



## Review Article/ Derleme Makalesi

# P-Glycoprotein in Marine and Freshwater Bivalves Deniz ve Tatlı Su Midyelerinde P-Glikoprotein

Reyhan Gençer\*, Pınar Arslan

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Çankırı, Türkiye

### Öz

P-glikoprotein (P-gp), ilk defa kolşisine dirençli olan Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde aşırı salgılanan yüzey glikoproteinini olarak tanımlanmıştır. P-glikoprotein (P-gp veya ABCB1), suda yaşayan organizmalarda multiksenobiyotik dirençten (MXR) sorumlu adenosin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları ailesine aittir. Esas görevleri endojen ve eksojen çeşitli substratlardan hücrenin korunmasını sağlamaktır. ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışmaktadır ve çeşitli ilaçlara karşı geliştirilen dirençten sorumlu 7. kromozomdaki (7q21) MDR1 geninin ürünü olan efluks pompası olarak bilinen transmembran proteinleridir. P-gp, ilaçların idrar ve safra aracılığıyla atılmasını hızlandırarak eliminasyonuna ve detoksifikasyonuna yardımcı olmaktadır. Sucul ekosistemde yaşayan çift kabuklu deniz canlılarında, MXR akış taşıyıcıları, geniş spektrumlu bir fizyolojik savunma sistemi oluşturmaktadır. Bu derlemede deniz ve tatlı su midyelerinde P-glikoproteinlerin yapısı, fonksiyonları, biyolojik önemi ve P-glikoprotein ile ilgili yapılan çalışmalar hakkında bilgi verilerek, P-glikoproteinleri incelemede kullanılan yöntemlerden söz edilmiştir. Ayrıca, P-glikoproteinlerin MXR mekanizmasındaki önemi vurgulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** P-glikoprotein, MDR1, ABC1, MXR, Tatlı su midyesi, Deniz midyesi


### Abstract

P-glycoprotein (P-gp) was first identified as a surface glycoprotein oversecreted in colchicine resistant Chinese hamster ovary cells. P-glycoprotein (P-gp or ABCB1) belongs to the family of ATP-binding cassette (ABC) transporters responsible for multi-xenobiotic resistance (MXR) in aquatic organisms. Their main task is to protect the cell from various endogenous and exogenous substrates. It works dependent on Adenosine Triphosphate (ATP) hydrolysis and is the product of the on chromosome 7. (7q21) multidrug resistance 1 (MDR1) gene responsible for resistance to various drugs. They are transmembrane proteins known as efflux pumps. P-gp aids in the elimination and detoxification of drugs by accelerating their excretion through urine and bile. MXR flow carriers constitute a broad spectrum physiological defense system in bivalves living in aquatic ecosystems. In this review, information is given about the structure, functions, biological importance and studies of P-glycoproteins in marine and freshwater mussels, and the methods used to examine P-glycoproteins are mentioned. In addition, the importance of P-glycoproteins in the mechanism of MXR was emphasized.

**Key Words:** P-glycoprotein, MDR1, ABC1, MXR, Freshwater mussel, Marine mussel

### İletişim adresi/Address for Correspondence:

Reyhan Gençer   
Çankırı Karatekin Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Çankırı, Türkiye  
E-mail : reyhanmemis06@hotmail.com

Pınar Arslan  <https://orcid.org/0000-0001-5910-2835>

## GİRİŞ

P-glikoprotein (P-gp), 1976 yılında ilk defa kolşisine dirençli olan Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde aşırı salgılanan yüzey glikoproteini olarak Juliano ve Ling tarafından tanımlanmıştır<sup>1</sup>. P-gp, hücre membranında bulunmaktadır ve çeşitli ilaçlara karşı membran geçirgenliğini (permeabilite) düzenleyici etkiye sahip olduğundan “Permeability” kelimesinin baş harfi olan “P” ile ifade edilerek adlandırılmıştır<sup>1</sup>.

P-glikoprotein, kemoterapötik ajanları hücre dışına çıkaran ATP-binding cassette (ABC) taşıyıcı ailesinin ilk keşfedilen üyesidir<sup>2</sup>. ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışmaktadır ve dışa atım (efluks) pompası olarak işlevi olan bir transmembran glikoproteinidir<sup>3,4,5</sup>.

Temel görevi endojen ve eksojen çeşitli substratlardan hücrenin korunmasını sağlamak olan P-gp’ler, çoklu ilaç direncinde de (MDR) görev almaktadırlar<sup>6,7</sup>. Ayrıca hormonların hücre içine dağılımından, hücrenin farklılaşması ve proliferasyonundan, immün yanıtın düzenlenmesinden ve apoptozisinden de sorumludur. P-glikoproteinler, intrasellüler pH’yı değiştirerek kaspazların aktivitesini baskılar ve intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun değişmesiyle anti-apoptotik aktivite gösterirler<sup>8</sup>. İlaç cevabında, cinsiyet hormonları sistemik organlardaki P-gp ekspresyonunu ve fonksiyonunu etkileyerek dolaşımda cinsiyete bağlı farklılıklara neden olabilmektedir<sup>9,10</sup>.

P-gp, ilaçların sırasıyla idrar ve safra ile atılmasını hızlandırarak ilaçların eliminasyonuna ve detoksifikasyonuna yardımcı olmaktadır<sup>11</sup>. Gastrointestinal sistemden bileşiklerin alımını sınırlayarak ve bileşiklerin karaciğer, böbrek ve bağırsakta atılımını uyararak koruma sağlamaktadır<sup>12,13</sup>. Ayrıca, beyin plasenta, testis, lenfosit gibi hassas dokularda lokalize olan P-gp, kan-doku bariyeri oluşturarak ilaçların duyarlı doku ve hücrelere girişlerini sınırlamakta ve hücre içi birikimini azaltmakta olup geniş bir substrat özgülüğüne sahiptir<sup>3,14,15</sup>. Böylece kan doku bariyerlerinin

(kan-beyin bariyeri, kan-plasenta, kan-testis) oluşumunda önemli görev aldığından doku koruyucusu olarak kabul edilmektedir<sup>16,17,18,19</sup>.

Deniz ve tatlı su midyeleri, çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin, düşük yağlı ve düşük kolesterollü protein kaynağıdır<sup>20</sup>. Ayrıca iz elementler (selenyum, kalsiyum, demir, magnezyum ve fosfor), vitaminler (A, B1, B2, B6, B12, C, D ve E) ve glikojen bakımından da oldukça zengindir<sup>21,22,23</sup>. Denizel ve tatlı sularda P-gp değerlerinin izlenmesi açısından çalışmalarda uygun sucul organizmalar arasında görülmektedir<sup>24,25,26,27</sup>.

Deniz çift kabuklularında, en iyi karakterize edilmiş ABC taşıyıcıları, ABCB geni tarafından kodlanan P-gp ve ABCC geni tarafından kodlanan çoklu ilaç direnci ile ilgili proteinleridir (MRP)’dir<sup>28</sup>.

Sudaki organizmalar ve özellikle midye gibi filtreme yoluyla beslenen canlılar, sürekli olarak suda çözünen toksik maddelere maruz kalırlar ve muhtemelen, bu tür kimyasalların zararlı etkilerinden kaçınmak için ABCB ve ABCC tipi taşıyıcılar, multiksenobiyotik direnç sağlamaktadır (MXR) ve çift kabuklu solungaçlarda bir çevre-doku bariyeri oluşturur<sup>28,29</sup>.

Multiksenobiyotik dirence, hücre zarları ve iç organel zarları üzerinde yer alan ve hücrelerden hem endojen kimyasalları hem de ksenobiyotikleri pompalayan ve böylece bunların birikmesini ve toksik etkilerini önleyen ATP’ye bağımlı ABC taşıyıcıları aracılık etmektedir.

P-glikoprotein zararlı maddelere karşı hassas dokuları doğal koruma fonksiyonu gerçekleştirirken, ilaç dağılımını etkileyerek özellikle antipsikotik ilaçlar, HIV proteaz inhibitörleri, antineoplastik gibi ilaçların terapötik etkilerini engelleyebilmektedir<sup>30,31</sup>.

Deniz ve tatlı su midyelerinde MDR ve MXR mekanizmalarının keşfedilmesinin ardından P-gp ile ilgili mevcut bilgi düzeyinin artırılması, temel görevlerinin ve işlevlerinin aydınlatılması için daha fazla araştırmaya odaklanılmıştır.

### P-glikoprotein (P-gb) Yapısı

P-glikoprotein, suda yaşayan organizmalarda multiksenobiyotik dirençten sorumlu ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları ailesine aittir<sup>32</sup>.

P-glikoprotein, MDR genleri arasında yer alan 7. kromozomdaki (7q21) MDR1 geninin 170-kD ağırlığında protein ürünüdür, 12 transmembran segmenti, 2 adenozin 5'-trifosfat (ATP)-bağlanma bölgesinden ve 1280 amino asitten oluşan bir dimerdir<sup>8,33,34</sup>. P-gp hücre içi ATP- bağlayıcı bölgeye ve her biri altışar transmembran segment içeren amino ve karboksil olmak üzere iki kısma sahiptir<sup>3,18</sup>. Bu yapısından dolayı P-gp bilateral simetri göstermektedir. Yapısında bulunan transmembran halkalar aracılığıyla da geniş çeşitliliğe sahip olan substratlarının dışarı atılmasını sağlamaktadır.

### Deniz Midyelerinde P-glikoprotein ile İlgili Çalışmalar

P-glikoprotein, suda yaşayan organizmalarda yapılan araştırmalar sonucunda MXR sisteminin bir parçası olarak kabul edilmiştir.

Suda yaşayan omurgasızların multiksenobiyotik direnci, P-glikoprotein (ABCB1) ve MRP (çoklu ilaç direnç proteini; ABCC) tipi ABC taşıyıcılarının aracılık ettiği hücrel akış aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir<sup>24</sup>.

Dünya çapında önemli su ürünlerinden olan, *Mytilus galloprovincialis*'un yetiştiriciliğindeki en kritik sorunlardan biri kıyı çiçeklenmeleri sırasındaki toksin birikimidir. Toksinleri üreten ve içeren mikroalgler, bu toksinleri biriktiren, dönüştüren ve ortadan kaldıran çift kabuklu yumuşakçalar tarafından yutulmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışmada; *M. galloprovincialis*'te okadaik asit detoksifikasyon sürecinde P-gp'nin varlığı ve rolü araştırılmıştır. *Dinophysis acuminata* çiçeklerinden okadaik asitle doğal olarak kontamine olan *M. Galloprovincialis* bireyleri incelenmiştir. MgMDR1 ve MgMDR2 proteinleri, ABCB taşıyıcılarının yapı organizasyonuna sahip olduğu görülmüş ve P-gp/MDR/ABCB proteinleri olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, MDR genlerinin ekspresyonu solungaç, sindirim bezi ve manto dokularındaki MgMDR1 ve MgMDR2 ekspresyon kalıpları incelenmiştir. Gen

ekspresyon analiz sonuçlarına göre; kontrol ve okadaik asit grupları karşılaştırıldığında sindirim bezi ve solungaç dokularında okadaik asit varlığında MDR1 ekspresyonunda önemli artış olmuştur. MDR2 ekspresyonu okadaik asidin varlığında stabil kalmış önemli bir etkiye neden olmamıştır. MDR1 ekspresyonunda, okadaik asit içeriği arttıkça sindirim bezinde MRP2 ekspresyonunda önemli bir indüksiyon bulunmaktadır. Böylece, P-gp ve MRP, ksenobiyotiklere karşı fonksiyonel bir savunma ağı oluşturabilir<sup>35</sup>.

*Mytilus edulis* bireylerinde, kabuklu deniz canlılarında birikerek zehirlenmelerine neden olan diyaretik kabuklu su ürünleri zehirlenmesinin (DSP) ana vektörü olarak bilinen okadaik asitin (OA) sitotoksitesisi araştırılmıştır. 10 nM ve 1 mM okadaik asitte inkübe edilen *Mytilus edulis* midye bireylerinin kan hücrelerinde hücrel canlılık incelenmiştir. 72 saatlik maruziyetten sonra hücrelerdeki canlılık oranları incelendiğinde, kontrol hücrelerinde %88'e kıyasla 1 µM okadaik asitte %54'e düşmüştür. Bu durum, diğer hücre tipleriyle karşılaştırıldığında 30-1000 kat daha yüksek olan OA değerleri için >1 µM'lik bir letal doz (LC<sub>50</sub>) değeri vermiştir. P-gp aktivitesinin OA'ya karşı dirence katkıda bulunduğu varsayılmıştır. P-gp substratları olarak, vinkristin ve rodamin B maddeleri, P-gp taşınmasının inhibitörleri olarak da verapamil veya staurosporin (ST) kullanılmıştır. Farklılık gösteren OA konsantrasyonları, kan hücrelerinde vinkristin dinamiklerini etkilememiştir. Pozitif kontrol testi olarak, midye solungaç dokusunda P-gp aktivitesinin değeri ölçüldüğünde Rodamin B'nin akışı, hücre zarı P-gp aktivitesi için kanıt olarak kabul edilen verapamil tarafından azaltılmış, böylece yöntemin doğruluğu ispatlatmıştır. Rodamin B akışı ayrıca solungaç dokusunda OA tarafından azaltılmış, bu durumda okadaik asitin rekabetçi bir substrat ya da P-gp aktivitesinin inhibitörü olduğunu göstermiştir. OA'ya önceden maruz kalmış kan hücrelerinde lizozomal bölmenin hacmi ölçülüp kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında ise önemli bir artış tespit edilmiştir. OA'nın lizozomal sistem içinde

alınması ve depolanmasının midye kan hücrelerini bileşiğın sitotoksik etkilerinden koruyabileceği düşüncesi öne sürülmüştür<sup>36</sup>.

P-glikoprotein aracılı MXR mekanizmasının varlığı ve işlevi *Mytilus galloprovincialis* de dahil olmak üzere çok sayıda sucul organizmalarda görülmüş ve karakterize edilmiştir<sup>26</sup>.

Sıcaklık, sucul canlıların fizyolojik performansını ve dağılımını etkileyen önemli bir abiyotik faktördür. ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı P-gp kodlayan sıcaklık ve kirletici kaynaklı modülasyonlarla birlikte hem transkripsiyonel uygulayabilen cAMP/PKA sinyal yolu üzerinde hem de bu proteinler üzerinde transkripsiyon sonrası kontrol özellikle cAMP/PKA yolu ve HSP70 aktivasyonunda yer almaktadır. Kıyı ekosistemleri üzerindeki etkileri, antropojenik tehditleri anlamak için deniz midyeleri uygun model organizmalar olarak tercih edilmektedir<sup>35</sup>.

Suda yaşayan organizmalarda P-gp indüksiyonunun kirleticilere maruziyetin göstergesi olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemeye yönelik çalışmaların sonuçları incelendiğinde, P-gp indüksiyonunun substrata özgü olmadığını ve spesifik bileşiklere maruziyeti değerlendirmek için doğrudan kullanılamayacağı görülmüştür<sup>37</sup>.

P-gp indüksiyonu, HSP70 indüksiyonu gibi strese yanıt olarak verilen genel bir tepki gibi kabul edilmektedir<sup>38</sup>. Ayrıca ısı şoku proteinleri hem yapısal olarak hem de bir dizi sıcaklık ve kimyasal tarafından indüklenebilen üyeler dahil olmak üzere ifade edilebilen yüksek oranda korunmuş sitozolik protein ailesine dahildir<sup>38</sup>.

*Mytilus* türünün ısıya ve ağır metallerle maruz bırakılması sonucunda yapılan bir çalışmada, yüksek düzeyde HSP70 bulunmuştur<sup>39</sup>. Bu çalışmada, uygulanan stres faktörlerinden bazıları, özellikle ısı şoku, sodyum arsenit ve kadmiyum *M. californianus*'ta P-gp protein seviyesinde ve aktivitesinde artışına neden olmuştur. Sonuç olarak incelenmiş olan yumuşakçalarda P-gp'nin, HSP70 yanıtına benzer veya bununla ilişkili hücresel streslere genel bir yanıtın göstergesi olabileceğini ya da aynı stres faktörlerinin bu iki ayrı sistemi aynı anda indükleyebileceğini düşündürmektedir<sup>39</sup>.

Akdeniz midyeleri (*Mytilus galloprovincialis*) metal bakırın farklı konsantrasyonlarına veya artan deniz suyu sıcaklıklarında oksitetrasiklin antibiyotige maruz bırakılarak HSP70 ve ABC transkripsiyonunun transkripsiyonel modülasyonu, P-gp, cAMP/PKA sinyal yolu ile değerlendirilmiştir<sup>40</sup>. Midyeler laboratuvar ortamında 16°C, 20°C ve 24°C sıcaklığa alıştırmış ardından 4 gün boyunca bakır (Cu) ve oksitetrasiklin antibiyotik (OTC) kimyasal maddelerine maruz bırakılmıştır. Hayvanların solungaçlarında cAMP seviyelerinde ve PKA aktivitelerinde iki modlu değişikliklere neden olmuştur. PKA aktivitesindeki OTC veya Cu kaynaklı değişiklikler ile HSP70 ve ABCB ekspresyonu arasında bir korelasyon gözlenmiştir. Sıcaklık artışları (24°C'ye kadar), kirleticilere verilen ABCB ve HSP70 tepkilerini değiştirmiş ve bunların cAMP/PKA modülasyonu ile ilişkilerini bozarak biyolojik uç noktalar arasında korelasyon kaybına yol açmıştır. Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde, sıcaklığın inorganik ve organik kimyasalların midyelerin cAMP/PKA sinyal yolu üzerindeki etkilerini bozabileceğini ve bunun sonucunda fizyolojik plastisite ve sitoproteksiyonun temel moleküler araçlarını değiştirebileceğini göstermektedir<sup>40</sup>.

Midye kan hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, deniz midyeleri *Mytilus edulis* ve *M. galloprovincialis*'in hemositlerinde, Rodamin B birikiminin karakteristik paterninin ve MXR inhibitörlerine duyarlılığın yanı sıra P-gp'nin varlığını göstermiştir<sup>41</sup>.

Çift kabuklu deniz canlılarında, P-gp hakkında daha fazla bilgi sağlamak için Huang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *Ruditapes philippinarum*, *Scapharca subcrenata* ve *Tegillarca granosa* dahil olmak üzere üç çift kabuklu midye türünde P-gp'nin tam cDNA'sı klonlamıştır ve toksojenik bir dinoflagellat olan *Prorocentrum lima*'ya maruz kaldıktan sonra üç çift kabuklu incelenmiştir. *R. philippinarum*, *S. subcrenata* ve *T. granosa* P-gp'nin tam dizileri, ABCB ailesinden tam taşıyıcılar olarak normal bir dizi organizasyonuna sahip olan diğer türlerden MDR/P-gp/ABCB proteinleri yüksek homoloji göstermiştir<sup>27</sup>. Filogenetik analizler, *S.*

*subcrenata* ve *T. granosa*'dan elde edilen P-gp'nin aminoasit dizileri birbirine yakın homoloji gösterirken, *R. philippinarum*'dan elde edilen P-gp dizileri, *S. subcrenata* ve *T. granosa*'dan gelen homologlara kıyasla, daha uzaktan ilişkili görülmektedir. *Aplysia* California'dan gelen homologlara daha benzer olduğu görüldü ve bu da çift kabuklu midyelerin P-gp'nin farklı paraloglara sahip olabileceğini düşündürmüştür. Ancak tespit edilen tüm dokularda ekspresyon edilen P-glikoprotein aralarında büyük farklılıklar bulunduğu görülmüştür. Canlılar, *P. lima*'ya maruz kaldıktan sonra, aynı tür içinde ve farklı türler arasında P-gp ekspresyonu incelendiğinde dokularda farklı derecelerde değişkenlik göstermiştir, ancak mRNA ve protein seviyesindeki değişiklikler her zaman senkronize değildir<sup>27</sup>.

Çift kabuklu deniz canlılarında, MXR akış taşıyıcıları, geniş spektrumlu bir fizyolojik savunma sistemi oluşturmaktadır. Ayrıca çift kabuklu deniz canlılarının, çevresel strese karşı en hassas aşamalarını temsil eden farklı MXR taşıyıcılarının embriyolarda sahip olabileceği tür ve görevleri hakkında da araştırmalar devam etmektedir<sup>42,43</sup>.

Bu konudaki bilgiyi artırmak adına yapılan bir çalışmada, *Mytilus galloprovincialis*'un erken gelişim evrelerinde MXR taşıyıcılarının düzenlenmesi araştırılmıştır. Döllenen yumurtalardan (döllenen 30 dakika sonra) tam gelişmiş D-şekli veligerlere (48h) kadar embriyo gelişimini takip etmek için doğal olarak yumurtlayan anaçlardan gametler kullanılarak in vitro fertilizasyon deneyleri yapılmıştır. Nicel PCR analizleri, sırasıyla MXR ile ilgili taşıyıcılar P-gp ve MRP kodlayan ABCB ve ABCC transkriptlerinin, ABCC'nin ABCB'den döllenmeden hemen sonra daha fazla ekspresyon edilmiş ve her iki transkriptin Trochophorae ve D-veligerlerde kopya sayılarında artış görülmüştür. Floresan substrat Rodamin ve seçici P-gp veya MRP inhibitörleri kullanılarak değerlendirilen MXR akış aktivitesi, P-gp aracılı akışın yalnızca D-veligerlerde tespit edildiğini gösterirken, 30 dakika p'den sonra MRP aracılı dışa akış tespit

edilmiş ve Trochophorae ve D-veligerlerde ise hemen hemen değişim görülmemiştir. Propranolol ve karbamazepin ile MXR modülasyonu, farmasötiklerin transkripsiyonel düzenleyiciler ve substratlar olarak hareket edebileceğini göstermiştir. Tespit edilen sonuçlara bakıldığında, P-gp'nin belirgin bir koruyucu rol oynayan ksenobiyotik akışa yardımcı olurken, MRP'nin midye gelişiminde hem koruyucu hem de fizyolojik işlevleri yerine getiren çift işlevli bir taşıyıcı olabileceği hipotezine yol açmıştır<sup>43</sup>.

Ülkemizde de olduğu gibi dünya genelinde sorun olarak kabul edilen deniz ve tatlı sularda biriken plastik ve mikroplastik kirliliğinde gün geçtikçe artış görülmekle birlikte canlıların yaşam alanlarında tehdit oluşturmaktadır. Organizmaların başta sindirim sistemlerinde daha uzun süre tutulması ve toksisiteye neden olması ciddi sorunları beraberinde getirmektedir<sup>44</sup>.

İtalya'da yapılan bir çalışma ile Akdeniz midyesinde normal embriyo gelişim dönemi içerisinde stiren maddesinin etkisine bakılmıştır. Döllenen yumurtalar geniş bir alanda stirene maruz bırakılmıştır. Normal D-veligerlerin oluşumunda toplamın %40'ına kadar önemli ölçüde azalma görülmüştür. Stiren varlığında yetiştirilen D-veligerler de (0.1 ve 10 µg/L), toplam MXR akış aktivitesinin de önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir. P-glikoprotein (ABCB) ve MRP'yi (ABCC) kodlayan genlerin transkripsiyonel ekspresyon ile ilgili, embriyonal MXR sisteminin iki ana ABC taşıyıcısı olarak bilinmektedir ve sonuçlara bakıldığında; ABCB transkripsiyonunun stirenden etkilenmediği görülmüştür. Genel olarak, sonuçlar incelendiğinde; stirenin gen transkripsiyonunun düzensizliği yoluyla midye erken gelişimini etkileyebileceğini düşünülmektedir. Ayrıca, koruyucu sistemler üzerinde öngörülemez etkiler (örn MXR aracılı aktif akışın değiştirilmesi) ve kabuk süreçlerinde biyogenez gözlenmiştir<sup>42</sup>.

Suda yaşayan omurgasızların tümör hücrelerinde çoklu ilaca direnci ile aynı olan multiksenobiyotik direnç mekanizması ATP'ye bağımlı membran P-glikoprotein pompasının varlığı tarafından doğrulanmıştır<sup>25</sup>.

### Tatlı Su Midyelerinde P-Glikoprotein ile İlgili Çalışmalar

MDR/MXR mekanizmalarının keşfedilmesiyle tatlı su midyelerinin solungaç dokusundaki P-gp ekspresyonunun veya aktivitesinin belirlenmesine yönelik araştırmalara ağırlık verilmiştir. Yapılan birçok çalışma, çeşitli deniz ve tatlı su çift kabuklu türlerinin solungaçlarında P-gp'nin varlığını ve taşıma aktivitesini doğrulamıştır<sup>45</sup>.

Yetişkin midyelerin embriyolarında ve solungaç dokusunda yapılan çalışmalar, hücrel akış taşıyıcısı olarak kopyalanan ve aktif olan zebra midyesinden abcc/Abcc homolog dizisi tanımlanmıştır. Memeli ABCC taşıyıcılarının inhibitörü olan MK571, yüksek kalsein floresansı ile gösterildiğinde larva ve solungaç dokusunda kalsein-am akışını bloke etmektedir bu durum larva ve solungaç hücrelerinde aktif Abcc proteininin varlığını göstermektedir. Kimyasal stresörler olarak tercih edilen dacthal ve civa, midye larvalarında hem abcb1 hem de abcc mRNA'larının ekspresyonunu indüklemiş; kalsein-am ve ABCB1 inhibitörü reversin 205 ve ABCC inhibitörü MK571 ile yapılan testler, gelişmiş Abcb1 ve Abcc akış aktivitelerini göstermiştir. Solungaçlarda kimyasallara verilen tepkiler farklılık göstermektedir. Aynı zamanda abcb1 ekspresyonu dacthal ve civanın etkisiyle artmıştır, abcc mRNA ise sadece civanın etkisiyle artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, abcb1/Abcb1 ve abcc/Abcc taşıyıcılarının zebra midyesinin larva ve yetişkin aşamalarında eksprese edildiğini ve aktif olduğunu göstermektedir. Her iki genin ekspresyonu, hücrel stres yanıtı olarak indüklenmektedir, fakat regülasyon yetişkin aşamalarının larva ve dokusunda farklılık göstermektedir<sup>24</sup>.

Tatlı su midyesi *Unio pictorum* ile yapılan bir çalışmada MXR aktivitesinin belirlenmesi için P-gp substratı olan Rodamin B'nin (RB) hemolenf, plazma ve hemositlerinde birikim oranı değerlendirilmiştir. Hemolenfte P-gp aracılı MXR taşıma aktivitesinin belirlenmesinde önemli olduğu görülmüştür<sup>45</sup>.

Çift kabuklu yumuşakçalarda bulunan açık dolaşım sistemi sayesinde vücut dokularının sürekli olarak hemolenfte yıkandığı ve hemolenfteki P-gp substratlarının miktarının, tek başına solungaçlardan (sindirim bezi, manto, gonadlar ve kaslar) daha fazla dokuda bulunan MXR taşıma proteinlerinin aktivitesinin kümülatif bir sonucu olabileceği anlamına gelmektedir<sup>45</sup>.

Çeşitli tatlı su midyelerinde (*Dreissena polymorpha*, *Viviparus viviparus*, *Anodonta* taşığne) ölçülen bazal MXR aktivitesi incelenerek doğrudan karşılaştırması yapılmıştır. MXR aktivitesinin bazal seviyesinin değerlendirilmesi ve miktarının belirlenmesi için birincil kriter, floresan model MXR substratlarının (Rodamin B veya Rodamin 123) solungaçlarda birikmesi veya dışarı akışı arasındaki oran (R), model MXR inhibitörleri verapamil veya siklosporin A ölçülerek incelenen türlerde farklı MXR aktivitesi seviyeleri bulunmuştur<sup>26</sup>.

Tatlı su midyesi *Corbicula fluminea*'nın 15 gün farklı seviyelerde kadmiyuma (15-60 g l-1) maruz bırakılması sonucunda yapılan çalışmada ise MXR protein seviyelerinde zamanla artış görülmüştür<sup>46</sup>.

Göllerde ve nehirlerde siyanobakterilerle birlikte yaşayan tatlı su midyesi *Dreissena polymorpha* ile yapılan bir çalışmada ise, üç gün 100 µg L(-1) mikrosistin-LR'ye (MC-LR) maruz bırakılmıştır. Midye dokularında MC-LR konsantrasyonu, alım ve depurasyon fazı sırasında HPLC-PDA ile ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde metabolize olmayan toksinin ani, sürekli alımını, salınımını ve yeniden birleşme oluşumunu ortaya çıkarmıştır. P-gp MC-LR'nin atılımına dahil olması, P-gp gen ekspresyonunun yanı sıra rodamin testinin akış ve birikim mekanizmasıyla kanıtlanmıştır<sup>47</sup>.

### SONUÇ

Deniz ve tatlı suda yaşayan çift kabuklu organizmalarda P-gp ekspresyonunun belirlenmesine yönelik yapılan araştırmalar,

organik kirliliğe bir yanıt olarak MXR mekanizmasının indüksiyon olasılığını belirtmiştir. P-gp ile ilgili yapılan çalışmalar geniş spektrumlu bir fizyolojik savunma mekanizmasını ortaya koyabileceği hakkında bilgi vermektedir. Yapılan çalışmalarda, P-gp indüksiyonunun substrata özgü olmadığını ve spesifik bileşiklere maruziyeti değerlendirmek için doğrudan kullanılamayacağı görülmektedir. MXR'nin ilgili bir biyobelirteç olarak kullanılması için P-gp taşıma aktivitesinin DNA, mRNA ve/veya protein ekspresyonunun belirlenmesi ile birlikte ölçülerek değerlendirilmesi uygun olabileceği vurgulanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152-162. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7
- Mollazadeh S, Sahebkar A, Hadizadeh F, Behravan J, Arabzadeh S. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sci*. 2018;214:118-123. doi:10.1016/j.lfs.2018.10.048
- Kara ZP, Öztürk N, Öztürk D, Okyar A., ABC taşıyıcı proteinleri: Sirkadiyan ritimler ve cinsiyete bağlı farklılıklar. *Clinical and Experimental Health Sciences*. 2014; 3(1): 1-13. doi:10.5455/musbed.20130306115105
- Kaplan YC, Gelal A., Farmakokinetik ve Toksikokinetikte P-Glikoprotein'in Rolü. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci*. 2006;2(46):33-8.
- Leopoldo M, Nardulli P, Contino M, Leonetti F, Luurtsema G, Colabufo NA. An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011-2018). *Expert Opin Ther Pat*. 2019;29(6):455-461. doi:10.1080/13543776.2019.1618273.
- Ünüböl Aypak S.İnci A., Başarısız Tedavinin Olası Sorumlusu: P Glikoproteinler, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bozok Tıp Derg 2017;7(3):81-8
- Terasaki T, Ohtsuki S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx*. 2005;2(1):63-72. doi:10.1602/neurorx.2.1.63
- Breier A, Gibalova L, Seres M, Barancik M, Sulova Z. (2013), New Insight into P-Glycoprotein as a Drug Target. *Anticancer Agents Med Chem*.,13(1):159-70. PMID: 22931413.
- Chen C, Klaassen CD. Rat multidrug resistance protein 4 (Mrp4, Abcc4): molecular cloning, organ distribution, postnatal renal expression, and chemical inducibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(1):46-53. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.014.
- Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, et al. Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sci*. 2006;79(5):455-461. doi:10.1016/j.lfs.2006.01.024.
- Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(1):59-98. doi:10.2165/00003088-200342010-00003
- Lopez D, Martinez-Luis S. Marine natural products with P-glycoprotein inhibitor properties. *Mar Drugs*. 2014;12(1):525-546. Published 2014 Jan 22. doi:10.3390/md12010525.
- Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol*. 1997;8(3):161-170. doi:10.1006/scbi.1997.0068
- Dewanjee S, Dua TK, Bhattacharjee N, et al. Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition. *Molecules*. 2017;22(6):871. Published 2017 May 25. doi:10.3390/molecules22060871
- Mora Lagares L, Pérez-Castillo Y, Minovski N, Novič M. Structure-Function Relationships in the Human P-Glycoprotein (ABCB1): Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):362. Published 2021 Dec 29. doi:10.3390/ijms23010362
- Balayssac D, Authier N, Cayre A, Coudore F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions?. *Toxicol Lett*. 2005;156(3):319-329. doi:10.1016/j.toxlet.2004.12.008
- Clarke G, O'Mahony SM, Cryan JF, Dinan TG. Verapamil in treatment resistant depression: a role for the P-glycoprotein transporter?. *Hum Psychopharmacol*. 2009;24(3):217-223. doi:10.1002/hup.1008
- Çetin G, Traş B. İlaç Davranışında P-glikoprotein'in Rolü. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*. 2011;2(3):196-204.
- Roninson IB. The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 1992;43(1):95-102. doi:10.1016/0006-2952(92)90666-7
- FAO (2018). The European market for mussels. <http://www.fao.org/in-action/globefish/fishery-information/resourcedetail/en/c/338588>, Erişim tarihi: 06.04.2022

21. Kayhan F. E. , Sesal N. C. , Güldür S. Kara Midye'lerin (*Mytilus galloprovincialis*) Gram-Negatif Bakteri Florasının Tespiti. MFBDD. 2016; 28(2): 66-69. <https://doi.org/10.7240/mufbed.79713>
22. Güngörür M.N., Mol S., Bir Gıda olarak Midye. Aydın Gastronomy, 2019;3(2), 119-127. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/aydingas/issue/47369/597598>
23. Tosun Ş.Y., Üçok Alakvuk D., Ulusoy, Ş. 'Quality Changes of Thermal Pasteurized Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) During Refrigerated Storage at 4±1°C' .Aquatic Sciences and Engineering 33 (2018): 117-123 doi: 10.26650/ASE2018428669
24. Navarro A, Weißbach S, Faria M, Barata C, Piña B, Luckenbach T. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. Aquat Toxicol. 2012;122-123:144-152. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.008
25. Smital T, Kurelec B. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. Mutat Res. 1998;399(1):43-53. doi:10.1016/s0027-5107(97)00265-0
26. Smital T, Sauerborn R, Pivcević B, Krea S, Kurelec B. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2000;126(2):175-186. doi:10.1016/s0742-8413(00)00110-9
27. Huang L, Liu SL, Zheng JW, Li HY, Liu JS, Yang WD. P-glycoprotein and its inducible expression in three bivalve species after exposure to *Prorocentrum lima*. Aquat Toxicol. 2015;169:123-132. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.012
28. Franzellitti S, Capolupo M, Wathsala RHGR, Valbonesi P, Fabbri E. The Multixenobiotic resistance system as a possible protective response triggered by microplastic ingestion in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*): Larvae and adult stages. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2019;219:50-58. doi:10.1016/j.cbpc.2019.02.005
29. Luckenbach T, Epel D. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;294(6):R1919-R1929. doi:10.1152/ajpregu.00563.2007
30. Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JH. Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). Oncologist. 2007;12(8):927-941. doi:10.1634/theoncologist.12-8-927
31. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. Trends Pharmacol Sci. 2004;25(8):423-429. doi:10.1016/j.tips.2004.06.002
32. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Adv Drug Deliv Rev. 2003;55(1):3-29. doi:10.1016/s0169-409x(02)00169-2
33. Padowski JM, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. Methods Mol Biol. 2010;596:359-384. doi:10.1007/978-1-60761-416-6\_16
34. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. Xenobiotica. 2008;38(7-8):802-832. doi:10.1080/00498250701867889
35. Martínez-Escariáza R, Lozano V, Pérez-Parallé ML, Blanco J, Sánchez JL, Pazos AJ. Expression Analyses of Genes Related to Multixenobiotic Resistance in *Mytilus galloprovincialis* after Exposure to Okadaic Acid-Producing *Dinophysis acuminata*. Toxins (Basel). 2021;13(9):614. Published 2021 Sep 1. doi:10.3390/toxins13090614
36. Svensson S, Särmgren A, Förlin L. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). Aquat Toxicol. 2003;65(1):27-37. doi:10.1016/s0166-445x(03)00097-3
37. Smital T, Sauerborn R, Hackenberger BK. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Aquat Toxicol. 2003;65(4):443-465. doi:10.1016/s0166-445x(03)00175-9
38. Eufemia NA, Epel D. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. Aquat Toxicol. 2000;49(1-2):89-100. doi:10.1016/s0166-445x(99)00068-5
39. Steinert SA, Pickwell GV. Expression of heat shock protein and metallothionein in mussels exposed to heat stress and metal ion challenge. Mar Environ Res. 1988;24:211-214.
40. Franzellitti S, Prada F, Viarengo A, Fabbri E. Evaluating bivalve cytoprotective responses and their regulatory pathways in a climate change scenario. Sci Total Environ. 2020;720:137733. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137733
41. Minier, C., Moore, M.N. (1996), Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in



- mussel blood cells — effects of exposure to vincristine. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 142, 165–173.
42. Wathsala RHGR, Franzellitti S, Scaglione M, Fabbri E. Styrene impairs normal embryo development in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquat Toxicol.* 2018;201:58-65. doi:10.1016/j.aquatox.2018.05.026
  43. Franzellitti S, Striano T, Pretolani F, Fabbri E. Investigating appearance and regulation of the MXR phenotype in early embryo stages of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2017;199:1-10. doi:10.1016/j.cbpc.2016.11.004
  44. FAO (2016). The state of the worlds fisheries and aquaculture 4–10. Erişim tarihi: 09.04.2022
  45. Zaja R, Klobucar GI, Sauerborn Klobucar R, Hackenberger BK, Smital T. Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006;143(1):103-112. doi:10.1016/j.cbpc.2005.12.009
  46. Achard M, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat Toxicol.* 2004;67(4):347-357. doi:10.1016/j.aquatox.2004.01.014
  47. Valeska Contardo-Jara, Stephan Pflugmacher, Claudia Wiegand, Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins, *Toxicon* Volume 52, Issue 8, 2008, Pages 936-943, ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.09.005>.