüle edildiği saptandı. Mikroskopik incelemelerde hücre morfolojisinde, normal fibroblastik yapı yanında, hızlı çoğalmaya bağlı sferikal hücrelerin varlığı dikkat çekici idi (Tablo1, Şekil 1).

Tablo 1. *Spirulina platensis* ham ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücrelerinin üremesine etkisi.

	Kontrol	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
Hücre yoğunluğu	16x10 ⁵	0	3,5 x10 ⁵	28 x10 ⁵	26,5 x10 ⁵	20,0 x10 ⁵
Üreme inhibisyonu		0	88	-75	-70	-25



Şekil 1. *S. platensis* ham ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücrelerinin üremesine etkisi. a) Kontrol, b) 100 µg/ml, c) 10 µg/ml, d) 1 µg/ml, e) 0,1 µg/ml, f) 0,01 µg/ml

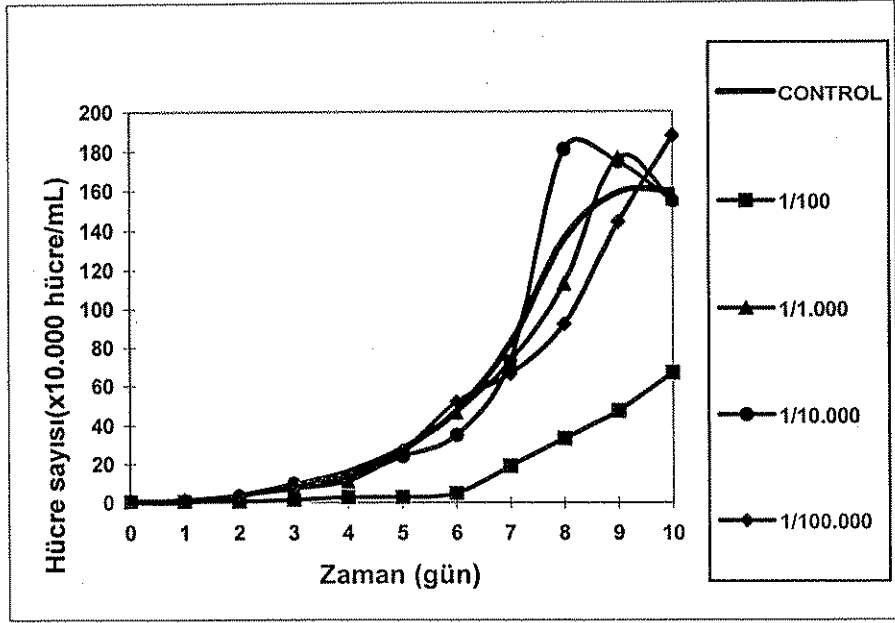
II- Üreme Kinetiği: *S. platensis*'in ham ekstraktının hücre üretme ortamındaki 10 katlı dilüsyonlarında hazırlanan L929 monolayer hücre kültürlerinin 24 saat aralıklarla 10 gün süre ile yapılan canlılık sayımı sonucunda 100 µg ml⁻¹ ham ekstrakt içeren kültürlerde hücrelerin tamamının ilk 24 saat içerisinde öldüğü saptandı. 10 µg ml⁻¹ ham ekstrakt içeren ortamlarda ilk 72 saatte hücrelerin önemli miktarı ölürken, daha sonra kalan canlı

hücrelerin 3 günlük bir durguluk dönemini (lag faz) takiben yavaş da olsa üremeye başladıkları görüldü. Onuncu gün sonunda bu kültürlerde hücre yoğunluğunun başlangıçtaki değerlere göre 6 kat fazla olduğu saptandı. 1 µg ml⁻¹ ve 0.1 µg ml⁻¹ ham ekstrakt içeren ortamlardaki kültürlerde üreme hızı kontrol kültürlerle benzer şekilde altıncı günde artmaya başladığı saptandı. Bu iki grupta logaritmik fazda üreme 7. ve 8. günler

Spirulina platensis Ham Ekstraktının L929 Fare Fibroblast Hücrelerinin Üremesine Etkisi

arasında gerçekleşerek izleyen süreçte ortamın nutritif değerindeki azalmaya bağlı olarak hücre ölümleri saptandı. Böylece elde edilen üreme eğrisinde plato fazı gözlenmedi. $0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$ ham

ekstrakt içeren ortamlardaki kültürlerde ise hücre üremesi önceliklere oranla daha yavaş ancak düzenli bir artışla test süresinin sonuna kadar (10 gün) devam etti. (Şekil 2).



Şekil 2. L929 hücrelerinin *S. platensis* ham ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarında in vitro üreme kinetiği.

Tartışma ve Sonuç

Spirulina 'nın yapısında çeşitli amino asit, vitamin, polisakkaritler, vb. bulunmaktadır (Borowitzka 1992). Alg ekstraktlarının içerdikleri polisakkaritler nedeniyle antitümör aktiviteleri çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Harada ve Kamei 1997, Kashiwagi ve diğ. 1980, Noda ve diğ. 1990, Ohigashi ve diğ. 1992). *S. platensis* 'in bir ekstraktı olan fikosiyenin immunositlerin ve hepatositlerin üremesini stimüle ettiği de bilinmektedir (Sadanori ve diğ. 1993, Vadiraja ve diğ. 1998). Son zamanlarda,

söz konusu mikroalgün antioksidan ve antiinflamatuvar etkisinin varlığı da tespit edilmiştir (Romay ve diğ. 1998). Ancak tüm bu etkiler doza ve organizmaya bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Bu çalışmada da gözlemlendiği gibi *S. platensis* ' ham ekstraktı. $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ dan daha yoğun olarak kullanıldığında hücre kültürlerine toksik etki yapmamaktadır. Önceki çalışmaların ışığında bu etkinin algin yapısında bulunan polisakkaritlerden ileri geldiği ya da bazı toksik componentlerin hızlı hücre ölümüne neden olduğu düşünülebilir.

Mikroalglerin kimyasal kompozisyonları üretim teknolojilerine ve ekstraksiyon yöntemine göre değişiklikler gösterir (Borowitzka 1992). Bu ürünlerin hücre üremesine etkisinin incelenmesinde inhibitör ve stimulatör faktörlerin kesin olarak saptanmasında yarar vardır.

Hayvansal hücre kültürlerinin hazırlanmasında kullanılan üretim vasatlarının bileşiminde %5-10 oranında kan serumu bulunmaktadır. Kültür ortamlarının en önemli değişkeni de kan serumudur. Avantajları yanında pek çok dezavantajı da bulunmaktadır ki, bu da ürünün kalitesini ve fiyatını önemli ölçüde etkilemektedir. 1980lerden bu yana serumsuz üretim ortamlarını geliştirilmesine yönelik pek çok çalışma

yapılmış ve yapılmaktadır (Gürhan ve Özdural 1990). Chlorella, Scenedesmus ve Spirulina gibi mikroalglerin sıcak su ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen büyük molekül ağırlıklı fraksiyonlarının üretim vasatlarına ilavesiyle in vitro kültür ortamlarında çeşitli insan hücrelerinin serum gereksinimi %10 dan %1 e kadar indirgenebilmiştir (Kumamoto 1984). Bu çalışmada da $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in altındaki konsantrasyonlarında *S. platensis*'in dondurma-çözdürme yöntemi ile elde edilen ham ekstraktının L929 hücrelerinin üremesini stimule ettiği saptanmıştır. Bu ön bulguların ışığında, daha detaylı kalitatif ve kantitatif incelemeler yapılarak konunun bilimsel ve ticari boyutları kesin olarak belirlenmesinde yarar vardır.

Kaynakça

- Borowitzka, MA. 1992. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. Micro-Algal Biotechnology (eds. Michael A. Borowitzka and Borowitzka, LJ.) Cambridge Univ. Press.
- Conk-Dalay, M., 1998, Mavi- Yeşil Algler (Cyanophyta)' den Spirulina' nın kullanım Alanları. Su Ürünleri Derg. 14(3-4) 151-155.
- Freshney, RI. 1994. Culture of Animal Cells, 3rd ed. Wiley-Liss Inc.
- Gürhan, S İ, N. Özdural, 1990. Serial cultivation of suspended BHK21/13 cells in serum reduced and serum-free medium supplemented with various membrane protecting agents. Cytotechnology, 3, 89 – 93.
- Harada, H. and Y. Kamei, 1997. Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. Cytotechnology 25, 213-219.
- Kashiwagi, M., JS. Mynderse, RE. Moode and TR Norton, 1980. Antineoplastic evolution of Pasific Basin marine algae. J. Pharm. Sci. 69, 735-738.
- Kumamoto, S. 1984. Method of human cell culture; microalgae. US patent no. 4 390 624.

Spirulina platensis Ham Ekstraktının L929 Fare Fibroblast Hücrelerinin Üremesine Etkisi

- Mirenda, MS., RG. Cintra, SBM. Barros and J. Mancini-Filho, 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 31,8, 1075-1079.
- Mittal, A., PV. Kumar, S. Banerjee, AR. Rao, A. Kumar, 1999. Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on carcinogen metabolising enzymes in Swiss albino mice. Phytother Res. 13, 2, 111-114.
- Noda, H., H. Amano, K. Arashima and K. Nishizawa, 1990. Antitumor activity of marine algae. Hydrobiologia 204/205, 577-584.
- Ohigashi, H., Y. Sakai, K. Yamaguchi, I. Umezaki and K. Kashimizu, 1992. Possible antitumor promoting properties of marine algae and in vivo activity of Wakame seaweed extract. Biosci Biotech Biochem 56, 994-995.
- Romay, C., J. Armesto, D. Ramirez, R. Gonzalez, N. Ledon, I. Garcia, Jan 1998. Antioxydant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. Inflammation Research, 47,1: 36-41.
- Sadanori, M., M. Hiroyoshi, N. Kyoko, K. Fuminori 1993. Effect of seaweed preparations on murine immunocytes. J. Appl. Phycol. 5, 629-637.
- Vadiraja, BB, NW. Gaikwad, KM. Madyastha, Aug. 19 1998. Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: Protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. Biochemical and Biophysical Research Communications, 249, 2, 428-431