



SAĞLIK BİLİMLERİ ALANINDA ULUSLARARASI AKADEMİK ÇALIŞMALAR VE TEORİK BİLGİLER-II

EDİTÖRLER

Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN
Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Öğr. Gör. Dr. Fatma KARAGÖZOĞLU



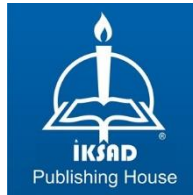
SAĞLIK BİLİMLERİ ALANINDA ULUSLARARASI AKADEMİK ÇALIŞMALAR VE TEORİK BİLGİLER-II

EDİTÖRLER

Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN
Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Öğr. Gör. Dr. Fatma KARAGÖZOĞLU

YAZARLAR

Prof. Dr. Funda KIRAL
Doç. Dr. Ahmet TOPAL
Doç. Dr. Serdar ALTUN
Doç. Dr. Harun ARSLAN
Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ
Doç. Dr. Sevinç AYDIN
Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Doç. Dr. Yakup ASLAN
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin ÜSTÜNDAĞ
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARTAL
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÇOBAN
Öğr. Gör. Mahmut ÇOBAN
Öğr. Gör. Dr. İlhan SABANCILAR
Arş.Gör.Nigar ABBAK
Arş.Gör.Dilek CANLAR AKAR
Veteriner Hekim.Bilgehan AKAR
Bilim Uzmanı Leyla GÜNDÜZ
Yüksek Lisans Öğrencisi Sedat BAYIK
Yüksek Lisans Öğrencisi Buşra ATALAY
Veteriner Fakültesi Lisans Öğren. Serra Nur ÖNDER



Copyright © 2023 by iksad publishing house

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by

any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of

brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social

Researches Publications®

(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)

TÜRKİYE TR: +90 342 606 06 75

USA: +1 631 685 0 853

E mail: iksadyayinevi@gmail.com

www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.

Iksad Publications – 2023©

ISBN: 978-625-367-359-8

Cover Design: İbrahim KAYA

October / 2023

Ankara / Türkiye

Size = 21x29,7 cm

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN, Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN,
Öğr. Gör.. Dr. Fatma KARAGÖZOĞLU.....1

BÖLÜM 1

ALZHEİMER HASTALIĞI ARAŞTIRMALARINDA MODEL ORGANİZMA OLARAK ZEBRA BALIĞI

Doç. Dr. Ahmet TOPAL.....3

BÖLÜM 2

PESTİSİTLERİN DOĞRU VE GÜVENLİ KULLANIMI

Doç. Dr. Serdar ALTUN
Doç. Dr. Harun ARSLAN.....11

BÖLÜM 3

TIBBİ BİTKİLERİN GEÇMİŞTEN GÜNÜMÜZE KULLANIMI ve KANSERİN

ÖNLENMESİNDE BİTKİSEL YAKLAŞIMLAR

Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÇOBAN
Öğr. Gör. Mahmut ÇOBAN21

BÖLÜM 4

KOBALT, TOKSİSİTESİ ve METABOLİK ETKİLERİ

Doç. Dr. Sevinç AYDIN.....41

BÖLÜM 5

ASPERGİLLUS ORYZAE B-GALAKTOZİDAZİN KARBOKSİLENMİŞ ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU

Doç. Dr. Yakup ASLAN
Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN
Yüksek Lisans Öğrencisi Seda BAYIK.....57

BÖLÜM 6

NEOCALLIMASTIX PATRICIARUM KSİLNAZİN KARBOKSİLE ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU

Doç. Dr. Yakup ASLAN
Yüksek Lisans Öğrencisi Buşra ATALAY83

BÖLÜM 7

BÖBREK YAPISI VE FİZYOLOJİSİ

Arş. Gör. Nigar ABBAK.....109

BÖLÜM 8

CLAUSTRUM

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARTAL
Dr. Yasemin ÜSTÜNDAĞ.....125

BÖLÜM 9

DOĞAL BALIN BİYOLOJİK BİLEŞENLERİNİN ANTİKANSER ve ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Öğr. Gör. Dr. İlhan SABANCILAR.....141

BÖLÜM 10

KANSERLE MÜCADELEDE SÜLFORAFAN

Prof. Dr. Funda KIRAL

Arş. Gör. Dilek CANLAR AKAR.....151

BÖLÜM 11

AKT ve KANSER

Veteriner Hekim Bilgehan AKAR165

BÖLÜM 12

PARAZİTER HASTALIKLARDA KULLANILAN İLAÇLARDAKİ DİRENÇ SORUNU

Bilim Uzmanı Leyla GÜNDÜZ191

BÖLÜM 13

KEDİLERİN DAVRANIŞ VE PSİKOLOJİSİ

Veteriner Fakültesi Lisans Öğr.Serra Nur ÖNDER.....199

ÖN SÖZ

Değerli okurlarımız,

Sunulan bu kitap, sağlık bilimleri alanında çeşitli akademik çalışmalar ve teorik bilgileri ele alarak farklı eserlerin bir araya gelmesi ile bu alana farklı bir ışık tutan değerli eserlerden oluşmuştur. Bu kitabımızda; Alzheimer Hastalığı Araştırmalarında Model Organizma Olarak Zebra Balığı, Pestisitlerin Doğru Ve Güvenli Kullanımı, Tıbbi Bitkilerin Geçmişten Günümüze Kullanımı Ve Kanserin Önlenmesinde Bitkisel Yaklaşımlar, Kobalt, Toksititesi Ve Metabolik Etkileri, *Aspergillus Oryzae* B-Galaktozidazın Karboksillenmiş Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler İle İmmobilizasyonu, *Neocallimastix Patriciarum* Ksilanazın Karboksile Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler İle İmmobilizasyonu, Böbrek Yapısı Ve Fizyolojisi, Claustum, Doğal Balın Biyolojik Bileşenlerinin Antikanser Ve Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi, Kansere Mücadelede Sülfurafan, AKT ve Kansere, Paraziter Hastalıklarda Kullanılan İlaçlardaki Direnç Sorunu, Kedilerin Davranış Ve Psikolojisi" **Sağlık Bilimleri Alanında Uluslararası Akademik Çalışmalar Ve Teorik Bilgiler II**" isimli yeni bir kitap ile karşınızdayız. Herbiri alanında uzman değerli yazarlarımıza ve kitabın yayımlanmasında emeklerinden ötürü IKSAD yayınına teşekkür ederiz. Kitabımızı siz değerli okurlarımızla paylaşmaktan onur duyuyoruz.

EDİTÖRLER

Doç. Dr. H.Turan AKKOYUN,

Doç.Dr.Mahire BAYRAMOĞLU

AKKOYUN,

Öğr.Görv.Dr. Fatma KARAGÖZOĞLU

BÖLÜM 1

**ALZHEİMER HASTALIĞI ARAŞTIRMALARINDA MODEL ORGANİZMA OLARAK
ZEBRA BALIĞI**

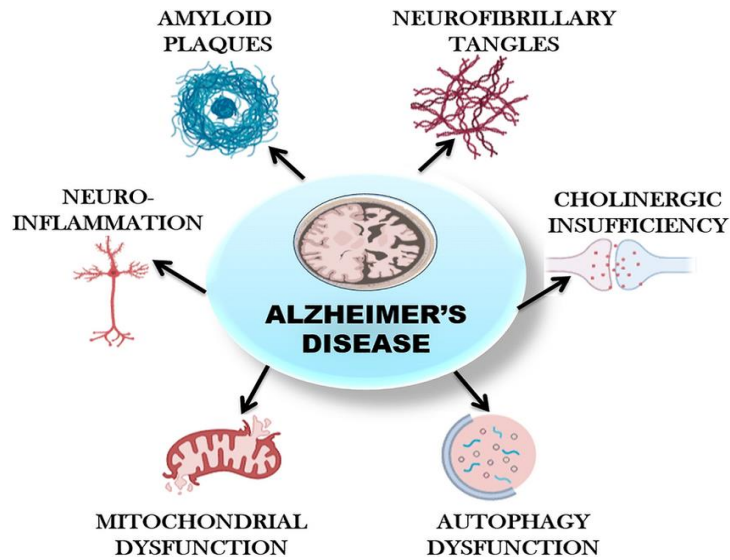
Doç. Dr. Ahmet TOPAL¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051735>

¹Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Erzurum, Türkiye. ahmet.topal@atauni.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-7484-2599

1.GİRİŞ

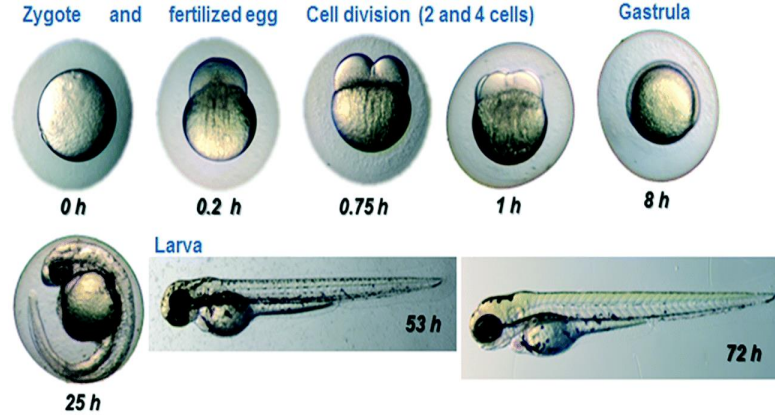
Dünya nüfusunun yaşam süresinin artmasıyla birlikte, bunama, alzheimer gibi yaşa bağlı nörodejeneratif bozukluklar hızlı bir şekilde artmaya başlamıştır. Demans ve alzheimer hastalığı, sadece hastalar ve aileleri üzerinde değil, aynı zamanda ekonomi üzerinde de sosyal bir yük olmaya devam etmektedir. ABD’de 2050 yılında Alzheimer hasta sayısının 13 milyon olacağı ve bunun yılda 1 trilyon dolara mal olacağı rapor edilmiştir (Caramillo ve Echevarria, 2017). Son incelemelere göre, her yıl dünya çapında yaklaşık 9,9 milyon insan bunama hastalığına yakalanmakta ve alzheimer hasta sayısının 2030 yılına kadar dünya çapında 78 milyona ulaşacağı ve 2050 yılına kadar 139 milyona çıkması beklenmektedir (World Health Organization, 2021). Alzheimer hastalığı, tüm demans vakalarının %70’inin geri döndürülemez ve önde gelen nedenidir. Bireyin yaşam tarzıyla ilişkili olan ve alzheimer hastalığını geliştirme olasılığını artırabilen çok sayıda risk faktörü vardır. Bunlar, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve obezite dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalık risk faktörleriyle önemli ölçüde örtüşmektedir. Hastalığın moleküler ve hücreler arası mekanizması tam olarak çözülmemiştir. Ancak hastalığın nasıl başladığını açıklamak için birçok hipotez öne sürülmüştür. Bunlardan bazıları hastalığı damar disfonksiyonuna, oksidatif strese, mitokondriyal disfonksiyon veya hipoksiye bağlamaktadır (Newman ve ark., 2014). Alzheimer hastalığı için ilaç geliştirilmesi zor olmasına rağmen, piyasada onaylı ilaçlar vardır. Bunlardan bazıları N-metil-d-aspartat reseptör blokleri ve asetilkolin esterase inhibitörleridir (Alzheimer’s Association, 2018). Alzheimer hastalığındaki demans, kayda değer, kalıcı ve ilerleyici bir hafıza kaybı, bilişsel bozulma ve kişilik değişikliklerini içermektedir. Amiloid plakların aşırı üretimi ve birikmesi ile hücre içi nörofibriller yumak oluşumu, alzheimer hastalığının iyi bilinen tanınal özellikleridir (Thawkar ve Kaur, 2021). Beyin parankimi ve serebral kan damarlarında hücre dışı amiloid plak birikintileri oluşur, bu durum kongofilik anjiyopati veya serebral amiloid anjiyopati olarak adlandırılır (Jäkel ve ark., 2021). Nörofibriller, sinaptik ve nöral kayba neden olan hiperfosforile tau proteinlerinin hücre içi, eşleştirilmiş sarmal filamentleridir. Alzheimer patolojisini gösteren beyin bölgeleri entorhinal serebral korteks ve hipokampüstür. Entorhinal korteks etkilendiği zaman hipokampus da etkilenir ve hastalarda hipokampusta şiddetli atrofi görüldüğü görüntüleme teknikleriyle doğrulanmıştır (Lindberg ve ark., 2012). Bu bölgeler arasındaki savunmasız nöronlar, korteks tabakasında, hipokampusun CA1 bölgesinde yer alır, çünkü bunlar yüksek düzeyde nörofibril göstermeye duyarlıdır ve ilk olarak hastalığın erken evrelerinde kaybedilirler. Nöronal kayıp, ağırlıklı olarak, sırasıyla düzensiz fosforile edilmiş tau proteini ve çözünmeyen beta amiloid proteinlerinin nöronal birikintilerinden kaynaklanmaktadır (Shenoy ve ark., 2022) (Şekil 1).



Şekil 1. Alzheimer hastalığı patofizyolojisi (Dhapola ve ark., 2021)

2. Alzheimer Hastalığında Zebra Balığı Modeli

Nörodejeneratif hastalıklar ve alzheimer çalışmalarında moleküler ve davranışsal patolojileri incelemek için model olarak kullanılan hayvan modelleri vardır. Zebra balığının (*Danio rerio*) nörodejeneratif hastalıkları incelemek için umut verici bir model olarak kullanılmaktadır. Zebra balığının bakımı ve barınmasının kolay olması, kısa yaşam döngüsü, embriyo ve larvaların şeffaf olması, insan genomuna olan benzerliği, ileri genetik ve embriyolojik açıdan görüntülemeye uygun olması farmakolojik, davranışsal ve patolojik değişikliklerin incelenmesinde, ilaç ve tedavi araştırmalarında pek çok avantajlar sunmaktadır (Postlethwait ve ark., 2000).



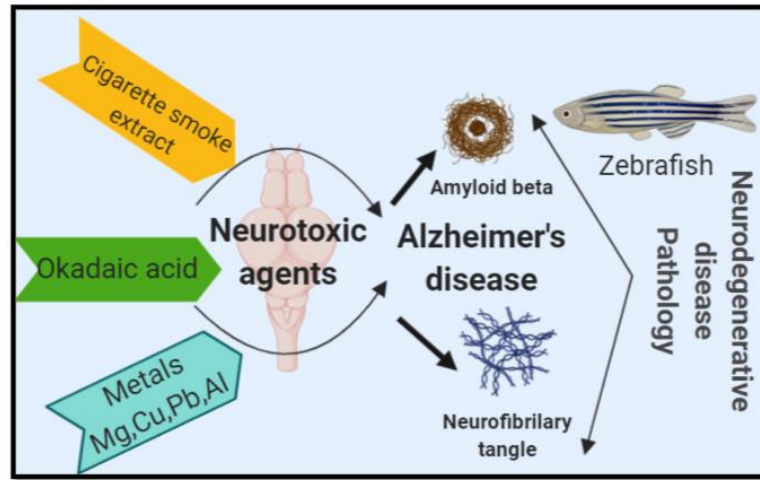
Şekil 2. Zebra balığı embriyo gelişimi (García-Camero et al., 2019)

Zebra balıklarının bir model olarak en avantajlı özellikleri, embriyonun optik berraklığıdır; bu da, gelişim süreci boyunca genlerin etkilerinin fenotipik olarak görselleştirilmesine ve genetik manipülasyonların ve kimyasal manipülasyonların kolaylığına izin vermektedir (Koster ve Sassen, 2015) (Şekil 2). Genel olarak, zebra balığı genlerinin nükleotit sekansı, insan genlerinininkiyle yaklaşık %70 homoloji gösterir ve insan hastalığıyla ilişkili olduğu bilinen genlerin %84'ünün zebra balıklarında karşılığı vardır (Kalueff ve ark., 2014). Zebra balığı, insanlarla ve diğer memelilerle karşılaştırılabilir bir beyin yapısına sahiptir. Zebra balığı beyinde yer alan yapılar, insanlarda görülenlerin doğrudan kopyaları olmasa da, karşılaştırılabilir yapılar vardır. Örneğin, zebra balığının bir hipokampusu olmamasına rağmen, insan hipokampusüne benzer şekilde hareket ettiğine inanılan lateral palyuma sahiptir (Caramillo ve Echevarria, 2017). Zebra balığı beyin yapısı, memeli beyne kıyasla yüksek bir korumaya sahiptir. Memeli ve zebra balığı beyinlerinde arka beyin, orta beyin ve ön beyin bölgeleri bulunur ve bu belirtilen bölgeler içinde, bunlarla sınırlı olmamak üzere, koku ampulleri, hipotalamus ve beyincik dahil olmak üzere benzer şekilde tanımlanmış birçok alan vardır (Kalueff ve ark., 2014). Zebra balığı kan beyin bariyeri yapı ve işlev bakımından memeli kan beyin bariyerine benzerdir ve yeni nöronal ilaçların kan beyin bariyeri geçirgenlikleri açısından değerlendirilmesine izin vermektedir. Zebra balığı ayrıca alzheimer hastalığında yer alan mikrotübülle ilişkili tau protein (MAPT, APOE, APP, PSEN1 ve PSEN2) olan ana genlere sahiptir (Tablo 1). Dopaminerjik, serotoninerjik, kolinerjik, glutamaterjik, glisinerjik ve γ -aminobütirik asit (GABA) gibi ana nörotransmitter sistemlerin tümü zebra balığı beyinde bulunur.

Tablo 1. Alzheimer hastalığında gerekli ortolog olan zebra balığı genleri (Newman ve ark., 2011).

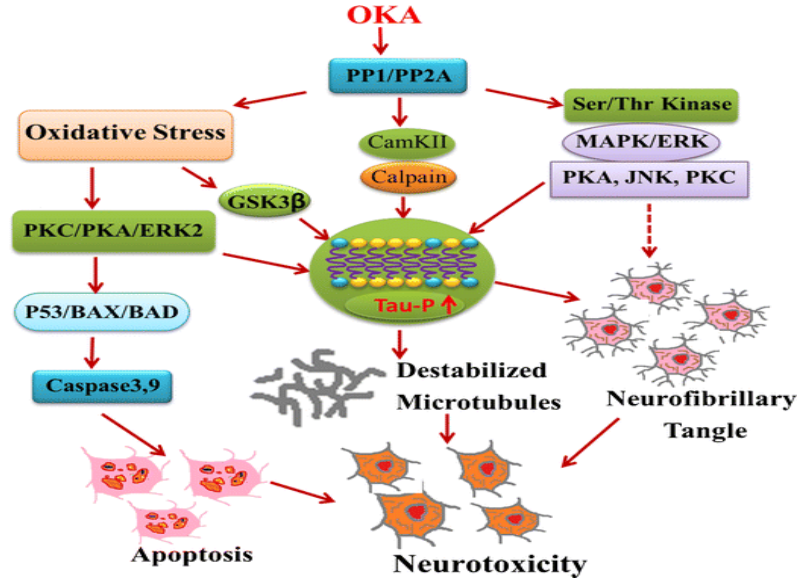
| | Zebra balığı ortolojisi | Erişim numarası |
|---|----------------------------|------------------------|
| Amyloid Precursor Protein (APP) | <i>appa</i> <i>appb</i> | NM_131564 NM_152886 |
| Presenilin 1 (PSEN1) | <i>psen1</i> | NM_131024 |
| Presenilin 2 (PSEN2) | <i>psen2</i> | NM_131514 |
| Apolipoprotein E (APOE) | <i>apoeb</i> | NM_131098 |
| Microtubule-Associated Protein Tau (MAPT) | <i>mapta</i> | N/A |
| Clusterin (CLU) | <i>Clu</i> | NM_200802 |
| Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein (PICALM) | <i>picalm</i> | NM_200927 |
| Nicastrin (NCT) | <i>ncstn</i> | NM_001009556 |
| Anterior Pharynx Defective 1 Homolog B (APH1b) | <i>aph1b</i> | NM_200115 |
| Presenilin Enhancer 2 (PSENEN) | <i>psenen</i> | NM_205576 |

Bilişsel çalışmalarda zebra balığı modelini kullanmak, öğrenme ve hafıza yollarını incelemek için çok önemlidir. Zebra balığının öğrenme ve hafıza yeteneğini test etmek için çeşitli bilişsel paradigmlar mevcuttur (Koehler ve Williams, 2018). Pek çok durum, zebra balığı beyinde öğrenme ve hafıza davranışı için gerekli olan nörotransmitterlerin, taşıyıcı proteinlerin ve enzimlerin varlığını desteklemektedir (Panula ve ark., 2006). Zebra balığı, skopolamin gibi maddelerle amiloid β enjeksiyonu ve transgenез, sayesinde, alzheimer hastalığı semptomlarını göstermektedirler. Zebra balıklarının amiloid β ve bununla ilişkili enzimlerden etkilenebileceği ve amiloid β 'nin sentezlendiği iki homolog (Appa ve Appb) gene sahip olduğu deneylerle gösterilmiştir (Zon ve Peterson, 2005; Caramillo ve Echevarria, 2017). Bu homolog genler, zebra balığı beyincik, lateral palyum, talamus ve optik tektumda eksprese olmaktadır (Caramillo ve Echevarria, 2017).

**Şekil 3.** Zebra balıklarında alzheimer modeli oluşturmak için kullanılan kimyasallar (Thawkar ve Kaur, 2021)

Antisens morfolino oligonükleotitlerin (MO) zebra balığı embriyolarına mikroenjeksiyon yoluyla alzheimer modeli oluşturulabilmektedir (Xi ve ark., 2011). Zebra balığı embriyolarına MO'ların eklenmesi, MO'ya özgü genleri yok eder ve bu durum araştırmacıların alzheimer ile ilgili belirli genleri hedeflemesine ve

böylece hastalığın zebra balığı modellerini oluşturmasına imkân tanır. Araştırmacılar, bu zebra balığı modellerinin oluşturulmasıyla, bireysel genlerin sadece alzheimer hastalığının patofizyolojisindeki rollerini değil, aynı zamanda biliş ve davranış üzerindeki etkilerini de daha fazla araştırabilmektedirler (Caramillo ve Echevarria, 2017). Toksik metaller, pestisitler, endüstriyel kimyasallar ve hava kirleticiler gibi çevresel kirleticiler alzheimer hastalığının gelişimine katkıda bulunduğu tespit edilmiş ve uzun süre bu kimyasallara maruz kalma sonucunda biyolojik olarak biriktiği ve nöroinflamasyona sebep olduğu rapor edilmiştir. İlaç geliştirme süreçlerinde, bu ajanların alzheimer hastalığı patofizyolojisini anlamak için faydalı olabileceği bildirilmiştir. Önemli nörotoksik ajanlar olan okadaik asit, bakır, kurşun, metaller, alüminyum ve manganez kullanılarak deney hayvanlarında alzheimer hastalığı modeli oluşturulabilmektedir (Thawkar ve Kaur, 2021) (Şekil 3). Okadaik asit, çeşitli hücre tipleri ve kemirgen modellerinde nörodejenerasyonu araştırmak ve zebra balıklarında alzheimer modeli oluşturmak için kullanılmıştır. Okadaik asit, protein fosfat 1 (PP1) ve protein fosfat 2A'nın (PP2A) seçici bir inhibitörüdür (Medina ve ark., 2013) (Şekil 4). Okadaik asit, yetişkin zebra balığına, çözelti içinde çözüldükten sonra doğrudan balık suyuna eklenmesiyle uygulanır. Okadaik asit uygulanan zebra balıklarının alzheimer hastalığında görülen patolojileri gösterdiği ve okadaik asitin bilişsel azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Nada ve ark., 2016) .



Şekil 4. Okadaik asitin etki mekanizması (Kamat et al., 2014)

3.KAYNAKÇA

- Alzheimer's Association (2018) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 14, 367-429.
- Caramillo, E.M., Echevarria, D.J. (2017). Alzheimer's disease in the zebrafish: where can we take it?. *Behavioural pharmacology*, 28(2 and 3-Spec Issue), 179-186. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000284>
- Dhapola, R., Hota, S.S., Sarma, P., Bhattacharyya, A., Medhi, B., Reddy, D.H. (2021). Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 29(6), 1669-1681. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00889-6>
- García-Camero, J.P., Beltrán, F.J., Encinas, A., Oropesa, A.L. (2019). The added value of a zebrafish embryo-larval model in the assessment of wastewater tertiary treatments. *Environ. Sci. (Camb.)* 5, 2269-2279.
- Jäkel, L., de Kort, A. M., Klijn, C. J. M., Schreuder, F. H. B. M., and Verbeek, M. M. (2021). Prevalence of cerebral amyloid angiopathy: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement.* 18, 10-28. doi: 10.1002/ALZ.12366
- Kalueff, A.V., Stewart, A.M., Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 35, 63-75.
- Kamat, P.K., Rai, S., Swarnkar, S., Shukla, R., Nath, C. (2014). Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application. *Molecular neurobiology*, 50(3), 852-865.
- Koehler, D., Williams, F. E. (2018). Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. *Neural regeneration research*, 13(9), 1538-1541. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.237111>
- Koster, R., Sassen, W.A. (2015). A molecular toolbox for genetic manipulation of zebrafish. *Adv. Genomics Genet.* 5, 151-163. doi: 10.2147/agg.s57585
- Lindberg, O., Walterfang, M., Looi, J.C., Malykhin, N., Ostberg, P., Zandbelt, B., Styner, M., Paniagua, B., Velakoulis, D., Orndahl, E., Wahlund, L.O. (2012). Hippocampal shape analysis in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration subtypes. *J Alzheimers Dis.* 30, 355-365.
- Medina, M., Avila, J., Villanueva, N. (2013). Use of okadaic acid to identify relevant phosphoepitopes in pathology: a focus on neurodegeneration. *Mar Drugs*, 11, 1656-1668.
- Nada, S.E., Williams, F.E., Shah, Z.A. (2016). Development of a novel and robust pharmacological model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease in zebrafish. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 15, 86-94
- Newman, M., Ebrahimie, E., Lardelli, M. (2014). Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in genetics*, 5, 189.
- Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., Kolehmainen, J., Torkko, V., Tiittula, A., Moshnyakov, M., & Podlasz, P. (2006). Modulatory neurotransmitter systems and behavior: Towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish*, 3, 235-247. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.3.235>
- Postlethwait, J.H., Woods, I.G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y.L., Kelly, P.D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A., ve Talbot, W.S. (2000). Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 10(12), 1890-902. <https://doi.org/10.1101/gr.164800>.
- Shenoy, A., Banerjee, M., Upadhyaya, A., Bagwe-Parab, S., Kaur, G. (2022). The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16, 861155. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.861155>
- Thawkar, B.S., Kaur, G. (2021). Zebrafish as a Promising Tool for Modeling Neurotoxin-Induced Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity research*, 39(3), 949-965. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00343-z>
- Xi, Y., Noble, S., Ekker, M. (2011). Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 11,

274-282.

World Health Organization (2021). Dementia [Online]. Available online at:<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accessed April23, 2022).

BÖLÜM 2

PESTİSİTLERİN DOĞRU VE GÜVENLİ KULLANIMI

Doç. Dr. Serdar ALTUN¹
Doç. Dr. Harun ARSLAN²

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051737>

¹Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji ABD/Erzurum, Türkiye. email: serdar.altun@atauni.edu.tr ORCID 1: 0000-0002-8735-7031

² Atatürk Üniversitesi, Sür Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler ABD/Erzurum, Türkiye. email: harunarslan@atauni.edu.tr ORCID 2: 0000-0002-5115-3467

1. Pestisit nedir

Pestisitler bazı zararlı böcek türü canlıları öldürmeye yönelik kullanılan kimyasal maddelerdir (Alengebawy ve ark., 2021; Houdart ve ark., 2009). Genel olarak pestisit, zararlıları türleri uzak tutan, çoğalmasını baskılayan ya da öldüren, antimikrobiyal veya dezenfektan gibi kimyasal veya biyolojik bir ajandır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) pestisiti şu şekilde tanımlamıştır: insan veya hayvan hastalıklarının yayılmasında rol alan, bitkisel veya hayvansal gıda üretim zinciri de dâhil olmak üzere, üretim, işleme, depolama, taşıma veya pazarlama sırasında kayba neden olan herhangi bir zararlıyı önlemek, yok etmek veya kontrol etmek amacıyla kullanılan herhangi bir madde veya madde karışımı(Sharma ve ark., 2019). Pestisitlerin özellikle tarım alanında mahsullere ve hayvanlara zarar verebilecek zararlı böcek türleri üzerine kullanımı, tüm Dünya’da o kadar yaygındır ki pestisit çiftçilik ile uğraşan halk arasında sıklıkla bitki koruma ürünü olarak bilinmekte ve değerlendirilmektedir. En yaygın olarak uygulanan pestisitler, zararlı böcekleri öldürmek için insektisitler, istenmeyen yabancı otları öldürmek için herbisitler, kemirgen türleri öldürmek için kemirgen öldürücüler ve küfe neden olan mantarları kontrol etmek için fungusitlerdir (Damalas ve Eleftherohorinos., 2011; Hamey., 2001).

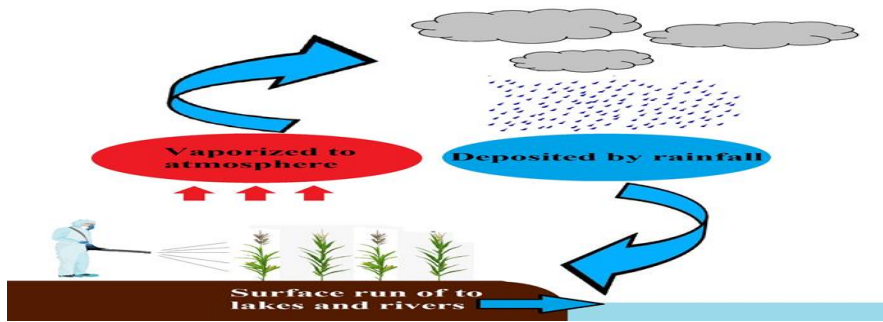
1.1.Pestisitler hedef canlıları nasıl öldürür

Kimyasal olarak pestisitler farklı gruplarda bulunurlar bunların birçoğu zararlı canlıların siniri sistemini hedef alarak onların ölümüne neden olurlar. Bu kimyasallardan olan organofosfatlar böcek ilacı olarak kullanılırlar; bir nörotransmitter maddeyi düzenleyen enzim yapısını etkileyip, sinir sistemini oluşturan nöronlar arası iletişimi bozarak etkilerler (Bertolote ve ark., 2006; Ye ve ark., 2013). Karbamat: Organofosforlu pestisitlere benzer şekilde karbamatlı pestisitler de asetilkolinesteraz adı verilen bir enzimi inhibe ederek sinir iletimini engellerler. Bu da böceklerin kas kasılmalarını kontrol edememelerine ve ölümüne yol açar. Ancak enzim etkileri genellikle geri dönüşümlüdür. Bazı kimyasallar, böceklerin yedikleri besinler aracılığıyla zehirlenmelerini sağlayabilirler. Böcekler ilacı yediklerinde veya emdiklerinde, ilaç onların iç organlarına yayılır ve ölüme yol açabilir. Organoklorlu böcek öldürücüler: Bu tip kimyasallar hem beşeri hem de tarımsal alanda daha önce yaygın olarak kullanılmaktaydı. Ancak, artık birçok ülkede, sağlık ve çevresel etkileri ve kalıcılıkları (örn. DDT, klordan ve toksafen) nedeniyle kullanımları yasaklandı. Piretroid: Bunlar krizantemlerde (Çiçek) bulunan, doğal olarak oluşan bir pestisit olan piretrin'in sentetik bir türevidir. Kullanıldıkları ortamda kimyasal olarak yapısal bozukluğa uğramayacak şekilde geliştirildiler. Maalesef bu yüzden kullanıldıkları yerde uzun süre kalıcı olarak kontaminasyona yol açarlar (Sun ve ark., 2006). Sülfonilüre herbisitler: Bu grup kimyasallar, piritiyobak-sodyum, siklosülfamuron, bispiribak-sodyum, terbasil, sülfometuron-metil Sülfosülfüron, rimsülfüron, pirazosülfüron-etil, imazosülfüron, nikosülfüron, oksasülfüron, nikosülfüron, flazasülfüron, primisülfüron-metil, halosülfür gibi yabancı ot kontrolü için kullanılmaktadır. Flupirsülfüron-metil-sodyum, etoksisülfüron, klorimuron-etil, bensülfüron-metil, azimsülfüron ve amidosülfüron. Biyopestisitler: Biyopestisitler hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve bazı mineraller gibi doğal malzemelerden elde edilen belirli türdeki pestisitlerdir (Sharma ve ark., 2019). Doğal ortamda birbirine rakip olan türlerin birbirlerine karşı salgılamış olduğu doğal enzim türevi maddelerdir. Bu maddeler böceklerin büyüme ve gelişmelerini engelleyen hormonlar veya büyüme düzenleyiciler içerebilir. Bu tür ilaçlar, böceklerin larva aşamasından ergin aşamasına geçişini engeller ve üremelerini durdurabilir (Dogan ve Karpuzcu., 2019).

1.2.Pestisitler hedef alınmayan canlılar nasıl etkiler

Tıpkı hedef alınan canlıların maruz kalma yolları gibi hedef alınmayan canlılar da benzer yollar ile bu kimyasallara maruz kalırlar. Tüm maruz kalmaların yüzde 95'inden fazlası deri yoluyla (Bertolote ve ark., 2006). Sıçrama, dökülme veya sürüklenme sonucu ya da ilaç tatbik etmek için kullanılan ekipman

temizlenirken veya onarılırken cilt yoluyla emilim meydana gelebilmektedir. Dermal maruziyeti büyük oranda ortadan kaldırmak için astarsız, kimyasallara dayanıklı eldivenler kullanımı gereklidir. Çoğu pestisit için minimum dermal koruma, uzun kollu bir gömlek, uzun pantolon, eldiven ve uygun ayakkabılardan oluşur. Ekstra önlem olarak tulum, su geçirmez şapka ve astarsız lastik çizme giyilmelidir. Ayrıca, konsantreleri karıştırırken ve dökerken ya da yüksek derecede toksik ürünler kullanırken sıvı geçirmez bir önlük veya yağmurluk giyilmesi önerilir. Diğer bir maruziyet yolu da solunum yoludur (Ye ve ark., 2013). Birçok toksik kimyasal için solunum sistemi, dolaşım sistemine akciğerler vasıtasıyla girişin en hızlı ve doğrudan yoludur. Solunum yollarının korunması özellikle pestisit tozları, tozlar, gazlar, buharlar veya küçük sprey damlacıklarının solunabileceği durumlarda oldukça önemlidir. Solunum yolunu korumak için kullanılan maskeler amaçlanan kullanım için tasarlandığı şekilde kullanılmalı ve daima üreticinin talimatlarına uyulmalıdır. Bu tarz ürünlerin kaliteli ve yetki belgesine sahip firmalardan satın alınması elzemdir. Maalesef bazen yanlışlıkla veya kazara ağız yoluyla maruz kalma, pestisitlerin orijinal kabından alınıp etiketlenmemiş bir şişeye veya yiyecek kabına konması durumunda sıklıkla meydana gelebilmektedir (Alengebawy ve ark., 2021). Ne yazık ki bu durumlarda en çok etkilenen kesim çocuklardır. Pestisitler sadece orijinal kaplarında saklanmalı ve asla farklı yiyecek ve içecek kaplarına aktarım yapılmamalıdır. Kabın üzerindeki içeriğin zehirli olduğuna dair simgeler taşıyan etiketi kabın üzerinden sökülmemeli ve bu haliyle bile asla çocukların ulaşabileceği yerlerde muhafaza edilmemelidir. Püskürtme hattını temizlemek veya pestisiti tank veya konteynirden sifonlamak için asla ağız kullanılmamalıdır. Pestisitlerle temas ettikten veya bunlarla çalıştıktan sonra, yemek yemeden, içmeden veya sigara içmeden önce eller ve yüz bol sabunlu su ile iyice yıkanmalıdır. Gözler birçok diğer kimyasal maddeye olduğu gibi pestisitlere karşı oldukça hassastır ve düşünüldüğünden daha büyük miktarda kimyasal maddeyi absorbe edebilirler. Sıçrama, püskürtülmeye maruziyet, dökülme veya sürüklenme veya kontamine eller veya giysilerle gözlerin ovulması ciddi göz maruziyetine neden olabilir. Özellikle kimyasallar seyreltilirken veya karıştırırken ve tozlarla uğraşırken pestisitlerin gözlere kaçma riski vardır. Bu gibi durumlarda sıkı oturan kimyasal sıçrama gözlükleri veya tam yüz siperliği kullanılmalıdır (Hamey., 2001).



Şekil 1. Pestisitlerin çevreye yayılımı

2.Risk Grubu

Pestisitler doğası gereği insanlar dâhil diğer organizmalar için potansiyel olarak toksiktir ve güvenli bir şekilde kullanılmaları ve uygun şekilde imha edilmeleri gerekir. Kendi kendine zehirlenmeden kaynaklanan ölümlerin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır (Kathleen ve ark., 2016). Genel nüfus, yiyecek ve içecek su yoluyla düşük seviyelerde olsa da pestisitlere maruz kalır ve bu tip düşük dozda maruz kalma genellikle endişe kaynağı değildir. Bu kanı yanlış olsa da genel kabul gören bir durumdur. Olumsuz sağlık etkilerine yakalanma riski daha yüksek olan kişiler, tarım işçileri gibi doğrudan pestisitlerle çalışanlar ve pestisitlerin uygulandığı bölgede bulunan kişilerdir (Schmolke ve ark., 2010; Sharma ve ark., 2019; Ye ve ark.,

2013). Pestisit uygulamasıyla ilgisi olmayan kişiler, kullanım sırasında ve kullanımdan hemen sonra bölgeden uzak durmalıdır.

3. Pestisit Kullanmaya nasıl karar verilmeli

Pestisit kullanmaya karar vermeden önce alternatif kontrol yöntemleri göz önüne alınmalıdır. Zararlı organizmaları kontrol etmek için daha çevre dostu ve sürdürülebilir alternatif yöntemlerin kullanılabilirliğini değerlendirmek önemlidir. Bu yöntemler arasında organik tarım uygulamaları, biyolojik mücadele, kültürel kontrol ve tuzaklama bulunabilir (Sun ve ark., 2018). Biyolojik böcek ilaçları, böcekleri doğal düşmanlar veya zararlı organizmalar (örneğin, avcı böcekler veya parazitler) aracılığıyla kontrol etmek için kullanılır. Bu tür ilaçlar, böcek popülasyonunu azaltabilir veya dengede tutabilir (Bertolote ve ark., 2006; Dogan ve Karpuzcu 2019; Weisner ve ark., 2021). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), pestisit kullanımının mümkün olduğunca azaltılmasını önermektedir. Öncelikle pestisit kullanımının son çare olarak gerçekte ne ölçüde gerekli olduğu belirlenmelidir. Alternatif yöntemlerin başarısız olduğuna emin olunmalıdır. Mümkün olduğunca kimyasal olmayan haşere yönetimleriyle sorunu çözenin yolları aranmalıdır. Pestisit kullanmaya mecbur kalırsa bile, kullanımı minimize etmek amaçlanmalı ve sadece gerekli olduğunda pestisit kullanımı seçeneği uygulanmalıdır. Aşırı pestisit kullanımının topraktaki mikroorganizmaları öldürdüğü, topraktaki biyolojik döngüyü bozduğu ve uzun vade de verimliliği negatif yönde etkilediği unutulmamalıdır (Kaliaa ve Gosalb., 2011; Jacobsen ve Hjelmsø., 2014; Houdart ve ark., 2009). Diklorodifeniltrikloroetan (DDT) ve linden gibi pestisitlerin çoğu toprakta ve suda yıllarca kimyasal yapısı bozulmadan kalabildiği bilinmektedir. Bunların ekosistemin daha büyük kısımları üzerinde olumsuz etkileri vardır ve besin zincirinde birikebilirler. Bu nedenle bu kimyasalların kullanımı 2001 Stockholm sözleşmesini imzalayan ülkeler tarafından yasaklanmıştır (Foster ve ark., 1991). Eğer bir bölge tarım ürünleri veya bahçe bitkileri için zararlı organizmaların istilasına uğradıysa, bu organizmalar sürekli çoğalma eğiliminde ve kontrol edilmesi ürün kaybını engelliyorsa, pestisit kullanımı gerekebilir. Hangi tür böcekler kontrol altına alınmak istendiği belirlenmeli. Hedef organizmanın türüne ve büyüklüğüne göre uygun bir pestisit seçilmelidir. Bu iş karmaşıksa veya tehlikeli organizmaları kontrol etmek gerekiyorsa, bir uzmana danışılmalı ve profesyonel kontrol hizmetlerinden yardım alınmalıdır. Bu gibi durumlarda insan sağlığına ve çevreye en az risk taşıyan ürünler tercih edilmelidir. Ayrıca, kullanılan pestisitlerin doğru şekilde depolanması, taşınması ve uygulanması gereklidir. Pestisit uygulamanın nasıl yapılacağı işleminde ve kişisel güvenlik açısından üreticinin talimatlarına harfiyen uyulmalıdır. Pestisit uygulayan kişilerin koruyucu donanım kullanması pestisitle doğrudan teması önlemek ve kullanım ve uygulama sırasında maruz kalmayı en aza indirmek için uygundur. Pestisiti doğru şekilde uygulamaya özen gösterilmelidir. Bu, püskürtme, tozlama, jel veya tuzaklar gibi farklı teknikleri içerebilir. Pestisiti doğru yerlere ve sınırlı uygulanmalıdır. Örneğin, ev içi böcek kontrolünde kullanıldığında, böceklerin sıklıkla görüldüğü bölgelere uygulanmalıdır (Hamey., 2001). Pestisit uygulamasından sonra, uygulama alanına çocuklar veya evcil hayvanlar asla sokulmamalıdır. Uygulama esansında veya sonrasında bu uygulama bölgeleri ile gıda temasını tamamen engellenmelidir. Kullanılmayan pestisitleri güvenli bir şekilde saklanmalı ve yerel yönetmeliklere uygun şekilde imha edilmelidir.

4. Pestisit Zehirlenmesinin Akut ve Kronik Etkileri

Pestisit zehirlenmesinin belirtileri hafif cilt tahrişinden kaynaklı reaksiyonlardan komaya ve hatta ölüme kadar değişebilir. Maruz kalınan farklı kimyasal sınıfları veya aileleri farklı türde semptomlara neden olmaktadır. Bununla birlikte bireylerin özel bazı sağlık durumları dolayısıyla bu kimyasalların farklı seviyelerine karşı hassasiyetleri de farklılık gösterir. Bireysel sağlık durumlarındaki farklılıklar dolayısıyla bazı insanlar, diğerlerinde ciddi sağlık sorunlarına neden olabilecek bir maruziyete tepki göstermeyebilir. Potansiyel sağlık sorunları oluşturabilmesi nedeniyle, pestisit kullanıcıları ve uygulayıcılarının pestisit

zehirlenmesinin ortak belirti ve semptomları hakkında bilgi sahibi olması gerekir (Hamey., 2001). Pestisit zehirlenmesinin belirtileri veya semptomları genel olarak topikal veya sistemik olarak iki ana başlık altında tanımlanabilir. Ancak, bu semptomların oluşumunda kimyasala maruz kalma süresi ve dozu çok önemlidir. Kısa süreli akut maruziyette düşük konsantrasyonla bile sağlık etkisinin ortaya çıkması irritasyon, dermatit, ölüm gibi sonuçlar doğurabilir (Eddleston ve ark.,2008). Uzun süreli düşük dozda kümülatif maruziyet sonucunda görülen kronik toksisite sonucu kanser, karaciğer hasarı, üreme bozuklukları, merkezi sinir sistemi hastalıkları, alerjik semptomlar gibi değişiklikler göstermesinde önemlidir (Bertolote ve ark., 2006).Topikal etkiler genellikle pestisitlerin temas ettiği yerde lokal yani bölgesel olarak gelişir ve pestisitlerin tahriş edici özelliklerinin veya maruz kalan kişinin alerjik reaksiyon göstermesinin bir sonucudur. Pestisitlere maruz kalan kişilerde dermatit veya deri iltihabı, en sık rapor edilen topikal etki olarak kabul edilmektedir. Dermatit belirtileri cildin kızarmasından ürtiker benzeri oluşumlara, döküntülere ve/veya kabarcıklara kadar değişir. Bazı kişiler pestisitler inhalasyon yoluyla sıklıkla spreylerine maruz kaldıklarında öksürme, hırıltılı solunum veya hapsirme eğilimi gösterirler. Yine görülen belirtiler arasında gözlerin, burnun mukoza zarlarının ve hatta ağzın ve boğazın arkasındaki hassas yüzeylerin kaşınmasıdır. Bu tarz akut maruziyet sonucu görülen semptomlar genellikle kişi tahriş edici maddeye maruz kalmaktan kurtulduktan sonra birkaç dakika içinde azalır (Kim ve ark., 2017). Bununla birlikte, bir pestisit ürününe karşı kişinin yalnızca hapsirmesine ve öksürmesine değil, aynı zamanda ciddi akut solunum yolu semptomları geliştirmesine de neden olan reaksiyonun, gerçek bir aşırı duyarlılık veya alerjik reaksiyon olması daha olasıdır. Gerçek bir alerjik reaksiyonun belirtileri, gözlerde ve ciltte kızarıklık ve kaşıntıdan, genellikle astım hastalığına benzeyen solunum rahatsızlığına kadar uzanır (Ye ve ark., 2013). Sistemik etkiler topikal etkilerden oldukça farklıdır. Pestisitlerin vücut tarafından emilmesi ve dağıtılmasının bir sonucu olarak genellikle orijinal temas noktasından uzakta meydana gelirler. Sistemik etkiler genellikle bulantı, kusma, yorgunluk, baş ağrısı ve bağırsak bozukluklarını içerir. İlerlemiş zehirlenme vakalarında kişide kalp atışlarında değişiklikler, nefes almada zorluk, kasılmalar ve koma gibi ölümle sonuçlanabilecek değişiklikler görülebilir (Kwok., 2021).Pestisitlerin kronik etkileri tekrarlı, kümülatif maruziyet sonucu meydana gelir. Genellikle tarım çalışanları ve yakınında yaşayan insanlar ve bu insanların çocukları daha yüksek risk altındadırlar (Eddleston ve ark., 2008). Kronik maruziyet sonucu bildirilen hastalıkları arasında sıklıkla dermatolojik, kanser ve üreme sistemi üzerindeki etkileri dolayısıyla oluşur. Pestisitlerle ilişkili hastalıkların yarısına yakını kanser (karaciğer, testis, beyin, akciğer, prostat, pankreas, böbrek, tiroid ve meme). Herbisitlere maruziyet ile ilişkili bildirilen vakalarda lösemi, multiple myeloma. Gebe kadınlarda doğum anomalileri, özellikle ilk üç aylık periyotta ekstremitelerde eksikliği sıklığının arttığı bildirilmiştir (Pascale ve Laborde., 2020). Bağışıklık sisteminin vücutta zarar verme potansiyeline sahip yabancı antijenleri tanıma ve ona karşı yangısal reaksiyon geliştirme özelliği mevcuttur. Bazen bağışıklık sistemi yanlışlıkla vücuttaki normal sağlıklı hücreleri yabancı antijen gibi algılayarak ona karşı reaksiyon geliştirip saldırır bu duruma otoimmünite adı verilir. Bu hastalık prognoz olarak oldukça ağır seyirli bir hastalıktır. Yapılan araştırmalarda bazı organoklorlu böcek ilacı türevleri, erkek çiftçilerde otoimmünite gelişme riskini artırdığı ortaya konulmuştur (Eddleston ve ark., 2008). Yine yapılan başka bir çalışmada, pestisit uygulayıcısı olan çiftçiler inceledi ve bir tür otoimmün inflamatuvar hastalık olan romatoid artrit ile bağlantılı olabileceği sonucuna varılmıştır (Armando ve ark., 2017). Pestisit kullanımına ilişkin kapsamlı bir çalışmada, böbrek kanserinin en yaygın türü olan renal hücreli karsinom ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Dört herbisit (2,4,5-T, atrazin, siyanazin ve parakuat) ve iki böcek ilacı (klorpirifos ve klordan) bu kanser türü ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Karami ve ark., 2008). İlgili bir çalışma, yaygın olarak kullanılan iki herbisit, pendimetalin ve Konu ile ilgili farklı bir çalışmada atrazinin, erkek pestisit uygulayıcıları arasında böbrek fonksiyonlarının bozulmasıyla da ilişkili olabileceğini öne sürmektedir (Alengebawy ve ark., 2021) . Pek çok pestisit uzun süredir tiroit fonksiyonlarını bozduğundan

şüphelenilmekteydi. Yine yapılan çalışmalarda pestisitlere maruz kalma ile hipotiroidizm riskinin artması arasında bağlantı olduğuna dair bulgular elde edilmiştir. Başka bir çalışmada, Amerika’ da kullanımda olan ilaçlarıyla ilişkili olarak tiroit kanseri riskinin arttığı gözlemlenmiş ve bu kimyasalların tiroit karsinogenezindeki potansiyel rolünü anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu kanısına varılmıştır (Negar ve ark., 2022).

5.KAYNAKLAR

- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S.T., Qureshi S.R., Wang M.Q. (2021). Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics*. 9(3), 42.
- Armando, M., Dale, PS., Laura, EBF., Jonathan, NH., Christine, GP. (2017). Pesticide Exposure and Risk of Rheumatoid Arthritis among Licensed Male Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives*.125(7):077010.
- Bertolote, J.M., Fleischmann, A., Eddleston, M., Gunnell, D. (2006). Deaths from pesticide poisoning: a global response. *The British Journal of Psychiatry*, Volume 189; 3; 201 – 203.
- Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G. (2011). Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 8(5); 1402-1419.
- Dogan, F.N., Karpuzcu, M.E. (2019). Current status of agricultural pesticide pollution in Turkey and evaluation of alternative control methods. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*. 25; 6; 734-747.
- Eddleston, M., Buckley, N.A., Eyer, P., Dawson, A.H. (2008). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* ; 371: 597–607.
- Foster, S.S.D., Chilton, P.J., Stuart, M.E. (1991) Mechanisms of Groundwater Pollution by Pesticides. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*.5:2:186-193.
- Hamey, P.Y. (2001). The need for appropriate use information to refine pesticide user exposure assessments. *Annals of Occupational Hygiene*. 45; S69-S79.
- Houdart, M., Tixier, P., Lassoudiere, A., Saudubray, F. (2009) Assessing pesticide pollution risk: from field to watershed. *Agronomy for Sustainable Development*. 29; 2; 321-327.
- Jacobsen, C.S., Hjelmsø, M.H. (2014). Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*. 27;15-20.
- Kaliaa, A., Gosalb, S.K. (2011). Effect of pesticide application on soil microorganisms. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 57; 6; 569–596.
- Karami, S., Boffetta, P., Rothman, N., Hung, R.J., Stewart T., Zaridze, D., Navratilova, M., Mates, D., Janou, t V., Kollarova, H., Bencko, V., Szeszenia-Dabrowska, N., Holcatova, I., Mukeria, A., Gromiec, J., Chanock, SJ., Brennan, P., Chow, W.H., Moore, L.E. (2008). Renal cell carcinoma, occupational pesticide exposure and modification by glutathione S-transferase polymorphisms. *Carcinogenesis*. 29; 8; 1567–1571.
- Kathleen, A., Tzilivakis, L.J., Warner, D.J., Green, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment*, Vol. 22; 4; 1050–1064.
- Kim, K.H., Kabir, E., Jahan, S.A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*. 575:525-535.
- Kwok Eric, S.C. (2021). Toxicological priority index framework for prioritizing pesticide products into human exposure and health risk assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*. 27;8; 2080-2103.
- Negar, O., Julia, E.H., Myles, C., Chenxiao, L., Jerome M.H., Avital H. (2022). Thyroid Cancer and Pesticide Use in a Central California Agricultural Area: A Case Control Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.107; e3574–e3582.
- Pascale, A., Laborde, A. (2020). Impact of pesticide exposure in childhood. *Reviews on Environmental Health*. 35; 3; 221-227.
- Schmolke, A., Thorbek, P., Chapman, P., Grimm, V. (2010). Ecological Models and Pesticide Risk Assessment: Current Modeling Practice. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29; 4; 1006–1012.

- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G.R.S., Handa, N., Kohli, S.K., Yadav, P., Bali, A.S., Parihar R.D., Iqbal Dar, O., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., Kumar Thukral, A.(2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*. 1:1446.
- Sun, Q., Zhu, L., Dong, M. (2006) Risk assessment of organic pesticides pollution in surface water of Hangzhou. *Environmental Monitoring and Assessment*. 117; 1-3; 377-385.
- Sun, SX., Sidhu, V., Rong, Y.H., Zheng, Y. (2018). Pesticide Pollution in Agricultural Soils and Sustainable Remediation Methods: a Review. *Current Pollution Reports*. 4; 3; 240-250.
- Weisner, O., Frische, T., Liebmann, L., Reemtsma, T., Roß-Nickoll, M., Schäfer, R.B., Schäffer, A., Scholz-Starke, B., Vormeier, P., Knillmann, S., Liess, M. (2021). Risk from pesticide mixtures – The gap between risk assessment and reality. *Science of the Total Environment*. 796; 149017.
- Ye, M., Beach, J., Martin J.W., Senthilselvan, A. (2013). Occupational Pesticide Exposures and Respiratory Health. *Annals of Occupational Hygiene*. 45; S69-S79.

BÖLÜM 3

TIBBİ BİTKİLERİN GEÇMİŞTEN GÜNÜMÜZE KULLANIMI ve KANSERİN ÖNLENMESİNDE BİTKİSEL YAKLAŞIMLAR

Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ¹
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÇOBAN²
Öğr. Gör. Mahmut ÇOBAN³

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051739>

¹ Bingöl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bingöl, TÜRKİYE, Orcid: 0000-0002-7635-4855, E-mail: abengu@bingol.edu.tr

² Bingöl Üniversitesi, Solhan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Solhan/Bingöl, TÜRKİYE
Orcid:0000-0003-1141-544X E-mail: ccoban@bingol.edu.tr

³Bingöl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bingöl, TÜRKİYE
Orcid:0000-0002-8205-1076 E-mail: mahmutcoban@bingol.edu.tr

1.GİRİŞ

Çağlar boyunca insanlar, yiyecek, barınak, giysi, ulaşım araçları, gübre, tat ve kokuların ve en önemlisi ilaç üretimi gibi temel ihtiyaçları için doğaya güvendiler ve kullandılar. Bitkiler binlerce yıldır varlığını sürdüren gelişmiş geleneksel tıp sistemlerinin temelini oluşturmuştur. Yıllardır insanlığa yeni çareler sunmaya devam ediyor. Bitkilere atfedilen bazı tedavi edici özelliklerin hatalı olduğu kanıtlanmış olsa da şifalı bitki tedavisi yüzlerce, binlerce yıllık ampirik bulgulara dayanmaktadır. Çivi yazısıyla kil tabletler üzerine yazılan ilk kayıtlar Mezopotamya kayanıklıdır ve M.Ö. 2600 civarına tarihlenir. Öksürük ve soğuk algınlığından paraziter enfeksiyonlara ve iltihaplanmalara kadar çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için kullanılan maddeler arasında *Cedrus* türleri (Sedir) ve *Cupressus sempervirens* (Selvi), *Glycyrrhiza glabra* (Meyan kökü), *Commiphora* türleri (Mür) ve *Papaver somniferum* (Haşhaş) yağları bulunmakta olup bunların tümü günümüzde de kullanılmaktadır. Mısır ilaçları, pigment kaybıyla karakterize bir cilt rahatsızlığı olan vitiligoyu tedavi etmek için piskopos otlarının (*Ammi majus*) kullanıldığını bildirmektedir. Daha yakın zamanlarda, sedef hastalığı ve diğer cilt bozukluklarının yanı sıra T hücreli lenfomayı tedavi etmek için bu bitkiden bir ilaç (b-metoksipsoralen) üretildi. Potansiyel kemoterapötik ajanların kaynağı olarak doğaya olan ilgi devam etmektedir. Doğal ürünler ve türevleri dünyada klinik kullanımda olan tüm ilaçların %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Daha yüksek bitkiler toplamın en az %25'ine katkıda bulunur. Son 40 yıl boyunca, çiçekli bitkilerden en az bir düzine güçlü ilaç türetilmiştir; bunlar arasında *Dioscorea spp.*den tüm infertilite kontraseptif ajanların türetildiği diosgenin türetilmiştir; *Rauwolfia* türlerinden reserpin ve diğer anti-hipertansif ve sakinleştirici alkaloidler; *Citrus* familyasındaki bir grup Güney Amerika ağacından (*Pilocarpus spp.*) elde edilen, glokom ve 'ağız kuruluşunu' tedavi etmek için pilokarpin; Pervane çiçeğinden (*Catharanthus roseus*) iki güçlü kanser karşıtı ajan; *Cassia sp.*'den müshil maddeler. ve *Digitalis* türlerinden kalp yetmezliğini tedavi etmek için kardiyotonik bir ajan üretilmiştir. Dünyadaki çiçekli bitki türlerinin yaklaşık yarısı (125.000) tropik ormanlarda yaşamaktadır. Tropikal yağmur ormanları, potansiyel uyuşturucu türlerinden oluşan geniş bir rezervuarı desteklemeye devam ediyor. Doğal ürün kimyagerlerine, yeni ilaçların geliştirilmesi için paha biçilemez başlangıç noktası bileşikleri sağlamaya devam ediyorlar. Daha fazla bileşik bulma potansiyeli çok büyüktür, çünkü bugüne kadar tropikal türlerin yalnızca yaklaşık %1'i farmasötik potansiyelleri açısından incelenmiştir. Tropikal yağmur ormanlarıyla sınırlı türler için bu oran daha da düşüktür. Bugüne kadar tropik bitkilerden yaklaşık 50 ilaç geliştirildi. Modern tıp için keşfedilmemiş ilaçların varlığı, tropik ormanları korumanın en önemli nedenlerinden biri olarak sıklıkla gösterilmektedir; bu nedenle, yüksek yıllık yok olma oranı, en hafif tabirle endişe verici bir konudur. Rastlantı eseri laboratuvar gözlemleri yoluyla keşfedilmiş olmasına rağmen, piyasadaki veya klinik deneyleri tamamlayan kanser karşıtı ilaçların üç ana kaynağı, Yerli Amerikalılar tarafından tıbbi olarak kullanılan Kuzey Amerika bitkilerinden elde edilmiştir: Papaw (*Asimina spp.*); Batı Porsuk Ağacı (*Taxus brevifolia*), yumurtalık kanserine karşı etkili ve lösemi, akciğer lenfoması ve testis kanseriyle mücadelede kullanılan ördek otu (*Podophyllum peltatum*) dır (Gurib-Fakim, A. 2006).

2. Antik Çağlardan Bugüne Şifalı Ot Kullanımı

Bu gezegendeki insanların büyük çoğunluğu günlük sağlık ihtiyaçları için hâlâ geleneksel ürünlere (şifalı bitkiler ve diğer malzemeler) güveniyor. Ayrıca tüm tıbbi reçetelerin dörtte birinin bitkilerden elde edilen maddelere veya sağlık hizmetleri için bitki kaynaklı türetilmiş sentetik analoglara dayalı formülasyonlar olduğu ve Dünya Sağlık Örgütü'ne göre başta gelişmekte olan ülkeler olmak üzere dünya nüfusunun %80'inin bitkilere güvendiği de bir gerçektir. Geleneksel kültürlerdeki bitkisel ilaçlara ilişkin derin bilginin yüzyıllar boyunca deneme yanılma yoluyla gelişmiş olması ve en önemli tedavilerin dikkatli bir şekilde bir nesilden diğerine sözlü olarak aktarılmış olması muhtemeldir. Eczacılığın tarihi yüzyıllar boyunca farmakolojinin tarihiyle ya da doğal kaynaklardan (çoğunlukla bitkilerden, mineraller, hayvanlar ve mantarlardan) elde edilen geleneksel tedavi çalışmaları ile aynıydı. Farmakoloji ilk kez 1815 yılında Seidler tarafından farmasötik bir disiplin olarak tanımlandı. Tanım şöyleydi: "Farmakoloji adı ile bitki veya hayvan kaynaklı ilaçlarla ilgili her şeyi, fizyolojik etkisi dışında her yönüyle öğrenmeyi, bunları doğru şekilde tanımlamayı ve bu bilgileri genel bir vizyon altında ilişkilendirmeyi görev edinen bilimi kastediyoruz." 19. yüzyılda açık ara en önemli farmasötik disiplin ve günümüzün tüm farmasötik disiplinlerinin anasıydı. Modern allopatik tıbbın kökleri antik tıba dayanmaktadır ve geleneksel bilgi ve deneyimlerin sağladığı öncüller takip edilerek bugüne kadar olduğu gibi gelecekte de pek çok önemli yeni ilacın keşfedilip ticarileştirilmesi muhtemeldir. Avrupa gelenekleri özellikle iyi bilinmesine ve Batı'daki modern farmakoloji üzerinde güçlü bir etkiye sahip olmasına rağmen, neredeyse tüm toplumların köklü gelenekleri vardır ve bunların bazıları neredeyse hiç araştırılmamıştır. Bu geleneklerin incelenmesi yalnızca alanın nasıl geliştiğine dair bir fikir vermekle kalmıyor, aynı zamanda çeşitli kültürel uygulamalar geliştirme yeteneğimizin büyüleyici bir örneğidir. Geleneksel ilaçları kullanan insanlar, ilaçlarının ardındaki bilimsel mantığı anlayamayabilirler ancak kişisel deneyimlerinden, bazı şifalı bitkilerin tedavi edici dozlarda kullanıldığında oldukça etkili olabileceğini biliyorlardı. Bugün vücudun nasıl çalıştığını daha iyi anladığımız için, bitkilerin iyileştirici güçlerini ve karmaşık sağlık durumlarını tedavi etmek için çok işlevli kimyasal varlıklar olarak potansiyellerini anlama konusunda daha iyi bir konumdayız. Şifalı bitkiler tipik olarak sağlığı iyileştirmek için ayrı ayrı, ek olarak veya sinerji içinde etki gösterebilen farklı kimyasal bileşiklerin karışımlarını içerir. Tek bir bitki, örneğin sindirimi uyaran acı maddeler, şişlikleri ve ağrıyı azaltan anti-inflamatuar bileşikler, antioksidan ve venotonik görevi görebilen fenolik bileşikler, doğal antibiyotik görevi gören anti-bakteriyel ve anti-mantar tanenleri içerebilir. Atık ürünlerin ortadan kaldırılmasını artıran idrar söktürücü maddeler ve ruh halini iyileştiren ve iyilik hissi veren toksinler ve alkaloidler gibi. Modern allopatik genellikle belirli koşulları tedavi etmek için patentlenebilir tek bir bileşik veya 'sihirli bir değnek' geliştirmeyi amaçlamaktadır. Geleneksel tıp genellikle kimyasal olarak karmaşık bitkiler kullanarak veya sinerjistik etkiyi en üst düzeye çıkarmak veya ilgili bir moleküler hedefle etkileşim olasılığını artırmak için birkaç farklı bitkiyi bir araya getirerek dengeyi yeniden sağlamayı amaçlar. Günümüzün çoğu toplumunda allopatik ve geleneksel tıp sistemleri birbirini tamamlayan bir şekilde yan yana bulunmaktadır. Birincisi ciddi akut durumları tedavi ederken ikincisi kronik hastalıklar için, semptomları azaltmak ve yaşam kalitesini uygun maliyetli bir şekilde iyileştirmek için kullanılır (Jamshidi-Kia ve ark.2017).

2.1. Afrika Geleneksel Tıbbı

Film sahnelerine bile konu olabilen Afrika geleneksel tıbbı, tüm tıp sistemleri arasında en eski ve belki de en çeşitli olanıdır. Afrika, şifa uygulamalarında bölgesel farklılıklara işaret eden zengin biyolojik ve kültürel çeşitliliğe sahip insanlığın beşiği olarak kabul edilebilir. Ne yazık ki, ilaç sistemleri yetersiz bir şekilde kaydedilmektedir ve bugüne kadar da öyle kalmıştır. Ancak Afrika bitkilerinin tıbbi kullanımlarının belgelenmesi, bu bitkilerden bazılarının doğal yaşam alanlarının antropojenik faaliyetler nedeniyle hızla kaybolmasından dolayı giderek daha acil hale gelmiştir. Afrika kıtasının dünyadaki en yüksek ormansızlaşma oranlarından birine sahip olduğu bildiriliyor. Buradaki paradoks, aynı zamanda yüksek endemizm oranına sahip bir kıta olması ve Madagaskar Cumhuriyeti'nin %82 ile listenin başında yer almasıdır. Afrika geleneksel ilaçları çeşitli biçimleriyle hem bedeni hem de zihni kapsayan bütünseldir. Şifacı genellikle semptomları tedavi etmek için ilaç yazmadan önce hastalığın psikolojik temelini teşhis ve tedavi eder. Ünlü Afrika şifalı bitkileri arasında *Acacia senegal* (Arap zamkı), *Agathosma betulina* (Buchu), *Aloe ferox* (sarı sabır, öd ağacı), *Aloe vera* (Tıbbi sarı sabır), *Artemisia afra* (Acı pelin), *Aspalathus linearis* (Rooibos çayı), *Boswellia sacra*, *Catha edulis* (Yemen otu), *Commiphora myrrha* (Mürrü safi, mirra), *Harpagophytum procumbens* (Şeytan pençesi), *Hibiscus sabdariffa* (Hibiscus), *Hypoxis hemerocallidea* (Afrika patatesi), *Prunus africana* (Afrika eriği) bulunur. Madagaskar tek başına *Catharanthus roseus* (Pervane çiçeği) ile katkıda bulunmuştur ve flora ve faunasının çeşitliliği göz önüne alındığında daha fazla katkıda bulunma potansiyeline sahiptir (Petrovska, 2012).

2.2. Amerika Geleneksel Tıbbı

Diğer kültürlerde olduğu gibi ABD'de de yerli şifacı veya Şaman, hastalıkların hem fiziksel hem de ruhsal boyutunu ele alarak hastalıklara yaklaşır. Bu Şamanistik törenler, hastanın veya bir bütün olarak toplumun iyileştirilebilmesi için kötü güçleri kovmayı amaçlayan şarkı söylemeyi, dans etmeyi ve diğer ritüelleri içerir. İlk yerleşimciler yerli uygulamalardan bilgi aldılar ve sonunda birçok bitkisel ilacı benimsediler; bunlar daha sonra Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi'nin temelini oluşturdu. Amerika Birleşik Devletleri'nin ünlü şifalı bitkileri arasında Ekinezya (*Echinacea purpurea*) ve Altınmühür (*Hydrastis canadensis*) bulunmaktadır. 20. yüzyılın büyük bölümünde şifalı bitkilere veya botaniklere şüpheyle yaklaşıldı ve bitkisel ilaç uygulamaları düşüşe geçti. Bitkiler esas olarak tıbbın geliştirilmesi için potansiyel bir saf kimyasal bileşik kaynağı olarak görülüyordu. Son yıllarda şifalı bitkiler ve botanikler ABD ve Kanada'da çok popüler hale geldi ancak bunlar hala kendi başlarına ilaç olmaktan ziyade besin takviyesi olarak kabul ediliyor. Tıpkı Afrika gibi Orta ve Güney Amerika ülkeleri de zengin ve çeşitli şifa kültürlerine sahiptir ve bunlar yeterince bilinmemekte ve gerektiği gibi kayıt altına alınmamaktadır. Gelecek yıllarda hiç şüphesiz yeni bitkisel ilaçların kaynağı olacaklar. Güney ve Orta Amerika tarıma çok büyük katkılarda bulunmuştur ve çok sayıda gıda ürünü (mısır, patates, domates, balkabağı, manyok, fıstık, tatlı patates) buradan elde edilmektedir. Geleneksel Hint şifalı bitkileri de yaygın olarak kullanılmaktadır ancak İspanyol, Avrupalı, Hint ve Afrika'nın etkisi açıktır. Şifalı bitkilerin ünlü örnekleri şunlardır: *Cinchona pubescens* (Kına kına), *Erythroxylum coca* (Koka ağacı), *Ilex paraguariensis* (Mate), *Myroxylon balsamum* (balsam), *Paullinia cupana* (Guarana),

Peumus boldus (Boldo), *Psidium guajava* (Guava), *Spilanthes acmella*, *Tabebuia impetiginosa* (Lapaho) ve *Uncaria tomentosa* (Kedi pençesi) (Inoue ve ark, 2019).

2.3. Avustralya Ve Güneydoğu Asya Tıbbı

Bu bölge, geleneksel tıba olan ilginin yeniden canlandığına tanık oldu ve artık birçok ülke, yeni tedavilerin potansiyel kaynağı olarak tıbbi bitkilere yönelik araştırmaları teşvik ediyor. Aborijinlerin karmaşık bir şifa sistemi vardı, ancak Avustralya'daki geleneksel bilgilerin çoğu, sistematik olarak kaydedilemeden kaybolmuştu. Buna karşılık Malezya, Tayland, Vietnam, Yeni Zelanda, Borneo ve Polinezya Adaları gibi pek çok şifa yeri sağlam kalıyor ve kaydedilip geliştiriliyor. Çoğu ülkede güçlü bir Çin etkisi gözlemleniyor. Bu bölgeden gelen iyi bilinen tıbbi ürünler arasında *Croton tiglium* (Kraton ağacı), *Duboisia hopwoodii*, *Eucalyptus globulus* (Sıtma ağacı), *Melaleuca alternifolia* (Çay ağacı), *Myristica fragrans* (Muskat, hint cevizi), *Piper methysticum* (Kava biberi), *Strychnos nux-vomica* (Kargabükten), *Styrax benzoin* (Loban, Benzoin) ve *Syzygium aromaticum* (Karanfil) bulunmaktadır.

2.4. Hint Geleneksel Tıbbi

Ayurveda (Hint Geleneksel Tıbbi) belki de tüm tıbbi geleneklerin en eskisidir ve muhtemelen geleneksel Çin tıbbından daha eskidir. Sistematik tıbbın kökeni olarak kabul edilir. Aslında sistemdeki dengeyi ve uyumu korumaya yönelik pratik ve bütünsel bir kurallar bütünüdür. Hipokrat'ı etkileyen Dioscorides'in fikirlerinin çoğunu Hindistan'dan aldığı düşünülüyor. Tıpla ilgili eski Hindu yazılarında yabancı ilaçlara hiçbir atıf yapılmazken, Yunan ve Orta Doğu metinleri Hint kökenli fikir ve ilaçlara atıfta bulunur. Ayurveda, Hintçe Ayar (Hayat) ve veda (Bilgi veya Bilim) kelimelerinden türetilmiştir ve dolayısıyla Yaşam Bilimi anlamına gelir. Sistemi takip etmek, doğruluğa, zenginliğe ve mutluluğa ulaşmanın aracı olarak kabul edilen uzun bir yaşamın sağlanmasına yardımcı olacaktır. Ayurveda, bedensel salgılara (dosas) ve sindirimi ve zihinsel aktiviteyi sürdürdüğüne inanılan iç yaşam gücüne (prana) dayanması bakımından Galenik Tıba benzer. İnsanlar da dahil olmak üzere canlı ve cansız çevre, toprak, su, ateş, hava ve uzay unsurlarından oluşur. Bu geleneklerin anlaşılması için kirlilik ve temizlik kavramı da önemlidir. Hastalık, çeşitli unsurlar arasındaki dengesizliğin sonucudur ve tedavinin amacı dengeyi yeniden sağlamaktır. Ünlü Ayurvedik şifalı bitkiler arasında *Azadirachta indica* (Hint leylağı), *Centella asiatica* (Kaplan otu), *Cinnamomum camphora* (Kafur, tarçın), *Elettaria kakule* (ela, kakule), *Rauwolfia serpentina* (Hint yılan kökü), *Santalum album* (Sandal ağacı), *Terminalia* türleri ve *Withania somnifera* (yalancı güvey feneri) bulunur.

2.5. Uzak Doğu Geleneksel Tıbbi

Avrupa'da yalnızca mütevazı derecede sofistike kültürler gelişirken, Çin ve Hindistan medeniyetleri geliyordu. Beklendiği gibi şifalı bitkiler ve bitki örtüsünün estetiği üzerine yazılar çoktu. 5000 yıldan daha eski olduğuna inanılan bu eski tıp sistemi, sağlığı ve uzun ömürlülüğü yöneten doğal yasalara, yani yin ve yang ile beş elemente ilişkin iki ayrı teoriye dayanmaktadır. Çin bitkisel reçetelerine ilişkin en eksiksiz referans, 1977'de yayınlanan Modern Çin Materia Medica Ansiklopedisi'dir. Burada 4800'ü bitki kökenli olmak üzere yaklaşık 6000 ilaç listelenmektedir. Geleneksel Çin tıbbının birçok kıtaya yayılması şüphesiz

bitkisel ilaçların dünya çapındaki mevcut popülaritesine katkıda bulunmuştur. Ünlü Çin şifalı bitkilerinin örnekleri *Angelica polymorpha var. sinensis* (Çin melek otu), *Artemisia annua* (Yavşan otu), *Ephedra sinica* (Çin efedrası), *Paeonia lactiflora* (Çin şakayığı), *Panax ginseng* (Kore ginsengi) ve *Rheum palmatum* (Çin raventi) (Cheng, 2000).

2.6. Avrupa Geleneksel Tıbbı

Antik Batı dünyasında Yunanlılar, bitkisel ilaç kullanımının rasyonel gelişimine önemli ölçüde katkıda bulundular. Bununla birlikte, Avrupa şifa sisteminin, kendi fikirleri Hindistan ve Mısır'daki eski inançlara dayanan Hipokrat (MÖ 460-377) ve Aristoteles'ten (MÖ 384-322) kaynaklandığı söyleniyor. Filozof ve doğa bilimci Theophrastus (M.Ö. 300), Bitkilerin Tarihi adlı eserinde şifalı bitkiler üzerinde durmuş ve bunların özelliklerini yetiştirme yoluyla değiştirebilme yeteneğine dikkat çekmiştir. Yunan doktor Dioscorides (MS 100), Roma ordularıyla yaptığı seyahatler sırasında şifalı bitkilerin toplanması, saklanması ve kullanımını kaydetmiştir ve Galen (MS 130-200) de eczacılık ve tıp alanında çalışmış ve ders vermiştir. Bu konularda en az 30 kitap yayınlayan Roma, bazen düzinelere veya içerik içeren, karmaşık reçeteleri ve ilaçların hazırlanmasında kullanılan formülleriyle tanınır. Yunan ve Roma tıbbı dünyanın dört elementten (toprak, rüzgar, ateş ve su) oluştuğu inancına dayanıyordu. Bunların her birinin, vücuttaki dört hayati sıvıyla bağlantılı, karşılık gelen salgıları vardır. Dört mizah (kan, balgam, kara safra ve sarı safra) hem sağlığı hem de mizacı etkiler (sırasıyla iyimser, soğukkanlı, melankolik ve asabi). Dengeyi yeniden sağlamak için kan alma (fazla kanı azaltmak) ve temizleme (fazla kara safrayı çıkarmak) gibi sert önlemler kullanıldı. Bu dört mizah aynı zamanda soğuk, sıcak, nem ve kurulukla da ilişkilendiriliyordu ve bunların her biri, sözde dengesizlikleri düzeltebildiği varsayılan soğuk, sıcak, nemli veya kuru otlara karşılık geliyordu. Avrupa geleneğinin yerel halk uygulamaları ve gelenekleri üzerinde de birçok bölgesel etkisi vardı. En güçlü etkilerden biri, M.S. 1. yüzyılda Yunan hekim Dioscorides tarafından yazılan ünlü *De Materia Medica* kitabıydı. Genel olarak Avrupa'daki ilk bitkisel bitki olarak kabul edilir ve 1000 yıldan fazla bir süredir Avrupa'da standart referans olarak kullanılmış ve daha sonraki bitkisel bitkilerin çoğunun temelini oluşturmuştur. M.S. 800 gibi erken bir tarihte, Orta Avrupa'daki manastırlarda şifalı bitkiler standart bir düzene göre yetiştiriliyordu. Bu çağın ünlü şifacılarından biri Bingenli Hildegard'dı (1098–1179). Daha sonraki yıllarda Paracelsus (1493-1541) adında İsviçreli bir simyacı, tıbbi tedavilerde doğru dozun önemini vurguladı. Bitkisel tıp, Avrupa'nın pek çok ülkesinde günlük yaşamın bir parçasıdır ve bugüne kadar hastalıkları tedavi etmenin karmaşık ve akılcı bir yöntemi olarak popülarlığını korumuştur ve genellikle tedavi edici olmaktan çok destekleyici olduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar birçok Avrupa ülkesinde bitkisel çay kullanımı hala oldukça popülerdir. Bunlara ek olarak, ham formda (işlenmemiş) çay veya kaynatma olarak alınan doğal ürünler, gelişmiş bitkisel ilaçlar (genellikle insanlarda sıkı testlere tabi tutulan standartlaştırılmış ve formüle edilmiş bitki özleri) saf sentetik kimyasallardan türetilen tıbbi ürünlere popüler bir alternatif olmaya devam etmektedir. Avrupa'da çok sayıda geleneksel bitkisel ilaç, ticarileşmenin bir sonucu olarak yaygın olarak bilinir hale geldi ve çok sayıda aktif bileşik, tıbbi bitkilerden izole edildi ve bugün tek kimyasal varlıklar olarak kullanıldı (Djordjevic, 2017).

2.7. Ortadoğu Ve Afrika Geleneksel Tıbbı

Arap geleneklerindeki en eski yazılı bilgiler Mezopotamya'daki Sümerler ve Akadlılardan gelir, dolayısıyla IV. Shanidar'ın arkeolojik kayıtlarıyla aynı bölgelerden gelir (Heinrich ve diğerleri, 2004). Ortadoğu, uygarlığın beşiği olarak biliniyor ve günümüzde yetiştirilen pek çok bitki bu bölgede evcilleştiriliyor. Babilliler, Asurlular ve Sümerler bitkisel ilaçları çok sayıda kil tablet üzerine çivi yazısıyla kaydetmişlerdir. Taşa oyulmuş ve Babil Kralı tarafından yaptırılan kapsamlı bir medeni kanunlar dizisi olan Hammurabi Kanunları (yaklaşık M.Ö. 1700) özellikle ilgi çekicidir ve birkaç şifalı bitkiyi listeler. Benzer belgeler Mısır'da birkaç bin yıldır varlığını sürdürüyor. Mısırlılar bilgilerini (tıp ve eczacılık dahil) Eski Krallık'tan kalma mezarların duvar resimlerinde ve papirüs üzerinde belgelediler; papirüs *Cyperus waterus*'tan yapılmıştı. Bu yazıtlardan en önemlisi M.Ö. 1500 yıllarına ait olan ve M.Ö. 3000 öncesine ait eski tıbbi bilgileri içerdiği bildirilen Ebers Papirüsü'dür. Bir mezarda bulunduğu söylenen bu ünlü 20 metrelik Papirüs parşömeni, Mısır hiyeroglifleriyle yazılmış ve adını 1872'de Thebes'teki Prof. Ebers Georges'tan alıyor. 1873'te getirildi ve Leipzig Üniversitesi'ne bırakıldı ve iki yıl sonra G. Ebers bunun bir kopyasını yayınladı. Ebers Papirüsü her türlü hastalığı kapsayan tıbbi bir el kitabıdır ve ampirik olduğu kadar sembolik tedavi biçimlerini de içerir. Bu metinde belgelenen teşhis hassasiyeti etkileyicidir. Ortadoğu ve Mısır'ın ünlü şifalı bitkileri arasında *Allium cepa* (Soğan), *Astracantha gummifera* (Krem), *Carthamus tinctorius* (Aspir), *Carum carvi* (Kimyon), *Ferula assafoetida* (Asofoetida), *Lawsonia inermis* (Kına), *Papaver somniferum* (Afyon haşhaşı), *Peganum harmala* (Suriye sedefi), *Prunus dulcis* (Badem), *Punica granatum* (Nar), *Rosa x damascena* (Şam Gülü), *Ricinus communis* (Hint Yağı Fabrikası), *Salvadora persica* (Diş fırçası ağacı), *Senna alexandrina* (Sinameki), *Sesamum indicum* (Susam), *Trachyspermum ammi* (Ajowan), *Trigonella foenum-graecum* (Çemen otu) ve *Vitis vinifera* (Üzüm) yer alır (Saganuvan, 2010).

3. Etnobotanik Ve Tıp

Etnobotanik terimi ilk kez 1896'da Harshberger tarafından kullanıldı. Harshberger, bunu ilkel ve yerli insanlar tarafından kullanılan bitkilerin incelenmesi olarak tanımladı. Terim, 1916'da Robbins, Harrington ve Freire-Marreco tarafından genişletildi ve etnobotanik biliminin, ilkel toplumlarda yaşamın tüm aşamalarına ilişkin bilgilerin bu kabile halklarının yaşam gelenekleri, inançları ve tarihi ve bitkisel çevrenin toplumlar üzerindeki etkilerinin araştırılmasını ve değerlendirilmesini içermesi gerektiğini öne sürdüler. Yirmi beş yıl sonra Jones (1941) daha kısa bir tanım geliştirdi: "İlkel insanlar ve bitkiler arasındaki karşılıklı ilişkilerin incelenmesi". Schultes 1967'de bunu insan ve çevresindeki bitki örtüsü arasındaki ilişkileri de kapsayacak şekilde genişletti. Yukarıda bahsedildiği gibi bitkiler Çin (Chang ve But, 1986) ve Hindistan (Kapoor, 1990) gibi ülkelerde binlerce yıldır kullanılan geleneksel tıp sistemlerinin temelini oluşturmuştur. Birçok kültürün geleneksel tıp sistemlerinde bitkilerin kullanımı kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir. Bu bitki bazlı sistemler sağlık hizmetlerinde önemli bir rol oynamaya devam ediyor ve Dünya Sağlık Örgütü, dünya sakinlerinin %80'inin sağlık hizmetleri için esas olarak geleneksel ilaç sistemlerine güvenmeye devam ettiğini tahmin ediyor. Bitkisel ürünler aynı zamanda Gelişmiş ülkelerde ikamet eden nüfusun geri kalan %20'lik kısmının sağlık sistemlerinde de önemli bir rol oynamaktadır. 1959'dan 1980'e kadar ABD'deki eczanelerden dağıtılan

reçetelere ilişkin verilerin analizi, bir veya daha fazla ülkede halihazırda kullanımda olan ilaçlar, %25'inin bitki özleri veya daha yüksek bitkilerden elde edilen aktif maddeler ve 90 bitki türünden türetilen en az 119 kimyasal madde içerdiğini göstermektedir (Farnsworth ve diğerleri, 1985). Bu 119 ilacın %74'ü geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin etken maddelerinin izolasyonuna yönelik kimyasal çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir. Ayrıca tamamlayıcı veya alternatif bitkisel ürünler olarak adlandırılan ürünlerin kullanımı da son yıllarda yaygınlaşmıştır. Kınakına türlerinin (örneğin *C. officinalis*) kabuğundan sıtmaya karşı ilaç olan kinin izolasyonu, 1820 yılında Fransız eczacılar Caventou ve Pelletier tarafından rapor edilmiştir. Kınakına kabuğu uzun süredir Amazon bölgesindeki yerli gruplar tarafından ateş tedavisinde kullanılıyordu ve Avrupa'ya ilk kez 1600'lerin başında sıtma tedavisi için tanıtıldı.

4.Yeni Biyodinamik Bileşiklerin Araştırılmasında Etnobotanik Ve Etnofarmakolojinin Değeri

Etnobotanik ve Etnofarmakoloji, özellikle yerli halkların tıbbi maddelerle ilgili ampirik bilgilerine, bunların potansiyel sağlık yararlarına ve bu tür ilaçlarla ilişkili sağlık risklerine bakan disiplinler arası araştırma alanlarıdır. Görüldüğü gibi şu anda kullanımda olan bitki kökenli farmasötiklerin ve bitkisel ilaçların birçoğu dünya çapında yerli halklar tarafından kullanılıyordu. Bu bilgilerin bir kısmı belgelenmiş, kodlanmış veya bilimsel olarak incelenmiştir. Ayrıca yüzbinlerce canlı bitki türünün yalnızca çok küçük bir kısmı laboratuvarlarda araştırılmıştır. Bitkilerle ilgili bu zayıf anlayış özellikle tropik bölgelerde daha da belirgindir. Yaklaşık 55.000 bitki türüne sahip olan Brezilya'da bitki örtüsünün yalnızca %0,4'ü rapor edilmiştir. Yeni ve faydalı tropikal bitki bileşiklerinin bulunmasında uygun maliyetli bir araç olarak etnobotanik araştırmanın önemi ne kadar vurgulansa azdır. Modern tıpta kullanılan ikincil bitki bileşiklerinin çoğu ilk olarak etnobotanik araştırmalarla keşfedilmiştir. Dünya çapında tıpta kullanılan yüksek bitkilerden elde edilen 119 saf kimyasal bileşiğin %74'ü türetildikleri bitkilerle aynı veya benzer kullanıma sahiptir. Pembe Cezayir Menekşesi (*Catharanthus roseus*, *Apocynaceae*), yerel halkların kullandığı bitkilerin önemini klasik bir örneğini temsil eder. Güneydoğu Madagaskar'a özgü bu otsu bitki, 75'ten fazla alkaloidin kaynağıdır; bunlardan ikisi çocukluk çağı lösemisi ve Hodgkins hastalığını çok yüksek bir başarı oranıyla tedavi etmek için kullanılır. Bu tür ilk olarak yerel halk tarafından oral hipoglisemik ajan olarak kullanıldığı için laboratuvarında araştırıldı. *Catharanthus* gibi, günümüzde yaygın olarak kullanılan birçok ilaç (örneğin, aspirin, efedrin, ergometrin, tubokurarin, digoksin, reserpin, atropin vb.), dünya çapında insanlar tarafından kullanılan bitkilerin biyobilimsel araştırmaları yoluyla yerli ilaçların kullanılmasıyla elde edilmiştir. Böylece, bilgisiz insanlar tarafından tıbbi amaçlarla kullanılan bitkilerin araştırılmasının, toplumumuzda önemli uygulamaları olabilecek yeni biyodinamik bileşiklere bize sağlayabileceği görülebilir. Gelişmekte olan ülkelerde şifalı bitkilerin önemi göz önüne alındığında, dünya nüfusunun çoğunun temel sağlık ihtiyaçları için geleneksel tıba bağlı olması şaşırtıcı değildir. Çoğu durumda gelişmekte olan ülkeler ithal ilaçlara milyarlarca dolar harcamayı göze alamazlar. Birçok Afrika ve Asya ülkesi artık geleneksel ilaçları halk sağlığı programlarının ayrılmaz bir parçası olarak teşvik ediyor. Yerli ilaçlar nispeten ucuzdur ve yerel olarak temin edilebilir ve yerel halk tarafından kolayca kabul edilir.

5.İlaç Keşfinde İkincil Bitki Metabolitleri

Her ne kadar doğal ürünler, özellikle de ikincil metabolitler ilaçların temelini oluştursa da ve bu bileşiklerin bitkinin biyokimyasındaki varlığının kanıtlanması çoğu zaman zordur. Bu bileşiklerin, bitkinin savunma sisteminin bir parçası olarak bitki tarafından sentezlenmiş olabileceği öne sürülmüştür. Bitkilerin bakteri ve mantarların saldırısına yanıt olarak fitoaleksin ürettiği bilinmektedir. Diğer hayvanların avlanmasını caydırmak amacıyla Amazon kurbağaları gibi bazı hayvanlarda oldukça toksik doğal ürünlerin varlığı da vurgulanmıştır. Bu bileşiklerin doğadaki varlığının nedenleri ne olursa olsun, yeni ilaç moleküllerinin bulunmasında kullanılan paha biçilmez bir kaynak sağlarlar.

6.Doğal Ürün Kimyasında Kullanılan Yöntemler

Spektroskopik yöntemler, kromatografi gibi iyi ekstraksiyon teknikleriyle birleştiğinde, son 50 yılda doğal ürün kimyasının olağanüstü başarısına katkıda bulunmuştur. Sağlam bir izolasyon stratejisi, birçok biyoaktif molekülün izolasyonuna ve karakterizasyonuna yardımcı olmuştur. Günümüzde tıbbi bitkilerin biyoanaliz rehberliğinde fraksiyonlanması, biyoaktif bileşenlerin doğal kaynaklardan izole edilmesi girişiminde rutin bir özelliktir. Bu teknikler sadece bitki kaynaklarıyla sınırlı olmayıp aynı zamanda mikrobiyal ve hatta mantar kaynaklı metabolitlere de uygulanmaktadır.Uygulamada, materyal toplanır toplanmaz, bitkiler söz konusu olduğunda, materyalin doğru kimliğinin tespit edilmesi için bir taksonomist tarafından tanımlanması gerekmektedir. Herbaryum örneklerine ait fiş örnekleri saklanır. Bitkinin çeşitli kısımları ayrı ayrı toplanır (yaprak, çiçek, sap, odun, ağaç kabuğu, kök, kök kabuğu vb.) ve kurutma dolaplarında hızla kurutulur. Hızlı kuruma, hava veya mikroplar yoluyla bileşenlerin bozulmasını önler.Bazen bitki numuneleri yüksek vakumda liyofilize edilir, ancak yine de uçucu bileşenlerin aşırı kaybindan kaçınmak için dikkatli olunmalıdır çünkü uçucu bileşenler ilginç biyolojik aktiviteler de sergileyebilir.Malzeme sabit ağırlığa kadar kurutulduktan sonra daha küçük parçacıklara öğütülür ve genellikle gradyanlı solvent ekstraksiyonu kullanılarak ekstrakte edilir. Bununla birlikte, süreçte, doğrulamada veya etnobotanik bilgilerde, aynı doğal biyoaktif ürünlerin elde edilmesi için sıradan insanların kullanımı mümkün olduğunca taklit edilmelidir. Bu, işin çok kritik bir aşamasıdır, çünkü ekstraksiyon tekniği uyarlanmazsa, aktif bileşenlere erişimin kaybıyla sonuçlanabilir. Ek olarak, yanlış ekstraksiyon yöntemleri doğal ürünün bozulmasına sebep olabilir. Çok sayıda ekstraksiyon tekniği mevcuttur:Soğuk ekstraksiyon: bitki materyalinin oda sıcaklığında farklı polariteye sahip solvent içerisinde ekstrakte edildiği yöntem. Çoğu bileşenin maksimum düzeyde çıkarılmasına olanak tanır.Sıcak süzme: Bitki genellikle geri akış altında solvent içinde ısıtılır. Bu ekstraksiyon yöntemi, mumlar gibi en çözünmeyen malzemelerden lipofilik doğal ürünlere kadar çok sayıda metabolitin ekstraksiyonuna izin verir.Süperkritik akışkan ekstraksiyonu: Bu ekstraksiyon tekniğinde, bazı gazlar basınç altında çözücü özelliklere sahip sıvılaşmış gibi davranır. Bu durumda yaygın olarak kullanılan gaz, ekstraksiyon bittikten sonra ekstraktanttan uzaklaştırılma avantajına sahip olan karbondioksittir. Karbondioksitin polaritesi, karbon tetraklorür gibi bir değiştirici maddenin eklenmesiyle artırılabilir.Soxhlet ekstraksiyonu: Doğal ürünün ekstraksiyonu için belki de en yaygın ve yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon tekniği. Çözücünün polarite gradyanı uygulanır. İşlem sırasında bazı bileşenler yok edilebilse de, bu hala doğal ürün kimyasında kullanılan

en iyi yöntem veya ekstraksiyondur. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra, ekstraksiyon maddesi genellikle büyük hacimler veya solventler için vakum altında konsantre edilir ve küçük hacimler için nitrojen altında üflenir, aynı zamanda uçucuların kaybolmaması da sağlanır. Sulu ekstraktlar genellikle dondurularak kurutulur ve -20 C'de saklanır çünkü bu düşük sıcaklık, biyoaktif doğal ürünün bozulmasını azaltır. Ekstraksiyon protokolleri bazen ekstrakte edilen moleküllerin türüne bağlı olarak değiştirilebilir; bazen alkaloidleri tuzları olarak çıkarmak için asitler eklenebilir.

6.1. Kromatografi

Kromatografik teknikler doğal ürünlerin ayrılmasında etkili olmuştur. Tekniklerden bazıları burada tartışılmaktadır. En hızlı ve en yaygın kullanılan kromatografik tekniklerden biri İnce Tabaka Kromatografisidir (TLC). TLC: Bu yöntemde, yüklenecek miktara bağlı olarak değişen kalınlıklarda sorbent (örneğin Silika jel) ile önceden kaplanmış cam veya alüminyum plakalar kullanılır. Bileşik karışımı hem hazırlayıcı hem de analitik plakalara alttan yaklaşık 2 cm mesafede yüklenir ve solventi içeren bir tanka indirilir. İkincisi yukarı doğru göç eder, plakalar ve bileşik karışımını bileşenlerin polaritesine göre ayırır. Ayrılan malzemelerin görselleştirilmesi için çeşitli reaktifler mevcuttur. TLC, çok sayıda numunenin aynı anda analiz edilebilmesi veya ayrılabilmesi nedeniyle oldukça uygun maliyetli bir niteliksel teknik olma avantajına sahiptir., Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine (HPLC) kıyasla zayıf tespit ve kontrol veya elüsyonundan dolayı birkaç dezavantaj içerir. HPLC: Bu yöntem oldukça popülerdir ve biyoaktif doğal ürünlerin analizi ve izolasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Analitik hassasiyet, kullanılan dedektöre bağlı olarak daha da artırılır. Dedektörler, elüsyonun UV spektrumlarının elde edilmesini sağlayan bir fotodiyot dizisi (PDA) gibi UV tespiti olabilir. 190 nm ile 800 nm arasında pik yapar. PDA UV tespiti, zayıf UV özelliklerine sahip bileşikler bile tespit etme avantajına sahiptir ve bu, özellikle karakteristik bir UV imzasına yükselecek kromoforlara sahip olmayabilen terpenoidler veya poliketidler gibi doğal ürünlerin analizinde özellikle faydalıdır. Bileşiklerin elektronik kütüphane araştırması ve biyolojik olarak aktif ekstraktların parmak izi alınmasıyla birleştiğinde HPLC, bitkisel ilaçlar için çok güçlü bir kalite kontrol tekniği haline gelir. Artık ilaç endüstrisindeki doğal ürünlerin çoğunluğunun analizi için tercih edilen bir araç haline geldi. UHPLC olarak adlandırılan daha hızlı ve gelişmiş teknikleri de günümüzde mevcuttur. Hem makine hem de sarf malzemeleri açısından pahalı olması anlamında bir dezavantaja sahiptir. Giderek daha popüler ve kullanışlı hale gelen başka bir temizleme kromatografi tekniği, Jel Kromatografisidir veya bazen Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) olarak da anılır. Bu teknikte, uygun bir solvent ile temas ettiğinde şişen ve bir jel matrisi oluşturan çapraz bağlı dekstran kullanılır. İkincisi, daha küçük moleküllerin tutulmasına izin veren ve daha büyük molekülleri dışarıda bırakan sonlu boyutta gözenekler içerir. Bu yöntem, biyolojik analizlerden önce yağ asitlerini, klorofil vs. ayırmak için mükemmeldir. Bu, yüksek miktardaki veya ekstraktın geri kazanılması için tahribatsız bir yöntemdir. Proteinler, polipeptitler, karbonhidratlar vb. gibi büyük moleküller için tercih edilen bir yöntemdir (Bengü, 2021).

7. Tıbbi Bitki Materyalinin Taranması İçin Gereklilikler

Biyoanaliz, bitki ekstraktlarının farmakolojik etkilerinin ve bunların etnomedikal kullanımlarının değerlendirilmesinde çok önemli bir aşamadır. Başlangıç aşamalarında *in vitro* testler, laboratuvar hayvan modellerini içeren *in vivo* çalışmalara göre önceliklidir. Bu karar genellikle bilimsel, ekonomik ve etik temellere dayanmaktadır. *In vivo* çalışmalar, araştırma projesinin sonraki aşamalarında tercih edilebilir ancak yine de, hali hazırda araçlarla veya *in vitro* çalışmalarla toplanmış olan kanıtların veya biyoaktivitenin miktarına ve niteliğine ve yaşam koşulları altında ek bilgi arayışına bağlıdır. Terapötik uygulamaya aday olan biyoaktif bileşenlerin, ilaç olarak kayıt altına alınmadan önce yine de kapsamlı klinik ve toksikolojik tarama programlarından geçmesi gerekecektir.

8. Biyoaktif Bileşiklerin Karakterizasyonu Ve Yapılarının Aydınlatılması

Biyolojik değerlendirme yapıldıktan ve doğal ürünün ayrılması tamamlandıktan sonra kimyager, bileşiğin aydınlatılması girişiminde bulunacaktır. Yapının aydınlatılması, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) 1-D ve 2-D Proton NMR'nin yanı sıra C-13 NMR, Kızılötesi (IR), Kütle Spektrometresi (MS) ve X-Ray analizi gibi klasik spektroskopik tekniklere bağlıdır. Doğanın kimyasal çeşitliliğini araştırmak için, son yıllarda yüksek verimli tarama (HTS) yöntemlerinin kullanılmaya başlanmasıyla durum çarpıcı biçimde değişti. Moleküler hedefler kullanılarak çok sayıda örnek (24 saatte 100.000'e kadar) tek bir aktivite için taranabilir. Açıkça görülüyor ki sentetik kimyagerler bu kadar çok sayıda veya yeni bileşik üretmiyorlar. Cevapları, kombinatorial kimyanın geliştirilmesi ve bu yeni katı faz kimyasal sentez yöntemleriyle elde edilen bileşik karışımlarının test edilmesiydi. HTS doğal ürünler için yeni olanaklar sunuyor. Çok sayıda ekstraktın hızlı bir şekilde taranmasına olanak tanır ve geçmişte bitki ekstraktlarındaki aktif bileşiklerle ilgili çalışmalarda en büyük darboğaz olan biyoanaliz rehberliğinde fraksiyonlama için çok uygundur. HTS ile kombinasyon halindeki güçlü kromatografik yöntemler artık ilaç geliştirmede yeni potansiyel müşterilere ulaşmanın çok etkili bir yoludur. Chemical Abstracts, NAPRALERT gibi veri tabanlarının yanı sıra Doğal Ürünler Sözlüğü'nün taranması, mevcut ve bilinen moleküllerin yeniden araştırılmasıyla zaman kaybedilmemesini sağlar. Bu veritabanları, moleküler ağırlıklardan spektroskopi verilerine kadar değişen birincil literatür bilgilerine yol açar ve bu, ortak metabolitlerin erken bir aşamada tanınmasına yardımcı olur. Biyolojik aktivitenin büyük ölçüde molekül üzerindeki fonksiyonel grupların 3 boyutlu düzenine bağlı olduğu iyi bilinen bir gerçek olduğundan, molekülün biyolojik aktivitesinin değerlendirilmesinde yapı aydınlatılması çok önemlidir.

9. İlaç Yapımına Önemli Bileşikler Veren Bitki Familyaları

Apiaceae (önceden *Umbelliferae* olarak biliniyordu): Dünyanın ılıman bölgelerinden gelen ve çoğu otsu olan yaklaşık 3000 türden oluşan bu aile, bugüne kadar kullanılan birçok yaygın baharat ve şifalı otun ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bitkiler aromatik ve uçucu yağlar bakımından zengindir.

Tıbbi olarak kullanılan yaygın şifalı bitkiler arasında şunlar yer alır:

- Kimyon (*Carum carvi*)—Şişkinliğe karşı kullanılır
- Kişniş (*Coriander sativum*)—Karminatif

- Rezene (*Foeniculum vulgare*)—Hafif Karminatif
- Anis (*Pimpinella anisum*) — Balgam söktürücü, Spazmolitik, Karminatif

Apocynaceae: Bu familya dünyanın hem ılıman hem de tropikal bölgelerinde geniş bir dağılıma sahiptir. Dünyaca ünlü türler arasında Pembe Cezayir Menekşesi (*Cath aranthus roseus*) bulunmaktadır. Bu ailenin üyeleri, güçlü farmakolojik aktiviteye sahip alkaloid içerikleriyle iyi bilinmektedir.

Araliaceae: Bu aile, dünyanın hem tropikal hem de subtropikal bölgelerinde yaygın olarak dağıtılan 700'den fazla türden oluşur. En iyi bilinen Avrupa örneği sarmaşıktır (*Hedera helix*). Bu ailenin dünyaca ünlü bir diğer türü ise Ginseng'dir (*Panax ginseng*). Tropik bölgelerde, heterofil bitkiler (aynı bitki üzerinde farklı yaprak şekilleri ve boyutlarına sahip bitkiler) olarak sınıflandırılan Araliaceae familyasının birkaç endemik türü vardır. Bu olgunun nedenleri hala bilinmiyor. Fitofarmakolojik olarak bu bitkiler saponinlerin, triterpenoidlerin ve bazı asetlenik bileşiklerin varlığıyla karakterize edilir. *Panax ginseng*, farmakolojik aktivitesini triterpenoidlere (ginsengosidler) borçludur ve *H. helix*'in sekretolitik aktivite etkisi kısmen saponinlerin (hederasaponinler) varlığından sorumludur.

Areaceae (Palmae): Neredeyse tamamı odunsu olan yaklaşık 2700 türden oluşan Palmiye familyası, gıda olarak yaygın olarak kullanılan birçok türü içermesi ve geçtiğimiz yıllarda üyelerinden en az birinin tıbbi açıdan önem kazanması nedeniyle önemli bir familyadır. Sawpalmetto (*Serenoa repens*) artık erken evrelerdeki iyi huylu prostat hiperplazisinde işeme zorluğu için kullanılıyor. Fitofarmakolojik olarak bitkinin polifenoller, bazı nispeten basit alkaloidleri (özellikle piridin türevleri) ve steroidal saponinleri ve ayrıca yağ asitlerini biriktirdiği bilinmektedir. Sawpalmetto'nun farmasötik kullanımı, nispeten büyük miktarda triterpenoid - b-sitosterolün varlığından kaynaklanıyor gibi görünüyor.

Asphodelaceae: (Bu ailenin üyeleri genellikle *Liliaceae* familyası altında gruplandırılmıştır). Yaklaşık 600 türü bulunan bu familyanın Güney Afrika'da geniş bir yayılımı vardır ve bazı türleri Akdeniz bölgelerinde de bulunmaktadır. Bu ailenin en bilinen üyeleri *Aloe vera* ve *A. ferox*'tur. *Aloe* cinsi, yapraklarda biriken polisakkaritlerin yanı sıra antranoidler ve antraglikozitlerin (aloe-emodin) varlığıyla karakterize edilir. Diğer akraba familyaların aksine *Asphodelaceae* familyası steroidal saponinleri biriktirmez.

Asteraceae: (Papatya ailesi ve daha önce *Compositae* ailesi olarak biliniyordu). Bu büyük aile yaklaşık 25.000 tür ve 1400 cinsten oluşur ve Antarktika hariç çoğu ekosistemde dağılmış ve iyi temsil edilmiştir. Fitokimyasal olarak bu aile, çok yıllık taksonlarda polisakkaritlerin aksine depo karbonhidratları olarak polifruktanların (özellikle inulin) varlığıyla karakterize edilir. Bazı taksonlarda, ailenin bazı bölümleri, birçok botanik ilacın farmakolojik aktivitesinden sorumlu olan önemli doğal ürünler olan seskiterpen laktonları (örn. *Parthenolides*) biriktirir; Ateş az (*Chrysanthemum parthenium*) ve Arnica (*Arnica montana*). Bazı taksonlar pirolizidin alkaloidlerini biriktirir; Senecio türlerinde bulunur ve bu bileşiklerin hepatotoksik etkileri bilinmektedir. Diğer taksonlar olağandışı diterpenoidleri biriktirir; Yoğun tatlı tadıyla bilinen diterpen glikozit Stevioside.

Ginkgoaceae: (Ginkgo ailesi) Bu aile belki de tohum taşıyan bitkilerin en eskisidir ve Mesozoyik'te geniş bir alana yayılmıştır. Bugün yalnızca bir tür var. Fitokimyasal olarak bu bitki, üç lakton fonksiyonuna sahip olağandışı iki halkalı diterpenoidler olan ginkgolidlerin varlığıyla karakterize edilir. Biflavonlar ve glikosile edilmiş flavonoidleri tipik doğal ürünlerin diğer gruplarıdır.

Hypericaceae: Hem ılıman hem de tropik bölgelerde dağılım gösteren yaklaşık 900 türden oluşan bu familya, üyelerinden biri olan (*Hypericum perforatum*) St. Johns Wort tarafından tanımlanmıştır. Bu bitki 20. yüzyılın en önemli şifalı bitkilerinden biri haline geldi. Fitokimyasal olarak bu ailenin bazı üyeleri reçineler, balsam içerir ve çiçekler naftodiantronlar içerir; *Hypericum* cinsinin karakteristik özelliği olan hiperisin ve psödohiperisin.

Lamiaceae: 5000'den fazla türü bulunan bu familya, tıbbi açıdan önemli ve mutfaklarda en çok katkı sağlayan türlerden biri olmuştur. Aromatikler ve aynı zamanda ticari açıdan önemli esansiyel yağlar da verirler. Bazı türler Rosmarinik asit ve diğer Kafeik asit türevlerini biriktirir. Rosmarinik asit, spesifik olmayan kompleman aktivasyonu ve lökotrienlerin inhibisyonu (anti-inflamatuar etkiye yol açan) nedeniyle farmasötik öneme sahip bir asittir.

Papaveraceae: Bu oldukça küçük aile, farmakolojik açıdan önemli çok sayıda cins üretmiştir (örn. Chelidonium, Glaucium, Papaver). Bu aile özellikle morfin, papaverin, kodein, tebain ve noskapin dahil olmak üzere izokinolin alkaloidleri açısından zengindir. Mevcut diğer alkaloidler arasında benzilizokinolin (papaverin, noskapin) bulunur.

Bu bitkilerden izole edilen bazı moleküller özellikle yararlı olmuştur ve bunlar şunlardır:

- Selidonin (Chelidonium majus)—kolagog olarak kullanılır.
- Morfin ve diğer alkaloidler (Papaver somniferum)—iyi bilinen analjezik ve güçlü narkotikler.

Piperaceae: Biber ailesi, çoğunlukla tropik bölgelerde sınırlı olan yaklaşık 2000 türden oluşan otlar ve çalınlardan oluşur. Önemli bir cins Piper'dır. Bu aile aynı zamanda piperin gibi keskin asidik amidler ve birçok üyede mevcut olan esansiyel yağlarla da karakterize edilir.

Bu bitkilerden izole edilen moleküllerden bazıları şunlardır:

- Kavain (Piper methysticum)—Okyanusya'da sinirsel kaygı durumları ile tanınır.

Rhamnaceae: Bu aile ağaçlardan oluşur ve yaklaşık 900 tür içerir. Bu ailenin önemli bir cinsi Rhamnus'tur. Bu ailenin antrakonları biriktirdiği bilinmektedir. Benzilizokinolin tipi ve siklo-peptid tipindeki alkaloidler de birçok taksondan bilinmektedir.

- Rhamnus türleri (*R. purshiana* ve *R. frangula*) güçlü müshil olarak kullanılır.

Rubiaceae: 10.000'den fazla türden oluşan bu büyük aile, en önemli uyarıcılardan biri olan kahve'yi (*Coffea arabica* ve *C. canephora*) üretmiştir. Eski Dünya'ya getirilen tıbbi açıdan önemli bir diğer tür ise Cinchona sp.'den ekstrakte edilen Cinchona kabuğudur. *Rubiaceae* familyası iridoidlerin (bir grup monoterpenoid), alkaloidlerin (Cinchona türünden Kinin gibi indol alkaloidleri dahil), kafein, teobromin, teofilin ve antranoidler gibi metilksantinlerin varlığıyla karakterize edilir.

Rutaceae: Bu familya dünya çapında yaygın olan yaklaşık 1700 türden oluşur, ancak tropik bölgeler bu türler açısından özellikle zengindir. Bu aileden belki de en bilinen örnekler portakal, limon, greyfurt, mandalina vb. içeren turunçgillerdir.

Bu aile, perikarp ve parankimdeki salgı boşluklarında bulunan uçucu yağlarla karakterize edilir. Alkaloidler de bulunur ve bunların arasında benziltetrahidroksiizokinolin, akridon ve imidazol türleri bulunur. Akridon alkaloidleri şu ana kadar yalnızca Rutaceae familyasından rapor edilmiştir. Furano- ve pirano-kumarinler ör. bergapten ve diğer basit kumarinler Citrus türlerinden izole edilmiştir.

- Pilokarpin (Pilocarpus jaborandi) oftalmolojide kullanılmaktadır.

Bu aileye ait pek çok tür parfümeride aromatik bitki olarak ve ayrıca gıda olarak kullanılmaktadır.

Solanaceae: 2600 türden oluşan bu aile, en önemli temel besinlerden bazılarını içerir: Patates (*Solanum tuberosum*) ve son derece aktif doğal ürünlerle bilinen diğer bazı tıbbi ve toksik bitkiler. Bu ailenin önemli cinsleri Atropa, Datura ve Hyoscyamus'tur. Bu cinslerden izole edilen farmakolojik olarak aktif moleküllerin bazıları şunlardır:

- Atropin (*Atropa belladonna*)
- Nikotin (*Nicotiana tabaccum*)

Zingiberaceae: Tropikal bölgelere dağılmış olan bu aile, terpenler (borneol, kamfen ve sineol (tüm oksijen içeren monoterpenler), seskiterpenler (zingiberen) ve fenil propanoid türevleri (sinnamik asit türevleri) içeren esansiyel yağlar açısından zengindir. Bu aileden önemli şifalı bitkiler şunlardır:

Zencefil (*Zingiber officinalis*) — seyahat bulantısı da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklara karşı kullanılır.

Elaiti (*Elettariacardamomum*)—baharat olarak kullanıldığı kadar ilaç olarak da kullanılır.

Zerdeçal (*Curcuma longa*) — baharat olarak kullanılır ve çoğu Asya tıbbi sisteminde iltihap ve karaciğer hastalıklarına karşı çok çeşitli hastalıklarda faydalıdır (Chandran ve ark, 2020).

10. Kanseri Önlemek İçin Kullanılan Tıbbi Bitkiler

Yasukawa (2012) doğal kaynakların, gıdaların, takviyelerin, ham ilaçların ve Kampo ilaçların (geleneksel Japon bitkisel reçeteleri) kemopreventif aktivitesini incelemiştir. Bu incelemede, kanserin kemoprevensiyonunun önemli olduğunu gözlemledi. Kanserin kemoprevensiyonu, şu anda halk sağlığı alanındaki en acil projelerden biri, karsinogenezi tersine çevirmek veya baskılamak ve invaziv kanserlerin gelişimini önlemek için spesifik doğal ve sentetik kimyasal ajanların kullanılması olarak tanımlanır. Son zamanlarda, diyetteki besleyici olmayan bileşiklerin kemo-önleyici ajanlar olarak önemli etkileri olduğu ortaya konmuştur ve bu tür bileşiklerin hayvan modellerinde kanserin kemo-önleyici etkileri üzerine önemli çalışmalar yapılmıştır. Epidemiyolojik araştırmalar, insan kanserlerinin çoğunluğunun diyet ve sigara olmak üzere iki faktörle ilişkili olduğunu göstermiştir. Ancak genel popülasyonda belirli gıdaların günlük tüketiminin de antikanser etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu, kanserin kimyasal yolla önlenmesinde diyet gibi çevresel faktörlerin önemini vurgulamaktadır (Banning, 2005). Kanserin kemoprevensiyonu için karsinogenez mekanizmalarının anlaşılması önemlidir. Kanseri önleme araştırmalarının çoğu, çok aşamalı karsinogenez kavramına dayanmaktadır. (Pitot ve Dragan (1991)]; Morse ve Stoner, 1993). Hem başlangıç hem de ilerleme aşamalarının aksine, hayvan çalışmaları yükselme aşamasının uzun bir süre boyunca ortaya çıkar ve en azından erken dönemde geri döndürülebilir. Bu nedenle tümör gelişiminin inhibisyonunun kanser kontrolünde etkili bir yaklaşım olması beklenmektedir (Murakami ve ark., 1996). Yasukawa ve ekibi, yenilebilir bitkilerden ve mantarlardan ve ham ilaçlardan elde edilen potansiyel anti-tümör destekleyicileri (kanseri kemopreventif ajanlar) araştırmasında, çeşitli triterpen alkoller, steroller ve bunların oksijenli türevlerinin, fare kulak iltihabı üzerinde engelleyici etkiler gösterdiğini buldu. 12-Otetradekanoilforbol-13-asetat (TPA). Kanserin birincil önlenmesi, kanserin gelişmesini önlemeyi amaçlar. Bu nedenle karsinogenezin başlaması ve/veya ilerlemesi engellenmelidir. Bununla birlikte yetişkin popülasyon, normal hücrelere dönüşemeyen tümör hücreleri taşır ve bu nedenle kanseri önlemeye yönelik etkili stratejiler arasında, bu hücreler ve promotörler arasında sürekli temasın önlenmesi ve/veya tümör promotör etkilerinin agresif bir şekilde inhibe edilmesi yer alır. Bu nedenle kanseri önlemek için, geri dönüşümlü ve uzun vadeli bir süreç olan tümör ilerlemesini geciktiren, inhibe eden veya bloke eden etkili bileşikler (anti-tümör destekleyicileri) içeren bitkilerin bulunması önemlidir. Bu tür ilgi çekici bitkilerin birkaç örnek aşağıda gösterilmektedir.

10.1.(*Pygeum*) *Prunus spp* (Rosaceae familyası): Afrika Erik veya Afrika Erik Ağacı

Prostat kanseri kemoprevensiyon için çok iyi bir örnektir çünkü prostat kanseri tipik olarak yavaş büyür ve genellikle yaşlı erkeklerde teşhis edilir. *Pygeum africanum* (*Prunus Africana*) kabuğunun ekstraktı, Avrupa'da benign prostat hipertrofisi (BPH) dahil olmak üzere prostat bozukluklarının önlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. Doku kültüründe, kabuğun etanolik ekstraktları (%30) PC-3 ve LNCaP hücrelerinin büyümesini inhibe etti; indüklenen apoptoz ve değişen hücre kinetiği; ERalfa ve PKC-alfa proteinini aşağı regüle etti ve hem fare uterusu östrojen reseptörlerine hem de LNCaP insan androjen reseptörlerine iyi bağlanma yeteneği gösterdi. *P. africanum* ile beslenen TRAMP fareleri, kazeinle beslenen farelere (%62,5) kıyasla prostat kanseri vakasında (%35) önemli bir azalma ($P = 0,034$) gösterdi. Bu nedenle *P. africanum*'un hem *in vitro* hem de *in vivo* prostat kanserinin düzenlenmesinde önemli bir rolü vardır ve bu nedenle prostat kanseri geliştirme riski yüksek olan kişiler için yararlı bir takviye olabilir (Shenouda ve ark.,

2007). Katz (2002), baklagiller ve diğer bitkilerde bulunan izoflavon tüketiminin, Asyalı erkekler arasında daha düşük BPH ve prostat kanseri oranlarıyla ilişkili olduğunu gözlemlemiştir (Katz, 2002). Prunus jamasakura Sieb'in metanol ekstraktı fare derisinde DMBA/TPA ile iki aşamalı karsinogenezini inhibe etti (Yasukawa ve ark., 1998). Bitkinin aktif fraksiyonundan elde edilen oktakozil ferulat, tümörün ilerlemesini inhibe ederek fare derisinde DMBA/TPA. Bileşik ayrıca histonun protein kinaz C (PKC) tarafından fosforilasyonunu konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe etti.

10.2. Rosmarinus officinalis L (Labiatae familyası): Biberiye

Kolorektal kanser, Avustralya'da kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Ngo ve ark. (2011), 1996'dan Mart 2010'a kadar yayınlanan ve biberiye'nin kolorektal kanser ve diğer kanser türleri üzerindeki koruyucu etkilerini inceleyen tüm araştırmalardan elde edilen bilimsel kanıtları gözden geçirdi. Hayvan ve hücre kültürü çalışmalarından elde edilen kanıtların, biberiye ekstraktının antikanser potansiyelini ve aynı zamanda sadece aşağıdaki bileşenlerini gösterdiği sonucuna vardılar: karnosol, karnosik asit, ursolik asit ve rosmarinik asit. Bildirilen antikanser özelliklerinin, kanser gelişiminin çok aşamalı sürecindeki, doza bağlı olan ve dokuya veya türe özgü olmayan moleküler değişiklikler yoluyla ortaya çıktığı bulunmuştur. López-Jiménez (2013), karnosol ve karnosik asidin anti-anjiyojenik aktivitesinin, biberiye ekstraktlarının kemopreventif, antitümör ve antimetastatik aktivitelerine katkıda bulunabileceğini göstermiş ve bunların, anjiyogenezle ilişkili diğer malignitelerin tedavisinde potansiyellerini ileri sürmüştür. Ursolik asit ve karnosol, Biberiye'nin metanol ekstraktından izole edildi ve fare derisinde DMBA/TPA'nın desteklediği iki aşamalı karsinogenezini inhibe etti (Huang ve ark., 1994).

10.3. Vitis vinifera L. (Vitaceae familyası): Üzüm

Antioksidan özelliklerden zengin gıdaların diyetle alınmasının kanserden koruyucu olduğu ileri sürülmektedir. Antioksidan özellikler açısından zengin besinler arasında üzüm (*Vitis vinifera*) bulunur. Üzüm kabuğu ve çekirdeği ekstraktları güçlü serbest radikal temizleme ve şelatlama aktiviteleri sergiler ve in vitro çeşitli gıda ve hücre modellerinde lipid oksidasyonunu inhibe eder. Üzüm antioksidanlarının kullanımı, epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) ve onun aşağı akış yollarını hedef alarak, COX-2 ve prostaglandin E2 reseptörlerinin aşırı ekspresyonunu inhibe ederek veya östrojen reseptör yollarını değiştirerek, hücre oluşumuna neden olan, geniş bir yelpazedeki kanser hücrelerine karşı umut vericidir. döngünün durdurulması ve apoptoz (Zhou ve Raffoul, 2012). Filip ve ark. (2011), SKH-1 fare derisinde iki doğal ürünün ultraviyole B kaynaklı oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki fotokoruyucu etkileri üzerine yaptıkları çalışmalarda, sonuçlarının *Calluna vulgaris* ve *Vitis vinifera* ekstraktlarının UV kaynaklı riski azaltmak için kemopreventif adaylar olabileceğini öne sürdüğünü bildirmişlerdir. cilt kanseri için. Kuş üzümü ve Sultaniye (*Vitis vinifera* L.), Yunanistan'da üretilen kurutulmuş asma ürünleridir (Kaliora ve ark. 2008). Yunanistan'daki üç farklı kökene sahip kuş üzümünden (Vostizza, Nemea ve Messina) elde edilen metanol ekstraktlarının ve ayrıca Girit adasında yetiştirilen sultani üzümünden elde edilen metanol ekstraktlarının mide kanserini önleyici aktivitesinin hücre çoğalmasının inhibisyonu, apoptoz ve inflamasyonun inhibisyonu. 500 mikrogram kurutulmuş kuru üzümünden elde edilen tüm ekstraktlar, önemli ölçüde Girit, Sultanas'tan ve Nemea'dan elde edilen kuş üzümleri olmak üzere, baskılanmış hücre proliferasyonu üzerinde çalışıldı. Fransızlar daha yüksek düzeyde hayvansal yağ tüketiyor ancak kalp hastalığı vakaları şaşırtıcı derecede düşük kalıyor. Bu 'Fransız Paradoksu'nun, kırmızı şarap tüketiminden elde edilen faydalardan kaynaklandığı düşünülüyor. Üzümlerin etanol ekstraktı, fare derisinde DMBA/TPA tarafından tümör oluşumunu engelledi. Resveratrol, doza bağlı bir şekilde, görünür hepatosit nodüllerinin görülme sıklığını, toplam sayısını ve çokluğunu azaltmıştır (Bishayee ve Dhir, 2009). Öte yandan üzüm çekirdeği monomerik, dimerik ve oligomerik proantosiyanidinler açısından zengin bir kaynaktır. Üzüm çekirdeğinin

polifenolik fraksiyonu, fare derisinde DMBA/TPA tarafından tümör oluşumunu baskıladı (Zhao ve ark., 1999).

10.4.Glycine max veya G. soya (Family Leguminosae): Soya sütü

Soya fasulyesinde en çok bulunan fitoöstrojen olan genistein, östrojen reseptörlerine bağlanarak antikanser aktiviteleri gerçekleştirebilir. Koryokarsinom, plasentanın malign, trofoblastik ve agresif bir kanseridir. Liu ve arkadaşları (2011), genisteinin, koryokarsinom hücre dizisi JAR'ın istilacı potansiyeli üzerindeki etkisini ve bunun altında yatan mekanizmayı araştırdı ve genisteinin, bir matrigel istila tahlili ile JAR hücre istilasını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini buldu. Bulgularının koryokarsinomun önlenmesi ve tedavisi için önemli etkileri vardır. Ancak Khan ve arkadaşları (2012), Soya izoflavon tüketiminin meme kanseri gelişimine karşı koruyabileceği hipotezini test etti.Meme kanserini önleme konusunda etkinlik eksikliği ve menopoz öncesi kadınlarda olası bir olumsuz etki buldular. Soya sütü, sıçanlarda 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon kaynaklı meme karsinogenezini inhibe etti (Ohta ve diğerleri, 2000). Soya fasulyesi yüksek miktarda izoflavonoid ve saponin içerir; izoflavonoidlerin fitoöstrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Katz, 2002).

10.5.Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae familyası): Zencefil

Zencefilin keskin bir bileşeni olan dehidrozingeron bir vanilil ketondur. Yapısal olarak, kolon kanseri de dahil olmak üzere kötü huylu tümörlerin inhibisyonu için umut verici bir fitokimyasal olan kurkuminin kimyasal yapısının yarısını temsil eder.Yogosawa ve ark. (2012), dehidrozingeronun HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif etkilerini değerlendirmiş ve p21'in yukarı regülasyonu ile G2/M fazında büyümeyi doza bağlı olarak inhibe ettiği bulunmuştur.Dehidrozingeron ayrıca hücre içi ROS birikimine yol açtı, ancak çoğu radikal temizleyici G2/M fazındaki hücre döngüsü durmasını net bir şekilde bastıramadı. Sonuçları, dehidrozingeron analoglarının kolon kanseri için potansiyel kemoterapötik ajanlar olabileceğini düşündürmektedir (Škrovánková, 2012).Kurapati ve ark. (2012), Curcuma longa ve Zingiber officinale'nin PC-3M prostat kanseri hücre dizisi üzerindeki kombinatoriyal sitotoksik etkilerini araştırmıştır. İki ekstrakt ayrı ayrı koloni oluşturma yeteneği üzerinde önemli engelleyici etkiler gösterdiği tespit edildi. Bununla birlikte, her iki ajan da aynı konsantrasyonlarda birlikte test edildiğinde, birleşik etkiler tek tek etkilerden çok daha anlamlıydı; bu da birden fazla bileşenin rolünü ve bunların sinerjistik etki tarzını daha güçlü faydalı etkiler ortaya çıkarmak için öne sürüldü.Zingiber officinale'den ekstrakte edilen heksahidrokurkuminin kolorektal kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğu Chen ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (2011). SW480 hücrelerinin heksahidrokurkumin (100 µM) ile işlenmesi, hücre döngüsünün G1/G0 fazında hücrelerin büyük miktarda birikmesiyle sonuçlandı. Bu bileşiğin kanserin önlenmesinde faydalı olduğu kanıtlanabilir.Çeşitli baharatların çeşitli kanserlere ve mide ülserine karşı koruyucu ve/veya önleyici etkinliği Sumbul ve ark. , Sung ve ark. (2012) tarafından incelenmiştir (2011).

11.Besin Takviyeleri

11.1.Allium cepa ve A. sativum (Liliaceae familyası): Soğan ve Sarımsak

Antony ve Singh (2011), Allium türlerinden ekstrakte edilen diyalil trisülfid (DATS) yoluyla kanserin kemopreventif mekanizmalarını ve hedeflerini incelerken Zhou ve diğerleri (2011), tüm çalışmaların analizlerini bir araya getirdikleri bir meta-analizde şu sonuca vardı: Allium sebzelerinin büyük miktarlarda tüketimi (en yüksek ve en düşük tüketim grupları karşılaştırıldığında) mide kanseri riskini azaltmıştır.Allium sativum (sarımsak) ve onun kimyasal bileşenlerinin, özellikle Allisin, Diallyl Disülfid, Diailil Trisülfid'in akciğer kanseri ve meme kanseri için kemopreventif ajanlar olduğu son çalışmalarda da gösterilmiştir (Li ve ark., 2012). Allisin ayrıca Wang ve ark. tarafından da zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde EL-4

hücrelerinde apoptozu indüklemek için mitokondriyal yolun merkezi bir rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Soğan yağı, fare derisinde DMBA/TPA (Perchell et al., 1990) ve BP/kroton yağı (Sadhana ve diğerleri, 1988) ile tümör ilerlemesini inhibe ederken, sarımsak yağı, fare derisinde DMBA/TPA tarafından tümör ilerlemesini inhibe etti.

11.2. Panax ginseng C.A. Mayer (Aile Araliaceae): Ginseng

Li ve diğerleri. (2012), Panax ginseng kökünden elde edilen ve molekül ağırlığı $3,5 \times 10^5$ Da olan homojen bir polisakarit (PGPW1) tanımladı. PGPW1, 3,3:1,2:0,5:1,1 molar oranında Glikoz, Galaktoz, Mannoz ve Arabinoz içeriyordu. Doza bağlı olarak güçlü anti-proliferasyon ve anti-metastatik aktiviteler sergiledi. Ayrıca PGPW1 tarafından T24 hücrelerinin yüzeyindeki M3 muskarinik reseptörünün zayıflatılmış ekspresyonunun antitümör fonksiyonlarına katkıda bulunacağını bulmuşlardır. Tüm veriler, mesane kanseri metastazının önlenmesi ve tedavisi için klinik uygulama potansiyelini gösterdi. Dong ve ark. (2011), yapı aktivite ilişkisini belirlemek amacıyla ginsenosidlerin ve bunların sentetik türevlerinin çeşitli kanser hücrelerine karşı sitotoksik potansiyelini değerlendirmiştir. Sonuçlar, daha az polar kimyasal yapıya sahip bileşiğin, kanser hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu açıkça gösterdi. Kendi halinde ginsenosid Rp1 üzerine araştırma, Kang ve ark. (2011) meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hem ankraj bağımlı hem de bağımsız meme kanseri hücre koloni oluşumunu inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ek olarak Rp1, döngü durmasını ve apoptoz aracılı hücre büyümesinin baskılanmasını indükledi. Rp1 ayrıca meme kanseri hücrelerinde IGF-1R proteininin stabilitesini de azalttı. Bu nedenle Rp1'in bir antikanser ilacı olarak potansiyele sahip olduğunu ve IGF-1R'nin meme kanserinin tedavisi ve önlenmesinde önemli bir hedef olduğunu öne sürdüler. Amerikan ginsenginin, ülseratif kolitin azoksimetan (AOM)/dekstran sülfat sodyum (DSS) fare modeli kullanılarak test edildiğinde, ginseng'in kolit ile ilişkili kolon kanserini baskılayabildiğini gösterdiklerini bulmuşlardır. Beyaz ve kırmızı ginseng'in (Panax ginseng C.A. Mayer) ağızdan uygulanması, sıçanlarda 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile kolon karsinogenezini baskıladı (Fukushima ve diğerleri, 2001). Ginsenosidler Rg3, Rg5 ve Rh2, ginsengdeki aktif bileşenlerdir ve kanserin önlenmesinde tek başına veya sinerjistik olarak etki eder (Yun ve ark., 2001). San-chi ginseng'in (P. notoginseng (Burk.) F.H. Chen) metanol ekstraktı, farelerde DMBA/TPA ile cilt karsinogenezini, DEN/Fenobarbital ile karaciğer karsinogenezini, 4NQO/gliserol ile akciğer karsinogenezini baskıladı. Ayrıca, san-chi'nin metanol ekstraktı, farelerde NOR-1/TPA'nın yanı sıra DMBA/fumonisin B1'in neden olduğu cilt karsinogenezini de inhibe etti. Ginsenosid Rg1, fare derisinde DMBA/TPA tarafından tümör oluşumunu hafifçe bastırıldığı gözlenmiştir (Konoshima ve ark., 1999). Sonuç olarak bilim dünyası bitkiler aleminde insanoğluna faydalı ürünler bulabilmek için çalışmaya devam etmektedir. Her geçen gün dünyanın farklı yerlerinde yeni ve faydalı bitkisel ürünlerin bulunacağına inancımız tamdır.

12.KAYNAKLAR

- Bengü, A. Ş. (2021). HPLC Tekniği ve Kullanım Alanları, Bingöl Üniversitesi Sağlık Dergisi, 2 (1), 64-69.
- Bishayee, A., Dhir, N. (2009). Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 131-144.
- Cheng, J. T. (2000). Drug therapy in Chinese traditional medicine. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 40(5), 445-450.
- Djordjevic, S. M. (2017). From medicinal plant raw material to herbal remedies. *Aromatic and Medicinal Plants: Back to Nature*, 25, 269-288.
- Dong, H., Bai, L.P., Wong, V.K., Zhou, H., Wang, J.R., Liu, Y., Jiang, Z.H., Liu, L. (2011). The in vitro structure-related anti-cancer activity of ginsenosides and their derivatives. *Molecules*. 16(12),10619-10630.
- Filip, A., Daicoviciu, D., Clichici, S., Mocan, T., Muresan, A., Postescu, I.D. (2011). Chemopreventive effects of *Calluna vulgaris* and *Vitis vinifera* extracts on UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *J Med Food*. 14(7-8),761-766.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Hirayama, T. (1984). Epidemiology of stomach cancer in Japan. With special reference to the strategy for the primary prevention, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 14 (2),159-168.
- Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Lou, Y.R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D., Conney, A.H (1994). Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid, *Cancer Research*. 54(3):701-708.
- Inoue, M., Hayashi, S., Craker, L. E. (2019). Role of medicinal and aromatic plants: Past, present, and future. *Pharmacognosy-medicinal plants*, 1-13.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, 7(1), 1-7.
- Kaliora, A.C., Kountouri, A.M., Karathanos, V.T., Koumbi, L., Papadopoulos, N.G., Andrikopoulos, N.K. (2008). Effect of Greek raisins (*Vitis vinifera* L.) from different origins on gastric cancer cell growth. *Nutr Cancer*, 60(6),792-799.
- Kang, J.H., Song, K.H., Woo, J.K., Park, M.H., Rhee, M.H., Choi, C., Oh, S.H. (2011) Ginsenoside Rp1 from *Panax ginseng* exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the IGF-1R/Akt pathway in breast cancer cells. *Plant Foods Hum Nutr*, 66(3),298-305.
- Katz, A.E. (2002). Flavonoid and botanical approaches to prostate health. *J Altern Complement Med*, 8(6),813-821.
- Khan, S.A., Chatterton, R.T., Michel, N., Bryk, M., Lee, O., Ivancic, D., Heinz, R., Zalles, C.M., Helenowski, I.B., Jovanovic, B.D., Franke, A.A., Bosland, M.C., Wang, J., Hansen, N.M., Bethke, K.P., Dew, A., Coomes, M., Bergan, R.C. (2012). Soy isoflavone supplementation for breast cancer risk reduction: a randomized phase II trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5(2),309-319.
- Konoshima T, Takasaki M, Tokuda H (1999). Anti-carcinogenesis activity of the roots of *Panax notoginseng*. II, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 22(10):1150-1152.
- Kurapati, K. R. V., Samikkannu, T., Kadiyala, D. B., Zainulabedin, S. M., Gandhi, N., Sathaye, S. S., Nair, M. P. (2012). Combinatorial cytotoxic effects of *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* on the PC-3M prostate cancer cell line. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 23(4), 139-146.

- Li, W., Tian, H., Li, L., Li, S., Yue, W., Chen, Z., Qi, L., Hu, W., Zhu, Y., Hao, B., Gao, C., Si, L., Gao, F. (2012). Diallyl trisulfide induces apoptosis and inhibits proliferation of A549 cells in vitro and in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44(7),577-583.
- López-Jiménez, A., García-Caballero, M., Medina, M.Á., Quesada, A.R. (2013). Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur J Nutr*, 52(1),85-95.
- Morse, M.A., Stoner, G.D. (1993). Cancer chemoprevention: principles and prospects, *Carcinogenesis*, 14(9),1737-1746.
- Murakami, A., Ohigashi, H., Koshimizu, K. (1996). Anti-tumor promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(1),1-8.
- Ngo, S.N., Williams, D.B., Head, R.J. (2011). Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 51(10),946- 954.
- Perchellet, J.P., Perchellet, E.M., Belman, S. (1990). Inhibition of DMBA-induced mouse skin tumorigenesis by garlic oil and inhibition of two tumor-promotion stage by garlic and onion oils. *Nutrition and Cancer*, 14(3-4),183-193.
- Petrovska, B.B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6 (11), 1
- Pitot, H.C., Dragan, Y.P. (1991). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *The FASEB Journal*, 5(9) ,2280-2286.
- Saganuwan, A.S. (2010). Some medicinal plants of Arabian Peninsula. *J. Med. Plants Res*, 4(9), 766-788.
- Shenouda, N.S., Sakla, M.S., Newton, L.G., Besch-Williford, C., Greenberg, N.M., MacDonald, R.S., Lubahn, D.B. (2007). Phytosterol *Pygeum africanum* regulates prostate cancer in vitro and in vivo. *Endocrine*,Feb,31(1),72-81.
- Škrovánková, S., Mišurcová, L., Machů, L. (2012). Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Adv Food Nutr Res*, 67,75-139.
- Sumbul, S., Ahmad, M.A., Mohd, A., Mohd, A (2011). Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *J Pharm Bioallied Sci*, 3(3),361-367.
- Sung, B., Prasad, S., Yadav, V.R., Aggarwal, B.B. (2012). Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. *Nutr Cancer*, 64(2),173-197.
- Yasukawa, K. (2012). Medicinal and edible plants as cancer preventive agents. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*, 181-208.
- Yogosawa, S., Yamada, Y., Yasuda, S., Sun, Q., Takizawa, K., Sakai, T. (2012). Dehydrozingerone, a Structural Analogue of Curcumin, Induces Cell-Cycle Arrest at the G2/M Phase and Accumulates Intracellular ROS in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *J Nat Prod*, 75 (12),2088-2093.
- Yun, T.K., Lee, Y.S., Lee, Y.H., Kim, S.I., Yun, H.Y. (2001) Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds. *Journal of Korean Medical Science*,16 Suppl,S6-S18.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., Agarwl, R. (1999) Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the Mouse skin two-stage initiation-promotin protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*,20(9),1737-1745.
- Zhou, K., Raffoul, J. J. (2012). Potential anticancer properties of grape antioxidants. *Journal of oncology*, 2012.

BÖLÜM 4

KOBALT, TOKSİSİTESİ ve METABOLİK ETKİLERİ

Doç. Dr. Sevinç AYDIN

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051742>

1.GİRİŞ

Kobalt, hayvanlarda protein kaynağı olarak kabul edilen kobalaminin kritik bileşeni olarak bilinmekle birlikte (Jonas ve ark., 2019), hem ağır metal hem de eser element gibi davrandığından iki farklı şekilde özellik gösterebilmektedir (Collins ve ark., 2010). Atom numarası 27 olup, doğal olarak kayalarda, toprakta, suda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan temel bir eser elementtir. B12 vitamininin (kobalamin) önemli bir bileşeni olduğu için çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (Simonsen ve ark., 2012; Leyssens ve ark., 2017; Paustenbach ve ark., 2012) (Şekil 1).



Şekil 1. Metal formdaki kobalt (Vikipedi, 2021)

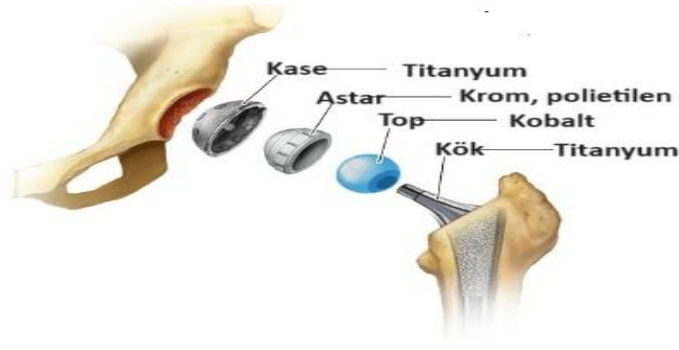
B12 vitaminin kırmızı kan hücrelerinin, trombositlerin, yağ asidi sentezi ve enerji üretiminin düzenlenmesi gibi önemli görevlerinin yanında hayvanlarda protein kaynağı olarak kabul edildiğini hatırlatırsak kobaltın önemi daha iyi anlaşılabilir (Jonas ve ark., 2019). Ayrıca B12 vitamini kompleksinin ayrılmaz bir bileşeni olan bu element, dehidrojenazlar, dehidratazlar, hidratazlar, mutazlar ve transferazlar gibi çeşitli enzimler için ise kofaktör olduğu için aynı zamanda insanlar da dahil olmak üzere hayvanlar için temel bir besindir (Lehninger ve ark., 1993). Diğer taraftan, iz element özelliğinin yanında ağır metal olarak da etki etme özelliğine sahip olduğundan (Collins ve ark., 2010), aşırı kobalt alımı ya da birikimi sonucu çoklu organ sistemlerini etkileyerek sistemik toksisite oluşumuna sebep olabilir. Sınır değerleri net olarak belirlenmemiş olsa da kobalt toksisitesine bağlı yan etkilerin genellikle 7 µg/L veya daha yüksek seviyelerde meydana geldiğine inanılmaktadır (Paustenbach ve ark., 2013; Kao ve ark., 2015). Sağlıklı insan beyninin 50-70 ng/g kobalt içerdiği bildirilmektedir (MacPherson ve ark., 2003). Veasey ve arkadaşları yetişkin bir fare beyninin 62 ± 7 ng kobalt/g yaş ağırlığında kobalt içeriğine sahip olduğunu bildirirken (Veasey ve ark., 2013), yetişkin sıçandaki kobalt konsantrasyonunun ise 100 ng/g olduğu tahmin edilmektedir (Fayed ve Gad 2011). Toksik ajanların bir sınıfı olan metaller, maruz kalınması bakımından en yüksek orana sahiptir. Kobaltın dahil olduğu ağır metaller esas olarak alaşımlar, pigmentler (Edel ve ark., 1994), çömlek, seramik ve cam (Kechrid ve ark., 2006) üreten endüstrilerinden çevreye boşaltılmaktadır. Kobalt ayrıca herbisit üretiminde de kullanılır ve bu formdaki etkilerini arttırmak için oksin herbisit triklopir ile birleştirilir. (Morré ve ark., 2004). Ayrıca diğer bir herbisit olan 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D) dimetilamin tuzunun su içerisinde hümik asit varlığında parçalanması için ^{60}Co izotopu kullanılmaktadır (Camposa ve ark., 2003). Gelişimin önemli aşamalarında

güvenli bir kobalt maruziyeti düzeyi henüz tanımlanmamıştır. Kobaltın anneden plasenta yoluyla fetüse, süt yoluyla da yeni doğanlara aktarıldığı bilinmektedir (Van Bruwaene ve ark., 1984; Byczkowski ve ark., 1994; Kratchler ve ark., 1998). Ağır metal olarak kobaltın, glial hücreler de dahil olmak üzere birçok hücre tipi için toksik olabileceği (Yang ve ark., 2004) ve apoptoz ve nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olabileceği (Huk ve ark., 2004), aynı zamanda DNA parçalanmasına (Zou ve ark., 2001) ve kaspazların aktivasyonuna da neden olabileceği (Zou ve ark., 2002) rapor edilmiştir. Bununla birlikte doğum sonrası erken dönemlerde kobalt toksisitesinin biyokimyasal mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır. Aşırı kobalt seviyelerine bağlı olarak gelişen sistemik toksisite kaynaklı periferik nöropati, görme kaybı, sensörinöral işitme kaybı, bilişsel gerileme, kardiyomiyopati, hipotiroidizm, zayıflık, yorgunluk ve polisitemi gibi gerek sinir sistemi ile ilişkili ve gerekse diğer metabolik bozukluklar bildirilmiştir (Bradberry ve ark., 2014; Harris ve ark., 2015; Rizzetti, 2009; Devlin, 2013, Tower, 2010). Ayrıca, kobaltın genotoksik ve kanserojen olduğu (Lison ve ark., 2001; De Boeck ve ark., 2003) ve apoptoz ve nekroz yoluyla hücre ölümünü tetiklediği rapor edilmiştir (Petit ve ark., 2004; Catelas ve ark., 2005). Kobalt ve bileşiklerinin sinir sistemi üzerindeki etkisini, nöral hücre ölümüne, nörotransmitter eksikliklere ve sinaptik iletimin inhibisyonuna, reaktif oksijen türleri üretimine neden olarak gösterdiği bildirilmiştir (Catalani ve ark., 2012). Reaktif oksijen türlerinin üretilmesinin nedeni ise ağır metal toksisitesinin ana mekanizmalarından biri oksidatif stresin oluşmasıdır. Ve ağır metal toksisitesinin ana sebebinin oksidatif stres olduğu bilinmektedir (Jomova ve Valko, 2011). Kobaltın neden olduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS) ise prolihidroksilazların inaktivasyonu veya genellikle hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasıyla ilgili olan sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla olduğu düşünülmektedir (Triantafyllou ve ark., 2006). Kobaltın metal toksisitesinin oksidatif stresle ilişkili olduğu (Jomova ve Valko, 2011) ve kobaltın neden olduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS) (Triantafyllou ve ark., 2006) hücrel aktivitelere vereceği zararı düşünülerek birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların sonuçlarını bu çalışma ile karşılaştırıp analiz etmeyi amaçladık.

2. Kobalt Maruziyeti Ve Etkileri

Kobalta (Co) maruz kalmanın ana kaynakları; gıda ve içme suyudur. Ancak son yıllarda teknolojik ve diğer insan kaynaklı faaliyetleri çevredeki Co düzeylerini önemli ölçüde artırdı. Bu maruziyetin özellikle bebeklerde ve çocuklarda ciddi sağlık riskleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Leyssens ve ark., 2017; Paustenbach ve ark., 2013). Birçok çalışmada kobalta maruz kalmanın vücudun neredeyse tüm ana organları üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu rapor etmiştir (Leyssens ve ark., 2017; Linna ve ark., 2020). Ayrıca Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından kobaltın insanlar için kanserojen olarak sınıflandırılmasıyla (Wild ve ark., 2009) birlikte kobalt maruziyeti, sağlık riskleriyle ilişkili küresel bir çevre sorunu haline gelmiştir. Birçok veri ile kobalta maruz kalmanın muhtemelen nörolojik hasarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tang ve ark., 2020a; Zheng ve ark., 2021; Monnot ve ark., 2021). Yapılan araştırmalar gelişmekte olan beynin savunmasının oldukça zayıf olduğunu göstermiştir. Bunun nedeninin olgunlaşmamış kan-beyin bariyerinin metal toksisitesine karşı koruyucu olmadığı ve onu sızdıran hale getirdiği ileri sürülmüştür (Saunders ve ark., 2012). Ayrıca gelişmekte olan serebral damarların daha kırılğan olduğu ve koruyucu mekanizmaların daha zayıf olması kobaltın beyne girmesini kolaylaştırır. Beyne giren kobaltın ise sinir hücrelerinin ölümünü, nörotransmitter eksikliklerini ve sinaptik iletimi engellediği ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetiklediği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Catalani ve ark., 2012). Bununla birlikte, oksidatif stresin olumsuz sonuçlarına karşı hücreler etkili mekanizmalar geliştirmiştir. Örneğin, serbest radikal temizleyicilerinin enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonları (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve glutatyon (GSH) ve karotenoidler (CAR) gibi) hücrel oksidasyonları en aza indirir ve bu antioksidan bileşikler metal kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) kontrolünde önemli bir rol oynayabilir

(Weckx ve Clijsters, 1996).Akinrinde ve ark. (2016) kobalt klorürün kalp ve böbrek dokusunda neden olduğu toksik etkiye karşı *Ocimum gratissimum* (COG) ve gallik asitin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmanın sonunda, CoCl_2 'ün tek başına verildiği grupta; oksidatif stres parametrelerinde (hidrojen peroksit, (H_2O_2) ve malondialdehit (MDA) önemli artışların olduğu ve hem kalp hemde böbreklerde apoptotik başlatıcı kaspaz 8 ekspresyonunda artışa neden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca yine iki dokuda indirgenmiş glutatyonda (GSH) önemli azalma bir olduğunu, böbreklerdeki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde azalma ve Glutasyon S-transferaz (GST) ve katalazda (CAT) ise artışlar olduğunu rapor etmiştir. Çalışmanın devamında COG ve gallik asit tedavisi gruplarında ise; H_2O_2 ve MDA düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı, kaspaz 8 ekspresyonunda azalma ve GSH seviyeleri, GPx, SOD ve CAT aktivitelerinde kalp ve böbreklerde değişen derecelerde iyileşmenin olduğunu bildirmiştir (Akinrinde ve ark., 2016).Yapılan birkaç çalışmada ise toksik metallere maruz kalmanın yetişkinlerde D vitamini (D3 ve D2) durumu üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini gösterilmiştir (Chalkley ve ark., 1998; Chen ve ark., 2020; Dongre ve ark., 2013; Mazumdar ve ark., 2017). Yemlerine kobalt takviyesi yapılan gebe koyunların döllerindeki E vitamininin değişiminin incelendiği bir çalışmanın sonunda; gebeliğin son 3 haftasında yüksek düzeyde kobalt takviyesi yapılan grupta doğumdan 72 saat sonra serum E vitamini konsantrasyonunun olumsuz etkilendiği bildirilmişlerdir (Boland ve ark., 2008). Lee ve ark. yaptıkları bir çalışmada, kobaltın mantarlar üzerinde sterol sentezi üzerindeki etkisini incelemişler ve kobaltın ergosterolün sentezinde birkaç enzimatik adımda kusurlara yol açtığını rapor etmişlerdir (Lee ve ark., 2007). Mantarlarda gözlenen bu duruma benzer şekilde memeli sistemlerinde de kobaltın düşük oksijen koşullarında abiyokimyasal ve moleküler tepkiyi indüklediği bildirilmiştir. (Goldberg ve ark., 1987; Wang ve Semenza, 1993; Wang ve ark., 2000; Grasselli ve ark., 2005). Bu değişime sebep olarak, kobaltın oksijen gerektiren enzimleri doğrudan inhibe ederek hipoksiyi gerçekleştirmesi şeklindeki raporlar gösterebiliriz (Lee ve ark., 2007). Yapılan bir başka çalışmada ise kobalt uygulamasının kan üzerindeki etkisinin trigliseritlerde, kolesterolde ve serbest yağda bir artış olduğunu göstermiştir (Taylor ve Marks, 1978).Co'un plasenta ve anne sütü yoluyla taşınarak ve bebeklerde geçici veya kalıcı beyin hasarına neden olduğu rapor edilmiştir (Kratchler ve ark., 1998; Garoui ve ark., 2013). Gelişmekte olan embriyo ve yeni doğan bebeklerin merkezi sinir sisteminin (MSS), çevresel faktörlerin etkisine daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, kobalt klorüre (CoCl_2) maruz kalan emziren farelerde nöronal nekroz özellikleriyle birlikte serebral ve serebellar histopatolojik değişiklikler bildirilmiştir (Petrova ve ark., 2019).Kobaltın ve türevleri olan bileşiklerin sinir hücrelerinde ölüme, nörotransmitter eksikliklere ve sinaptik iletişimin engellenmesine, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve davranışsal değişikliklere neden olduğunu gösteren veriler rapor edilmiştir (Catalani ve ark., 2012).Kobalt ortopedik amaçlı olarak da kullanılan bir metal olup bu kullanımı giderek daha da artmaktadır (metal-metal kalça protezlerinde olduğu gibi) (Şekil 2), ancak son zamanlarda kullanımı hastalarda titreme, koordinasyon bozukluğu, bilişsel gerileme, depresyon, işitme kaybı ve görme gibi ilişkili nörolojik bozukluklar nedeniyle eleştirilere maruz kalmıştır. (Keegan ve ark., 2019; Mao ve ark., 2011). Metal üzeri metal kalça protezleri olan hastaların dolaşımındaki yüksek kobalt seviyeleri, son zamanlarda sinir sistemi de dahil olmak üzere farklı vücut sistemlerine yönelik kobalt toksisitesine olan ilginin artmasına neden olmuştur (Catalani ve ark., 2012).

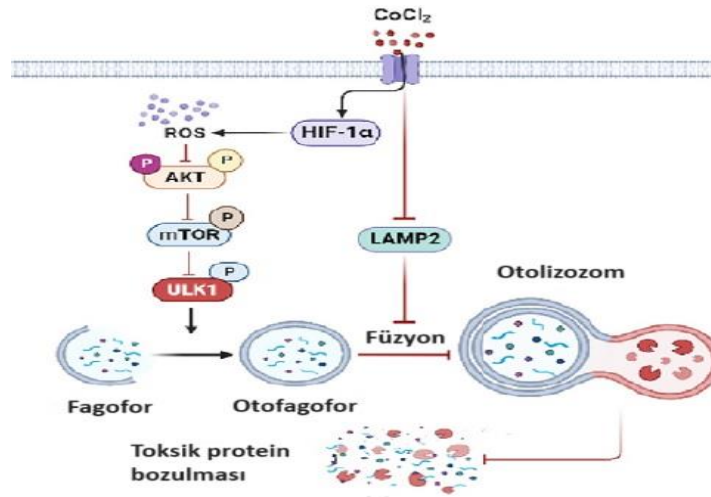


Şekil 2. Kalça protezinin bileşenleri arasında kobalt topunun kullanımı (Garcia ve ark., 2020)

Kobalta ilgili olarak önemli diğer bir konu olan Kobalt'a kronik mesleki maruziyet sonucu hasta olan bireylerde ve ayrıca kobalt klorür ile uzun süreli anemi tedavisi gören kişilerde ise nörolojik semptomların görüldüğü de tanımlanmıştır (Catalani ve ark., 2012). Bir çalışma ile kobalt klorüre maruz bırakılan sıçanlarda, iki fenolik bileşik olan Luteolin ve Gallik asit'in kobalt kaynaklı nörotoksitenin tersine çevrilmesinde rol oynayan olası mekanizmaları araştırılmış, elde edilen bulgular, CoCl_2 'e (150 mg/kg) 7 gün boyunca maruz kalan sıçanlarda nöro-davranışsal, oksidatif, inflamatuvar, kolinerjik tepkilerde önemli değişiklikler meydana geldiği görülmüş, ayrıca, bu çalışma, merkezi sinir sisteminin motor koordinasyon merkezinde kobalt uygulamasının neden olduğu gözle görülür değişiklikler olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada, CoCl_2 uygulanmasının ön ayaklarda duyu-motor bozukluğa neden olduğu ve sıçanların asılı kalma kabiliyetini önemli ölçüde azalttığı da gösterilmiştir. Ancak, çalışmanın devamında, luteolin ile tedavi sonrasında ön ayaklardaki motor koordinasyonunun yeniden sağlandığı gösterilmiştir (Akinrinde ve Adebisi, 2019).

3. Kobaltın Kimyasal Mekanizması Ve Metabolizmaya Etkisi

Oksidatif stres, ağır metal toksisitesinin temel mekanizmalarından birisidir (Jomova ve Valko, 2011). Kobaltın oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS), prolin hidrosilazların inaktivasyonu veya genellikle hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasında rol oynayan sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla HIF-1 α 'yı arttırabileceği öne sürülmüştür (Triantafyllou ve ark., 2006) (Şekil 3).



Şekil 3. CoCl_2 kaynaklı nörodejenerasyonu takiben otofaji kusurlarını şiddetlendirmek için ROS aşırı üretimini tetiklemede HIF-1 α 'nın rolü (Tang ve ark., 2023)

Ayrıca, kobaltın demir metabolizmasında yer alan etkin metabolik yollar üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Demirin (Fe) normal nörolojik fonksiyon için gerekliliğinden tutunda beyinde oksijen taşınması, oksidatif fosforilasyon, nörotransmitter sentez, miyelinasyon ve hücre bölünmesi gibi birçok önemli süreçte görev aldığı bildirilmiştir (Ward ve ark., 204; Moos ve ark., 2007). Gelişmekte olan beyinin demir durumundaki değişikliklere karşı hassas olduğu, Fe'in eksikliğinin ya da aşırısının nörogelişim üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu bildirilmiş (Georgieff, 2006), bu durum da kobaltın bu metabolizmada ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde olgunlaşmamış beynin yüksek metabolik gereksinimi yine büyük miktarlarda Fe gerektirir. Beyin bu süreçte, sistemik dolaşımdan demiri alır ve Fe homeostazisi, kan beyin bariyeri (KBB) ve beyin beyin omurilik sıvısı (BOS) bariyeri dahil olmak üzere beyin bariyer sistemleri tarafından düzenlenir. Demir, beyin mikrodamarlarını kaplayan endotel hücreler veya ventrikülleri kaplayan ependimal hücreler yoluyla beyne giriş yapar (Mills ve ark., 2010). Kobalt iyonları ise oksijen homeostazisinin düzenlenmesinde ve hipoksiye yanıtta anahtar enzimler olan prolin hidroksilazlardaki demir iyonlarının yerini ama eğilimi gösterir. Buradaki oksijen dağıtımı ile demir bulunabilirliği arasındaki sıkı ilişki, hipoksik koşullar altında O₂ algılamada ve gen ifadesinde demirin kritik rolünü belirlemektedir. Beyin demirinin birincil düzenleyicisi, kılcıl damarları kaplayan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin tabakasında (BMVEC) yer almaktadır (McCarthy ve Kosman, 2014; Park ve ark., 2019; Bhalerao ve ark., 2020). İlgili mikroglia ve nöronlarla birlikte bu hücrel ortama nörovasküler ünite adı verilmiş, BMVEC'nin paraselüler geçişi kısıtlayarak ve moleküllerin kandan endotel yoluyla merkezi sinir sistemine taşınması için transitoz gerektiren karmaşık sıkı bağlantılar meydana getirdiği bildirilmiştir (Park ve ark., 2019). Normal fizyolojik koşullarda dolaşımda düşük konsantrasyonlarda serbest demir bulunur ve bu serbest demirin bağlanması yoluyla Fe alımı, depolanması ve ihracatında farklı proteinler rol oynar, bu şekilde hücrelerin serbest demir toksisitesinden korunması sağlanır. Transferrin, beyin omurilik sıvısı ve plazmada demirin taşınmasından sorumludur. Kobalt ve Fe, transferrine benzer afiniteyle bağlandıkları için aynı taşıma mekanizmasını paylaşırlar (Smith, 2005). Co, Co³⁺ya oksitlenebilir ve bikarbonat varlığında apo-transferrine eklendiğinde transferrin ile stabil bir kompleks oluşturabilir (Smith, 2005) Bütün bu metabolizmalar ile demir metabolizması proteinlerinin ekspresyonundaki bozulma, beyindeki demir dengesizliğine ve metal toksisitesine yol açarak oksidatif hasara ve nöronal hücre ölümüne katkıda bulunur. Bozulmuş demir metabolizmasının nörodejenerasyonun ilk nedeni olduğuna dair kanıtlar bildirilmiştir. Anormal Fe birikiminin, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi nörodejeneratif bozuklukların moleküler mekanizmaları ve patogeneğinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Ward ve ark., 2014; Levi ve Tiranti, 2019). Ayrıca beyin demirinin yaşla birlikte arttığı bilinmektedir (Ward ve ark., 2014). Bunun sonucunda, Fe birikiminin nörodejeneratif süreçlere katkıda bulunan önemli bir faktör olabileceği, ayrıca demir eksikliğinin toplum sağlığı üzerinde de olumsuz etkileri olduğu bildirilmiş olup bunun nedeni olan demir eksikliği anemisinin dünyada en sık görülen anemi türü olduğu rapor edilmiştir (Miller, 2013). Petrovna ve ark. (2020) emziren farelerde beyindeki kobalt ve demir birikimini ayrıca, demir düzenleyici proteinlerinin (transferrin reseptörü 1, hepsidin ve ferroportinin) sentezindeki değişiklikleri araştırdıkları çalışmada; 18 günlük ve 25 günlük farelerin perinatal kobalt klorüre maruz kalması sonunda, beyin dokusu homojenatlarındaki kobalt içeriğinin önemli ölçüde arttığı ve beyin demir homeostazisinde değişikliklere neden olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, kobalt klorüre maruz kalan farelerde daha yüksek derecede transferrin reseptörü 1'in ekspresyonunun gözlemlendiği bununla birlikte 18 ve 25 günlük fareler arasında bu değerlerde önemli bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir. 18 günlük kontrol ve kobaltla tedavi edilen fare beyininde zayıf bir ferroportin ifadesi bulunurken, 25 günlük farelerin kobalt maruziyeti, tedavi edilmemiş aynı yaştaki kontrol grubuyla karşılaştırıldığında beyinde ferroportin ekspresyonunun artmasına neden olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın devamında, hepsidin düzeyinin ise 18 günlük Kobalta maruz kalan gruplarda azaldığı ve 25 günlük olanlarda

ise hafif artış gösterdiği rapor edilmiştir (Petrovna ve ark., 2020).Yapılan bir çalışmada ise farelerin kobalta maruz kalması sonucu hem geç doğum öncesi hemde erken doğum sonrası dönemde klorür, temel Fe düzenleyici proteinlerdeki değişiklikler yoluyla Fe homeostazisini etkilediğini bildirmiştir (Kaynağın kendisi) ve kobaltın nörotoksik potansiyelinin ve yenidoğan ve bebeklerde ilgili sağlık risklerinin aydınlatılmasına katkıda bulunacağı ileri sürülmüştür (Petrovna ve ark., 2020).Nörotoksik özelliğinin yanında kobalt, hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 α 'yı stabilize ederek hipoksik sinyali aktive eden ve hipoksiyi taklit eden bir ajan olarak da bilinir. Bu nedenle hipoksinin indüklenmesi için in vivo veya in vitro deneysel modellerde en sık kullanılan kimyasal ajandır (Muñoz-Sánchez ve Ch'anez-C'ardenas, 2019). Kobalt iyonları bu görevi; oksijen homeostazisinin düzenlenmesinde ve hipoksiye yanıt olarak salgılanan anahtar enzimler olan prolin hidroksilazlarda bulunan demir iyonlarının yerini alarak yerine getirir. Oksijenin vücuttaki dağıtımı ile demirin varlığı arasındaki sıkı ilişkiden dolayı kobalt hipoksik koşullar altında O₂ algılamada ve gen ifadesinde demirin kritik rolünü belirler (Chepelev ve Willmore, 2011).Elde edilen veriler, gelişen beyinde metal toksisitesinin demir homeostazisi üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılmasına ve nörodejenerasyondaki olası etkilerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Elde edilen veriler, metal toksisitesinin gelişmekte olan beyindeki demir homeostazisi üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılmasına ve nörodejenerasyondaki olası etkilerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır.Bir diğer önemli nokta ise, metal iyonlarının H₂O₂'yi indükleyen güçlü ajan olmaları ve kobaltın indükleyici özellik sergilediği tanımlanan ilk metal iyonu olmasıdır (Maines ve Kappas, 1976, 1977; Sardana ve ark., 1982; Sunderman, 1987). Kobalt uygulamasının H₂O₂ aktivitesi üzerindeki etkisi, birkaç araştırmacı tarafından sıçan karaciğerinde incelenmiş ve rapor edilmiştir (De Matteis ve Gibbs, 1976; Maines ve Kappas, 1976, 1977; Eaton ve ark., 1980; Kikuchi ve ark., 1982; Numazawa ve ark., 1989; Lin ve ark., 1990; Llesuy ve Tomaro, 1994). Bu çalışmalardan birinin sonuçları, Co uygulamasından 24 saat sonra hem sıçan hem de kobay karaciğerinde H₂O₂ aktivitesinin arttığını göstermiştir (Christova ve ark., 2002). Kobayda kobaltla indüklenen H₂O₂ aktivitesinin, sıçandaki enzim aktivitesinden (yedi kat daha fazla) çok daha yüksek olduğu (13 kat daha fazla) rapor edilmiştir (Maines, 1997).Aynı çalışma ile sıçan karaciğerindeki serbest radikallerin enzimatik temizleyicilerinin akut kobalt yüklemesinden 24 saat sonra önemli ölçüde azaldığı ve telafi edici bir reaksiyon olarak H₂O₂ aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, kobaltın neden olduğu oksidatif strese yanıt olarak kobalt karaciğerinde yalnızca SOD aktivitesi tükenirken, katalaz ve GPx'in yüksek oranda aktive edildiği bildirilmiş ve bunun önemli ölçüde artan H₂O₂ aktivitesi ile birlikte muhtemelen lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu tepkiyi temsil edebileceğini ifade etmişlerdir. (Christova ve ark., 2002).H₂O₂ 'nin hücre içi savunma mekanizmasının bir parçası olarak katılımı, farklı stres koşulları altında farklı sıçan dokularında iyi tanımlanan faktörlerden biridir (Llesuy ve Tomaro, 1994; Motterlini ve ark., 1996; Ossola ve ark., 1997; Bauer ve ark., 1998; Oguro ve ark., 1998; Ito ve ark., 1999; Fernandez ve Bonkovsky, 1999; Maines ve ark., 1999; Otterbein ve ark., 1999; Noriega ve ark., 2000; Ossola ve ark., 2000).Kobaltın diğer önemli bir özelliği ise, hipoksi taklit ajanı olan kobalt klorürün (CoCl₂), birçok açıdan hipoksi tepkisini taklit edebilmesi olup (hücre yaşayabilirliğini azaltmak, mitokondriyal membran potansiyelini dağıtmak, kaspaz-3'ü aktive etmek ve apoptozu indüklemek gibi) bu özelliği rapor edilmiştir (Lan ve ark., 2011). Yüksek metal konsantrasyonuna maruz kalan bitkilerde ise; oksidatif stres oluşabileceğinden bazı antioksidan enzimlerin indüksiyonu büyük önem taşımaktadır (Robinson ve ark., 1993). Hücreler oksidatif strese karşı etkili stratejiler geliştirmiştir. Serbest radikal temizleyicilerin enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonları hücrel oksidasyonları en aza indirir: süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve glutatyon (GSH) ve karotenoidler (CAR) gibi antioksidan bileşikler, metal kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrel seviyelerinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynayabilir. (Weckx ve Clijsters, 1996). Bu nedenle bitkiler tarafından geliştirilen metal tolerans mekanizmalarını anlamak için metal kaynaklı oksidatif stresi

incelemek büyük önem taşımaktadır. Bitkilerdeki antioksidan sistemlerin metal stresine tepkisine ilişkin birçok rapor bulunmaktadır (Chaoui ve ark., 1997; Mazhoudi ve ark., 1997). Son yıllarda deniz algleri üzerinde yapılan mikroalg çalışmalarında ağır metallerin neden olduğu oksidatif stres hakkında literatürde daha fazla bilgi bulunmaktadır (Okamoto ve ark., 1996, 1998; Lee ve Shin, 2003; Morelli ve Scarano, 2004; Elisabetta ve Gioacchino, 2004; Tripathi ve ark., 2006; Li ve ark., 2006).

4.SONUÇ

Analiz edilen literatür bilgileri gösteriyor ki; kobaltın canlı metabolizması için gerekliliğinin yanında, toksit etkileri de son zamanlarda oldukça dikkat çekmiştir. Ancak bu toksik etkilerin daha birçok mekanizma için etkilerinin görülmesi amacıyla hem biyokimyasal hemde moleküler düzeyde çalışmaların yapılması, moleküler mekanizmanın anlaşılmasını kolaylaştıracaktır.

5.KAYNAKÇA

- Akinrinde, A.S., Oyagbemi, A.A., Omobowale, T.O., Asenuga E.R., Ajibade, T.O. (2016). Alterations in blood pressure, antioxidant status and caspase 8 expression in cobalt chloride-induced cardio-renal dysfunction are reversed by *Ocimum gratissimum* and gallic acid in Wistar rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 36, 27–37.
- Akinrinde, A.S. Adebisi, O.E. (2019). Neuroprotection by luteolin and gallic acid against cobalt chloride-induced behavioural, morphological and neurochemical alterations in Wistar rats. *Neurotoxicology*, 74, 252–263
- Bauer, I., Wanner, G.A., Rensing, H., Alte, C., Miescher, E.A., Wolf, B., Pannen, B.H., Clemens, M.G., Bauer, M. (1998). Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 27, 829–838.
- Bhalerao, A., Sivandzade, F., Archie, S.R., Chowdhury, E.A., Noorani, B., Cucullo, L. (2020). In vitro modeling of the neurovascular unit: advances in the field, *Fluids Barriers CNS* 17 (1), 1–20.
- Boland T. M., Hayes L., Sweeney T., Callan J. J., Baird A. W., Keely S., Crosby T. F. (2008). The effects of cobalt and iodine supplementation of the pregnant ewe diet on immunoglobulin G, vitamin E, T3 and T4 levels in the progeny. *Animal*, 2(2), 197–206.
- Bradberry, S.M., Wilkinson, J.M., Ferner, R.E. (2014). Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol.* 52, 837–847.
- Byczkowski, J.Z., Gearhart, J.M., Fisher, J.W. (1994). Occupational exposure of infants to toxic chemicals via breast milk. *Nutrition*, 10(1), 43–8.
- Campos, S.X., Vieira, E.M., Cordeiro, P.J.M., Rodrigues-Fo, E., Murgu, M. (2003). Degradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) dimethylamine salt by gamma radiation from cobalt-60 in aqueous solution containing humic acid. *Radiat Phys Chem.* 68,781–6.
- Chalkley S.R., Richmond J., Barltrop D. (1998). Measurement of vitamin D3 metabolites in smelter workers exposed to lead and cadmium. *Occupational and Environmental Medicine*, 55, 446–452.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., Ferjani, E. (1997). Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Plant Sci.* 127, 139–147.
- Catalani, S., Rizzetti, M.C., Padovani, A., Apostoli, P. (2012). Neurotoxicity of cobalt. *Hum. Exp. Toxicol.* 31 (5), 421–437.
- Catelas, I., Petit, A., Vali, H., Fragiskatos, C., Meilleur, R., Zukor, D.J., Antoniou, J., Huk, O.L. (2005). Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro. *Biomaterials* 26, 2441–2453.
- Chen, C., Zha, H.J., Zhai, H.L., Chen, Y., Han, B., Li Q., Xia, F.Z., Wang, N.J., Lu, Y.L. (2020). Association between blood cadmium and vitamin D levels in the Yangtze Plain of China in the context of rapid urbanization. *Chinese Medical Journal*, 134, 53–59.
- Chepelev, N.L., Willmore, W.G. (2011). Regulation of iron pathways in response to hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.* 50 (6), 645–666.
- Christova, T.Y., Duridanova, D.B., Setchenska, M.S. (2002). Enhanced heme oxygenase activity increases the antioxidant defense capacity of guinea pig liver upon acute cobalt chloride loading: comparison with rat liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131, 177–184.

- Collins, R.N., Bakkaus, E., Carrieffire, M., Khodja, H., Proux, O., Morel, J.L., Gouget, B. (2010). Uptake, localization, and speciation of cobalt in *Triticum aestivum* L. (wheat) and *Lycopersicon esculentum* M. (tomato). *Environ. Sci. Technol.* 44, 2904–2910. Doi.org/10.1021/es903485h.
- De Boeck, M., Kirsch-Volders, M., Lison, D. (2003). Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 135–152.
- De Matteis, F., Gibbs, A.H. (1976). The effect of cobaltous chloride on liver haem metabolism in the rat. *Ann. Clin. Res.* 8, 193–197.
- Devlin, J.J., Pomerleau, A.C., Brent, J., Morgan, B.W., Deitchman, S., Schwartz, M. (2013). Clinical features, testing, and management of patients with suspected prosthetic hip-associated cobalt toxicity: a systematic review of cases. *J Med Toxicol.* 9(4), 405–415.
- Dongre, N.N., Suryakar, A.N., Patil, A.J., Hundekari, I.A., Devarnavadagi, B.B. (2013). Biochemical effects of lead exposure on battery manufacture workers with reference to blood pressure, calcium metabolism and bone mineral density. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28, 65–70.
- Eaton, D.L., Stacey, N.H., Wong, K.L., Klaassen, C.D. (1980). Dose–response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase and cytochrome P-450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 393–402.
- Elisabetta, M., Gioacchino, S. (2004). Copper-induced changes of nonprotein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Plant Sci.* 167, 289–296.
- Fayed, A.H., Gad, S.B. (2011). Effect of sildenafil citrate (Viagra (R)) on trace element concentration in serum and brain of rats, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25, 236–238.
- Fernandez, M., Bonkovsky, H.L. (1999). Increased heme oxygenase- 1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats. *Hepatology*, 29, 1672–1679.
- Garcia, M.D., Hur, M., Chen, J.J., Bhatti, M.T. (2020). Cobalt toxic optic neuropathy and retinopathy: Case report and review of the literature. *American Journal of Ophthalmology Case Reports* 17,100606.
- Garoui, E., Ben Amara, I., Driss, D., Elwej, A., Chaabouni, S.E., Boudawara, T., Zeghal, N. (2013). Effects of cobalt on membrane ATPases, oxidant, and antioxidant values in the cerebrum and cerebellum of suckling rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 154, 387–395.
- Georgieff, M.K. (2006). Iron in the brain: its role in development and injury. *NeoReviews*, 7 (7), e344–e352.
- Goldberg, M.A., Glass G.A., Cunningham, J.M., Bunn, H.F. (1987). The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 7972–7976.
- Grasselli, F., Basini, G., Bussolati, S., Bianco, F. (2005). Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, modulates redox status and functional parameters of cultured swine granulosa cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 17, 715–720.
- Harris, A., Johnson, J., Mansuripur, P.K., Limbird, R. (2015). Cobalt toxicity after revision to a metal-on-polyethylene total hip arthroplasty for fracture of ceramic acetabular component. *Arthroplast Today*, 1(4), 89–91.
- Huk, OI, Catelas, I, Mwale, F, Antoniou, J, Zukor, DJ, Petit, A. (2004). Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro. *J Arthroplasty*, 19, 84–7.
- Ito, K., Yano, T., Hagiwara, K., Ozasa, H., Horikawa, S. (1999). Effects of vitamin E deficiency and glutathione depletion on stress protein heme oxygenase-1 mRNA expression in rat liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.* 54, 1081–1086.
- Jomova, K., Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283 (2–3), 65–87.

- Jonas, L.W.L., Laurence, T.L., Gerald, Zvobgoa, Liangbo, Fua, Theodore, Mulembo, M., Robert, P.M.M., Guoping, Z. (2019). Copper alleviates cobalt toxicity in barley by antagonistic interaction of the two metals. *Ecotox. Environ. Safe*, 180, 234–241.
- Kao, C, Scalettar, R, Bunning, RD. (2015). Two cases of metallosis from metal-on-polyethylene total hips: an emerging problem. *Pharm Manag PMR*. 7(4), 447–450.
- Kechrid, Z, Dahdouh, F, Djabar, R, Bouzerna, N. (2006). Combined effect of water contamination with cobalt and nickel on metabolism of albino rats. *Iran J Environ Health Sci Eng*. 3, 65–9.
- Keegan, G.M., Learmonth, I.D., Case, C.P. (2019). Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: a review of current knowledge and future strategies. *J. Bone Joint Surg. Br*. 89, 567–573.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., Ishizawa, S. (1982). Effects of drugs and metals on heme degradation by the heme oxygenase system. *Adv. Pharmacol. Ther.* 5, 121–130.
- Kratchler, M., Rossipal, S.L.E., Irgolic, K.J. (1998) Changes in the concentrations of trace elements in human milk during lactation. *J Trace Elem Med Biol*. 12,159–76.
- Lan, A., Liao, X., Mo, L., Yang, C., Yang, Z., Wang, X., Hu, F., Chen, P., Feng, J., Zheng, D., Xiao, L. (2011). Hydrogensulfide protects against chemicalhypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2andp38MAPK signaling path ways in PC12cells. *PLoSOne*, 6, e25921.
- Lee, H., Bien C., Hughes A., Espenshade P., Kwon-Chung K., Chang, Y. (2007). Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 65(4), 1018–1033.
- Lee, M.Y, Shin, H. W. (2003). Cadmium-induced change in antioxidant enzymes from the marine alga *Nanochloropsis oculata*. *J Appl Phycol*. 15, 13–19.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993). Principles of Biochemistry, second ed. Worth Publishers, New York.
- Levi, S., Tiranti, V. (2019). Neurodegeneration with brain iron accumulation disorders: valuable models aimed at understanding the pathogenesis of iron deposition, *Pharmaceuticals*, 12 (1), 27.
- Leyssens, L., Vinck, Van Der Straeten, B. C., Wuyts, F., Maes, L. (2017). Cobalt toxicity in humans-a review of the potential sources and systemic health effects, *Toxicol*. 387, 43–56.
- Li, M., Hu, C.W., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., (2006). Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *J. Chemosphere*, 62(4), 565–572.
- Lin, J.H., Villalon, P., Martasek, P., Abraham, N.G. (1990). Regulation of heme oxygenase gene expression by cobalt in rat liver and kidney. *Eur. J. Biochem*. 192, 577–582.
- Linna, A., Oksa, P., Groundstroem, K., Halkosaari, M., Palmroos, P., Huikko, S., Uitti, J., (2004a). Exposure to cobalt in the production of cobalt and cobalt compounds and its effect on the heart. *Occup. Environ. Med*. 61 (11), 877–885.
- Lison, D., De Boeck, M., Verougstraete, V., Kirsch-Volders, M. (2001). Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occupational and Environmental Medicine*, 58, 619–625.
- Llesuy, S.F., Tomaro, M.L., 1994. Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta*. 1223, 9–14.
- MacPherson, A., Dixon, J. (2003). Cobalt, in: B. Caballero, P. Finglas, F. Toldra (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, pp. 1431–1436.
- Maines, M.D., Kappas, A. (1976). Studies on the mechanisms of induction of haem oxygenase by cobalt and other metals. *Biochem. J*. 154, 125–131.

- Maines, M.D., Kappas, A. (1977). Metals as regulators of heme metabolism. *Science*, 198, 1215–1221
- Maines, M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 517–554.
- Maines, M.D., Raju, V.S., Panahian, N. (1999). Spin trap (*N*-*n*-butyl-*a*-phenylnitron)-mediated supra-induction of hemeoxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: role of the oxygenase in protection against oxidative injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 911–919.
- Mao, X., Wong, A., Crawford, R.W., 2011. Cobalt toxicity —an emerging clinical problem in patients with metal-on-metal hip prostheses? *Med. J. Aust.* 194 (12), 649–651.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H., Ferjani, E. (1997). Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) *J. Plant Sci.* 127, 129–137.
- Mazumdar, I., Goswami, K., Ali, M.S. (2017). Status of Serum Calcium, Vitamin D and Parathyroid Hormone and Hematological Indices Among Lead Exposed Jewelry Workers in Dhaka, Bangladesh. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 32, 110–116.
- McCarthy, R.C., Kosman, D.J. (2014). Glial cell ceruloplasmin and hepcidin differentially regulate iron efflux from brain microvascular endothelial cells. *PloS One*, 9 (2), e89003.
- Mills, E., Dong, X.P., ang, F., Xu, H. (2010). Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med. Chem.* 2 (1), 51–64,
- Monnot, A.D., Kovoichich, M., Bandara, S.B., Wilsey, J.T., Christian, W.V., Eichenbaum, G., Perkins, L., Hasgall, P., Taneja, M., Connor, K., Sague, J., Nasser-Aghbosh, B., Marcello, S., Vreeke, M., Katz, L.B., Reverdy, E.E., Thelen, H., Unice, K. (2021). A hazard evaluation of the reproductive/developmental toxicity of cobalt in medical devices. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 123, 104932.
- Morelli, E., Scarano, G. (2004). Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricomutum*. *J. Plant Sci.* 167, 289–296.
- Motterlini, R., Hidalgo, A., Sammut, I., Shah, K.A., Mohammed, S., Srail, K., Green, C.J. (1996). A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 167–172.
- Muñoz-Sánchez, J., Ch´anez-C´ardenas, M.E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* 39 (4), 556–570.
- Noriega, G.O., Ossola, J.O., Tomaro, M.L., del, C., Batlle, A.M. (2000). Effect of acetaminophen on heme metabolism in rat liver. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32, 983–991.
- Numazawa, S., Oguro, T., Yoshida, T., Kuroiwa, Y. (1989). Comparative studies on the inducing effects of cobalt chloride and Co-protoporphyrin on hepatic ornithine decarboxylase and heme oxygenase in rats. *J. Pharmacobiodyn.* 12, 50–59.
- Oguro, T., Hayashi, M., Nakajo, S., Numazawa, S., Yoshida, T. (1998). The expression of heme oxygenase-1 gene responded to oxidative stress produced by phorone, a glutathione depletor, in the rat liver; the relevance to activation of c-jun N-terminal kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 773–778.
- Okamoto, O. K., Asano, C.S., Aidar, E., Aidar, E., Colepicolo, P. (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis*. *J. J. Phycol.* 32, 74–79.
- Okamoto, O.K., Colepicolo, P. (1998). Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *J. Comp Biochem Physiol C.* 119, 67–73.
- Ossola, J.O., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. (1997). Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 332–337.

- Ossola, J.O., Kristoff, G., Tomaro, M. (2000). Heme oxygenase induction by menadione bisulfite adduct-generated oxidative stress in rat liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 127, 91–99.
- Otterbein, L.E., Kolls, J.K., Mantell, L.L., Cook, J.L., Alam, J., Choi, A.M.K. (1999). Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J. Clin. Invest.* 103,1047–1054
- Park, T.-E., Mustafaoglu, N., Herland, A., Hasselkus, R., Mannix, R., FitzGerald, E.A., Prantil-Baun R., Watters, A., Henry, O., Benz, M., Sanchez, H., McCrea, H.J., Goumnerova, L. C., Song, H.W., Palecek, S.P., Shusta, E., Ingber, D.E. (2019). Hypoxia-enhanced Blood-Brain Barrier Chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nat. Commun.* 10, 2621.
- Paustenbach DJ, Tvermoes BE, Unice KM, Finley BL, Kerger BD. A review of the health hazards posed by cobalt. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(4):316–362.
- Petit, A., Mwale, F., Zukor, D.J., Catelas, I., Antoniou, J., Huk, O.L. (2004). Effect of cobalt and chromium ions on bcl-2, bax, caspase3, and caspase-8 expression in human U937 macrophages. *Biomaterials*, 25, 2013–2018.
- Petrova, E., Gluhcheva, Y., Pavlova, E., Vladov, I., Tinkov, A.A., Zaitseva, Y.V., A. Skalny, V. (2019). Brain morphological changes in immature mice after perinatal exposure to cobalt chloride. *Acta Morphol. Anthropol.* 26 (1–2), 37–43.
- Petrova, E., Pavlova, E., Tinkov, A.A., Ajsuvakova O.P., Skalny, A.V., Rashev, P., Vladov, I., Gluhcheva, Y. (2020). Cobalt accumulation and iron-regulatory protein profile expression in immature mouse brain after perinatal exposure to cobalt chloride. *Chemico-Biological Interactions*, 329, 109217
- Rizzetti, M.C., Liberini, P., Zarattini, G., Catalani, S., Pazzaglia, U., Apostoli, P., Padovani, P. (2009). Loss of sight and sound. Could it be the hip? *Lancet.*;373(9668):1052.
- Sardana, M.K., Sassa, S., Kappas, A. (1982). Metal ionmediated regulation of heme oxygenase induction in cultured avian liver cells. *J. Biol. Chem.* 257, 4806–4811.
- Saunders N.R., Liddelow S.A., Dziegielewska K.M. (2012). Barrier mechanisms in the developing brain, *Frontiers in Pharmacology*, 3, 46.
- Saunders N.R., Dziegielewska K.M., Møllgård K., Habgood M.D. (2018). Physiology and molecular biology of barrier mechanisms in the fetal and neonatal brain. *J. Physiol.* Dec;596(23):5723-5756.
- Simonsen, L.O., Harbak, H., Bennekou, P. (2012). Cobalt metabolism and toxicology-a brief update, *Sci. Total Environ.* 432, 210–215..
- Sunderman, F.W. (1987). Metal induction of heme oxygenase. *Ann. NY Acad. Sci.* 514, 65–80.
- Smith, T.A.D. (2005). Human serum transferrin cobalt complex: stability and cellular uptake of cobalt, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (14), 4576–4579.
- Tang, J., Zheng, C., Zheng, F., Li, Y., Wang, Y.L., Aschner, M., Guo, Z., Yu, G., Wu, S., Li, H. (2020a). Global N6-methyladenosine profiling of cobalt-exposed cortex and human neuroblastoma H4 cells presents epitranscriptomics alterations in neurodegenerative diseaseassociated genes. *Environ. Pollut.* 266 (Pt 2), 115326.
- Tang, J., Su, Q., Guo, Z., Zhou, J., Zheng, F., Yu, G., Shao, W., Hu, H., Wu, S., Li, H. (2022b). N6-methyladenosine(m6A) demethylase FTO regulates cellular apoptosis following cobalt-induced oxidative stress. *Environ. Pollut.* 297, 118749.
- Tang, J., Li, Y., Liu, X., Yu, G., Zheng, F., Guo, Z., Zhang, Y., Shao, W., Wu, S., Li, H. (2023). Cobalt induces neurodegenerative damages through impairing autophagic flux by activating hypoxia-inducible factor-1 α triggered ROS overproduction. *Science of the Total Environment* 857, 159432
- Taylor A., Marks V. (1978). Cobalt: A review. *Journal of Human Nutrition*, 32, 165-177.

- Tower, S.S. (2010). Arthroprosthetic cobaltism: neurological and cardiac manifestations in two patients with metal-on-metal arthroplasty: a case report. *J Bone Joint Surg Am.* 92(17), 2847–2851.
- Triantafyllou A., Liakos P., Tsakalof A., Georgatsou E., Simos G., Bonanou S. (2006) Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K-and MAPK-dependent mechanism. *Free Radical Research*, 40 (8), 847–856.
- Tripathi, B.N., Mehta, S.K, Amar, A. Gaur, J.P. (2006). Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *J. Chemosphere*, 62(4), 538–544.
- Wang, G.L., Semenza G.L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *Journal of Biology Chemistry*, 268, 21513–21518.
- Wang, G., Hazra, T.K., Mitra, S., Lee, H.M., Englander, E.W. (2000). Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Research*, 28, 2135–2140.
- Ward, R.J., Zucca, F.A., Duyn, J.H., Crichton, R.R., Zecca, L. (2014). The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 13 (10), 1045–1060,
- Weckx, J, Clijsters, H. (1996). Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *J. Physiol Plantarum*, 96, 506–512.
- Moos, T., Nielsen, T.R., Skjørringe, T., Morgan, E.H. (2007). Iron trafficking inside the brain, *J. Neurochem.* 103, 1730–1740.
- Weckx, J., Clijsters, H. (1996). Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *J. Physiol Plantarum*, 96, 506–512.
- Wild, P., Bourgkard, E., Paris, C. (2009). Lung cancer and exposure to metals: the epidemiological evidence. *Methods Mol. Biol.* 472, 139–167.
- Veasey, S.C., Lear, J., Zhu, Y., Grinspan, J.B., Hare, D.J., Wang, S.H., Bunch, D., Doble, P. A., Robinson, S.R. (2013). Long-term intermittent hypoxia elevates cobalt levels in the brain and injures white matter in adult mice. *Sleep*, 36 (10), 1471–1481.
- Van Bruwaene, R., Gerber, G.B., Kirchmann, R. (1984). Metabolism of ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁵⁹Fe and ⁶⁰Co in lactating dairy cows. *Health Phys.* 46,1069–82.
- Wikipedia (2021). Kobalt. [Online]. Available online at: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kobalt> (accessed October 12, 2023).
- Yang, S.J., Pyen, J., Lee, I., Lee, H., Kim, Y., Kim. T. (2004). Cobalt chloride induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase1/2 activation in rat C6 glioma cells. *J Biochem. Mol. Biol.* 37, 480–6.
- Zou, W., Yan, M., Xu, W., Huo, H., Sun, L., Zheng, Z. (2001). Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. *J Neurosci Res.* 64, 646–53.

BÖLÜM 5

***ASPERGİLLUS ORYZAE* β -GALAKTOZİDAZİN KARBOKSİLENMİŞ ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU**

Doç. Dr. Yakup ASLAN
Sedat BAYIK

Doç. Dr. Mahire Bayramoğlu AKKOYUN

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051746>

¹ Siirt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Siirt, Türkiye. email: dr_yakup@siirt.edu.tr, Orcid no: 0000-0001-9668-9559

² Siirt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Siirt, Türkiye.. sedatbayik85@gmail.com, Orcid no: 0000-0001-2345-6789.

³Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Temel Bilimler Bölümü, Siirt, Türkiye, mahireakkoyun@siirt.edu.tr, Orcid no: 0000-0001-5150 5402.

1. GİRİŞ

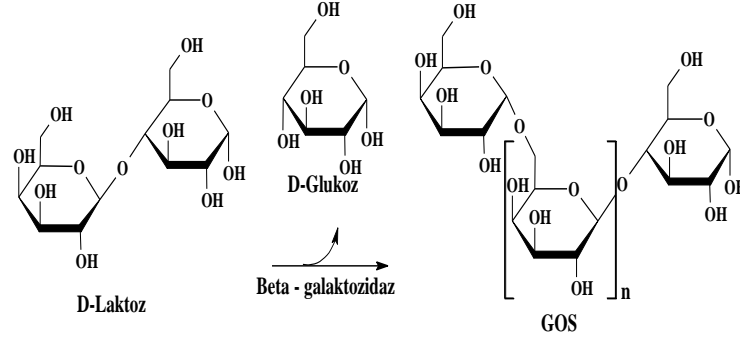
GOS en önemli prebiyotiklerden olup anne sütünde bulunmakla beraber, inek sütünde bulunmamaktadır. Kalın bağırsaklarımızda bulunan probiyotik bakterilerin çoğalmasını sağlayarak sağlık üzerinde olumlu etkilere sahip olduklarından güvenli gıda katkıları olarak kabul edilmiştir (Rivero-Urgell ve Santamaria-Orleans, 2001). Çok sayıda gıda ürününe katılarak tüketime sunulan GOS son yıllarda gittikçe artan bir değer kazanmıştır. GOS, enzimatik olarak mikrobiyal β -galaktozidazların laktoza transgalaktozilasyon etkisiyle laktoz çözeltisinden, peynir altı suyundan ve süt içerisindeki laktozdan süt içerisinde üretilmektedir. GOS üretiminde kullanılan β -galaktozidazlardan biri de AOG'dir (Rodriguez-Colinas ve ark., 2014). Endüstride enzimlerin çözünür formda kullanılmaları, enzimin reaksiyon ortamından ayrılmasının çok pahalı teknikler gerektirmesi nedeniyle tüketime sunulan ürünler enzim de içermektedir. Enzimler çok pahalı olduklarından, çözünür formdaki enzim örneklerinin sadece bir kez kullanılabilmesi ürün maliyetinin yükselmesine ve ürünün kararlılığının bozulmasına neden olmaktadır. Bu dezavantajların giderilmesinin en önemli yolu immobilize enzim kullanmaktır (Kennedy ve Cabral, 1987). Immobilize enzimler, suda çözünmeyen katı bir matrisin yüzeyine fiziksel ve kimyasal bağlarla bağlanması veya matrisin oluşumu sırasında içerisine hapsedilmesi ile elde edilmektedir (Khan ve Alzohairy, 2010). Enzim immobilizasyonunun, belirli enzim örneğinin reaksiyon ortamından en basit süzme yöntemiyle ayrılarak yüzlerce kez kullanılması, daha saf ve güvenilir ürün üretilmesi, ürün inhibisyonunun önlenmesi ve ürün maliyetinin azalması gibi büyük avantajları vardır (Brena ve ark., 2013). Enzim immobilizasyonunda, geleneksel olarak adsorpsiyon, entrapment / enkapsülasyon (hapsetme), çapraz bağlama ve kovalent bağlama olmak üzere dört ana yöntem kullanılmaktadır (Hassan Mohamed, 2016). Enzim immobilizasyonunda matris olarak doğal ve sentetik olmak üzere binlerce materyal kullanılmaktadır (Brena ve ark., 2013). Bir enzim immobilizasyonu çalışmasında en önemli hedefler, % 100 immobilizasyon verimi ve mümkün olan en yüksek aktivite verimi elde etmek ve elde edilen aktivitenin kullanım ve depolama koşullarında mümkün olan en uzun sürede korunması başlıca hedefler arasında yer almaktadır. c-MWCNT son yıllarda enzim immobilizasyonunda üstün özellikleri nedeniyle matris olarak dikkatleri üzerine çekmektedir. Fiziksel ve kimyasal kararlılığı yanında toksik olmaması nedeniyle gıda endüstrisinde güvenle kullanılabilir (Rastian ve ark., 2013). Literatürde AOG'nin çeşitli matrisler kullanılarak immobilizasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına karşılık, c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Literatürdeki çalışmalarda elde edilen aktivite verimleri genellikle % 100'ün altında olup kullanım ve depolama sırasında hızla azalmıştır. c-MWCNT ile enzim immobilizasyon çalışmalarından bazılarında % 500-1200'e varan aktivite verimi rapor edildiğinden (Jamie ve ark., 2016, Zniszczoł ve ark., 2016), bu tez çalışmasında AOG'nin c-MWCNT üzerine immobilizasyon koşulları optimize edilerek % 100 immobilizasyon verimi ve % 100'den daha fazla aktivite verimi ile daha uzun süreli kullanım ve depolama kararlılığına sahip immobilize AOG elde edilmesi amaçlandı.

2. Literatür Araştırması

2.1. Prebiyotik Olarak Galaktooligosakkaritler

Prebiyotikler, insan kalın bağırsağında bulunan probiyotik bakterilerin çoğalmasını teşvik ederek insan sağlığını dolaylı yoldan olumlu yönde etkileyen kalorisiz oligosakkaritlerdir (Fuller, 1989). Prebiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri Tablo 2.1'de görülmektedir. Prebiyotik etkiye sahip oligosakkaritlerden olan galaktooligosakkaritler (GOS), doğal olarak anne sütünde ve bazı yaban hayvanlarının sütünde bulunmakla beraber inek sütünde bulunmamaktadır. Son yıllarda GOS prebiyotik lif olarak bebek mamalarında da kullanılmaktadır (Playne ve Crittenden, 2009). GOS, Şekil 2.1'de görüldüğü gibi laktozdan β -galaktozidaz aracılığı ile transgalaktozilasyon metabolik döngüsü üzerinden üretilmektedir (Rivero-Urgell ve Santamaria-

Orleans, 2001). Bu amaçla, *Aspergillus oryzae* başta olmak üzere mikrobiyal kökenli β -galaktozidaz enzimlerinden sıklıkla yararlanılmaktadır. GOS üretimi üzerine çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır (Kobayashi ve Kan, 1990). Ancak, bu çalışmalarda ağırlıklı olarak serbest enzimlerden yararlanılmış olması üretilen oligosakkaritlerin kalitatif ve kantitatif stabilitelerinin standardizasyonunu güçleştirmektedir. Bu nedenle, immobilize enzim kullanılarak süt laktozundan süütün içerisinde prebiyotik nitelikli GOS üretiminin daha sağlıklı bir ürün eldesi açısından avantaj oluşturacağı düşünülmektedir.



Şekil 2. 1. β -galaktozidaz kullanılarak laktozdan GOS üre

Tablo 2. 1. Prebiyotik oligosakkaritlerin insan vücudu üzerindeki dolaylı terapötik ve yararlı etkileri.

| Yararlı Etki | Terapötik Etki |
|---|--|
| Normal bağırsak florasının korunması | Üreme yolu enfeksiyonlarının azalması |
| Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi | Kabızlığın azalması |
| Laktoz intoleransının azalması | Turist ishalinin azalması |
| Kan serum kolesterol seviyesinin azalması | Bebek ishallerinin azalması |
| Anti-karsinojenik etkinin oluşması | Kemik erimesinin (Osteoporosis) yavaşlaması |
| Gıdaların beslenme değerinin artması | Antibiyotik kullanımına bağlı ishalin azalması |
| | Hiperkolesterolün azalması |
| | Bağırsak kanseri riskinin azalması |

2.2. β -galaktozidazlar

β -galaktozidaz enzimi doğada yaygın olarak bulunurken ve hayvan ve bitki kaynaklarından ve ayrıca mikroorganizmadan izole edilmektedir. Bununla birlikte, hayvansal ve bitkisel kaynaklarla karşılaştırıldığında, mikrobiyal kaynaklardan daha yüksek verimle üretilir ve teknolojik olarak daha önemlidir (Grosova ve ark., 2008). Enzim gıda sistemlerinde kullanılacaksa, bütün enzim kaynakları güvenli olarak kabul edilemez. Enzimin özellikleri kaynağına bağlıdır. AOG laktozun hidrolizinde ve laktozdan GOS üretiminde yaygın olarak kullanılan enzimlerden biridir (Holsinger ve Kligerman, 1991).

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, yüzyıllardan beri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmelerin sonucu olarak enzimler günümüzde ilaç ve kimya endüstrisinde de uygulama alanları bulmuşlardır. Gıdaların işlenmesi ve analizinde enzimlerin immobilizasyonu büyük önem taşımaktadır (Khan ve Alzohairy, 2010). İmmobilizasyon, suda çözülmüş halde iken hareketli olan enzim moleküllerinin hareketlerinin, enzim

moleküllerini suda çözünmeyen katı bir matrisin yüzeyine kimyasal bağlar ile bağlayarak veya jel bir ağ yada kapsül içerisine hapsederek sınırlandırılmasıdır (Cao, 2006). İmmobilize enzimler, çok noktalı, çoklu alt birimli immobilizasyon veya daha uygun konformasyonların oluşturulması nedeniyle çok geniş pH ve sıcaklık aralığında çalışabilir ve suda çözünmüş olanlardan daha yüksek termal kararlılık gösterirler. Bileşimin doğru bir şekilde izlenebileceği, reaksiyonlar boyunca koşullar ve fizyolojik (örneğin sıcaklık, pH, koenzim konsantrasyonları) değişen yavaş reaksiyonlar için yararlı, yakından kontrol edilebilen bir çevre sunarlar. İmmobilizasyon, ekonomik uygulamalarda birçok uygulamada maliyetli enzimlerin tekrar ele geçirilmesini ve tekrar kullanılmasını kolaylaştırırken, sürekli, sabit yataklı operasyonlarda kullanımını sağlar. Bununla birlikte enzimin kararlılığını da artırır (Sheldon, 2007).

İmmobilize enzim kullanımının faydaları aşağıda gösterilmiştir:

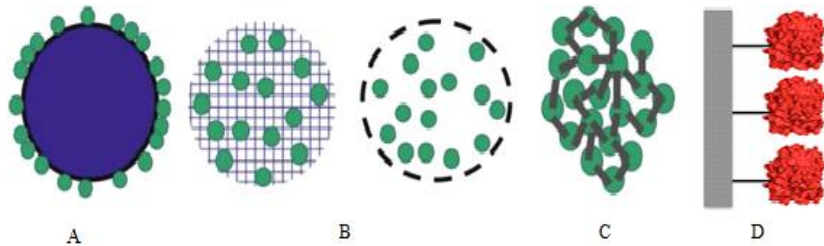
- Reaksiyon ortamından basit yöntemlerle ayrılabilir,
- Yüksek sıcaklık ve pH'ya karşı daha dayanıklıdır,
- Sürekli proseslerin uygulanmasını mümkün kılar,
- Defalarca kullanılabilir,
- Saklama şartlarında aktivitelerini aylarca koruyabilir,
- Ürün maliyetini düşürür,
- Saf ürün eldesini mümkün kılar,
- Seçici olarak bazı malzemelerin sentezi mümkün olur,
- Ürün inhibisyonu önlenir.

2.3.1. Enzim immobilizasyon metotları

İmmobilizasyon metotları genellikle, bağlanma reaksiyonunun tipine göre sınıflandırılır. Buna göre, geleneksel enzim immobilizasyon metotları başlıca dört ana grupta toplanır (Brena ve ark., 2013): Adsorpsiyon, entrapment/enkapsülasyon (hapsetme), çapraz bağlama ve kovalent bağlama (Şekil 2.2).

2.3.1.1. Adsorpsiyon

Taşıyıcı ve enzim arasında ters yüzey etkileşimi içeren adsorpsiyon (Wahba ve Hassan, 2015), enzim ve desteğin pH ve iyonik kuvvet gibi optimum koşullarda uygun tampon çözeltide karıştırılmasıyla gerçekleştirilebilir (Hassan Mohamed ve Omer Ahmed, 2016). Bu yöntemin kolay, ucuz ve hızlı olması gibi avantajlarının yanında, bazı dezavantajları da vardır. Örneğin, adsorpsiyon ile hazırlanan immobilize enzim, işlem stabilitesinin zayıf olmasına; adsorbe edilen enzimin miktarı, sıcaklık, iyon gücü ve pH gibi immobilizasyon parametrelerine karşı daha hassastır ve enzim, aralarındaki zayıf kuvvetler nedeniyle enzim taşıyıcıdan kolayca ayrılabilir (Zhang ve ark., 2013).



Şekil 2.2. Enzim immobilizasyon metotları. A. Adsorpsiyon, B. Entrapment/Enkapsülasyon, C. Çapraz bağlama, D. Kovalent Bağlama

2.3.1.2. Entrapment/Enkapsülasyon (Hapsetme)

Enzimin, jel matriksi oluşumu sırasında polimerik bir jel içinde tutulması, enzim / polimer, pH ve iyonik boğulma oranı gibi optimum koşullar altında, enzim ve polianyonik polimerlerin karışımının çok değerli metal iyonları çözeltilisine bırakılmasıyla gerçekleştirilebilir (O'driscoll, 1976). Bu yöntem aynı zamanda kolay, ucuz ve hızlıdır ancak büyük substratlar ve ürün molekülleri için kütle transferi sınırlamaları, enzimlerin daha düşük katalitik aktivitesine yol açabilir (Hassan Mohamed, 2016). Bu yöntemde en çok kullanılan matrislerin başında aljinatlar gelmektedir (Blandino ve ark., 2001).

2.3.1.3. Çapraz Bağlama

Kullanılmayan matris veya destek içermemesi nedeniyle diğer yöntemlerden farklı olan bu yöntemde, moleküller arasında oluşturulan kovalent bağlarla çapraz bağlanma sonucu immobilize enzimler suda çözünmeyen çapraz bağlı agregatlar (CLEA) oluşturular. Enzimlerin çapraz bağlanmasında, glutaraldehit gibi bi fonksiyonel reaktifler kullanılmaktadır (Brahmachari, 2016). Bu prosedür enzimlerin matris olmadan immobilize olmasına imkan verir ve maliyeti düşürmekle kalmayıp aynı zamanda immobilize enzim aktivitesinin seyreltilmesini önler (Cao ve ark., 2003). Bu yöntemde, çapraz bağlı enzimler santrifüjle kolayca ayrılabilir (Chui ve Wan, 1997). Bu metot kolay ve düşük maliyeti nedeniyle endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemin, çapraz bağlayıcı bir fonksiyonel reaktiflerin etkisiyle enzimin denatüre olabileceği veya yapısal olarak modifiye olabileceği ve enzimlerin birbirlerine aktif bölgeden bağlanmış olması nedeniyle aktivitenin kaybolmasına yol açması gibi dezavantajları vardır (Brena ve ark., 2013).

2.3.1.4. Kovalent Bağlama

Kovalent bağlama ile immobilizasyon yöntemi, enzim ve bir matris arasında güçlü kovalent bağların oluşturulmasından ibarettir (Toher ve ark., 1990). Bu kovalent bağlar, matris yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar ve enzimin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasında oluşturulur. Enzimin yüzeyindeki bu fonksiyonel gruplar, arginin veya lisinin amino grupları (NH₂), glutamik asitin karboksilik grubu (aspirik asit) veya aspartik asit, treonin veya serinin hidroksil grubu (OH) veya sisteinin sülfüdril grubu (SH)'dur (Cabral ve Kennedy, 1991). Ancak bazı matrisler, yüzeylerinde enzimlerin kovalent bağlanması için fonksiyonel gruplara sahip değildir. Bu nedenle, bu destekler kovalent bağlama için önce fonksiyonelleştirilir. Desteğin fonksiyonelleştirilmesi için, amino, epoksi, hidroksi, karboksi, sülfidril vb. gibi fonksiyonel grupları taşıyan birçok reaktif vardır. Desteğin işlevselleştirilmesinden sonra, bu fonksiyonel gruplar glutaraldehit, karbodiimid ve diizosiyanat gibi iki fonksiyonlu reaktifler kullanılarak aktifleştirilir (Patel ve ark., 2016).Kovalent immobilizasyonun, aşırı pH, yüksek sıcaklık gibi şiddetli kullanım koşullarına karşı daha yüksek stabilite nedeniyle diğer yöntemlerden daha avantajlı olduğu iyi bilinmektedir (Cao ve Schmid, 2006). Öte yandan, kovalent immobilizasyon genellikle, enzim moleküllerinin matristen düşük ayrılma seviyesi nedeniyle, daha fazla tekrar kullanılabilirlik ile sonuçlanmaktadır (Sheldon, 2007).

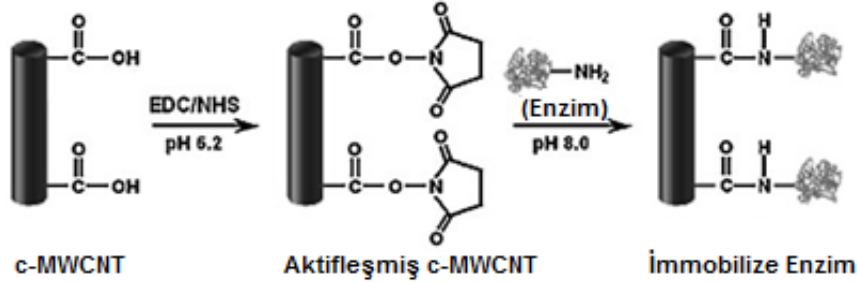
2.3.2. Karboksile çok duvarlı karbon nanotüpler ile enzim immobilizasyonu

Nanopartiküller, immobilizasyon işlemi için ilginç ve önemli özellikleri olan yüksek yüzey alanı ve mekanik stabilitelerinden dolayı, enzim immobilizasyon için mükemmel matrislerdir (Prlainović ve ark., 2013). Literatürde, enzim immobilizasyonunda tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT) adsorpsiyon ve kovalent bağlama metotları ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır.C-MWCNT kullanılarak adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon, enzim çözeltilisinin içerisinde matris bulunan tampon çözelti ile karıştırılarak uygun sürede inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Garlet ve ark., 2014).Kovalent immobilizasyonda (Şekil 2.3), ilk önce c-CNTler üzerindeki karboksil (-COOH) grupları N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDAC) ile aktifleştirilmektedir. Daha sonra, bu gruplar aracılığıyla enzim molekülleri matrise bağlanmaktadır (Jiang ve

ark., 2004). Karboksile çok duvarlı karbon nanotüpleri (c-MWNT) ile yapılan enzim immobilizasyonu çalışmaları Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

2.4. AOG'un İmmobilizasyonu ile İlgili Çalışmalar

Yaptığımız literatür araştırmasına göre AOG'un immobilizasyonu ile ilgili yapılan çok sayıda çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 2.2'de özetlenmiştir. Bir enzim immobilizasyon çalışmasında birinci hedef % 100 immobilizasyon (bağlanma) verimi ve mümkün olan en yüksek aktivite verimini elde etmektir. İkinci hedef ise, uzun süre kullanıldığında ve depolandığında, elde edilen maksimum aktivitenin (başlangıçtaki aktivite) azalmamasıdır. Bu çalışmalar incelendiğinde, genelde aktivite veriminin % 100'ün altında ve kullanım kararlılıkları ile depolama kararlılıklarının düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 2. 3. c-MWCNT ile enzim immobilizasyonu

Tablo 2. 2. c-MWCNT kullanılarak yapılan enzim immobilizasyonu çalışmaları

| Enzim | Bağlanma Verimi (%) | Aktivite Verimi (%) | Kullanım Kararlılığı (%) | Saklama Kararlılığı (%) | Kaynak |
|--|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> Glucose oxidase | Çalışılmamış | Çalışılmamış | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Jung ve ark., 2005) |
| <i>Candida antarctica</i> lipase B | Çalışılmamış | Çalışılmamış | Çalışılmamış | 6 ay sonra % 55 aktivite | (Pavlidis ve ark., 2010) |
| Papain from Genview, USA | 18.8 | 78.9 | 7 kullanım sonunda 61 | Çalışılmamış | (Wang ve ark., 2011) |
| <i>Candida rugosa</i> lipase | 52 | 48 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Rastian ve ark., 2013) |
| <i>Aspergillus niger</i> inulinase | 90 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | 5 hafta sonra 100 | (Garlet ve ark., 2014) |
| <i>Candida rugosa</i> lipase | 86.7 | 492.5 | 7 kullanım sonunda 123,7 | Çalışılmamış | (Rastian ve ark., 2014) |
| Fungal peroxidase | 100 | Çalışılmamış | 9 kullanım sonunda 0 | 40 gün sonra 34 | (Azevedo, 2014) |
| α -Amylase ve glucoamylase | Çalışılmamış | 95.1 | 8 kullanım sonunda 95.1 | Çalışılmamış | (Feng ve Ji, 2011) |
| <i>Candida rugosa</i> lipase | 85.6 | 500 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Jamie ve ark., 2016) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> lipase | 59 | 1200 | 8 kullanım sonunda 60 | Çalışılmamış | (Zniszczoł ve ark., 2016) |

Dolayısıyla, AOG'un immobilizasyonu için yeni materyaller ve farklı metotlar kullanılarak daha yüksek aktivite verimi ve daha uzun kullanım ve depolama kararlılığına sahip biyokatalizörler geliştirmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir.

2.5. Çalışmanın Amacı ve Önemi

AOG'un immobilizasyonu ile ilgili çok sayıda ve immobilize AOG kullanılarak inek sütü içerisindeki laktozun GOS'a dönüştürülmesi ile ilgili bir kaç çalışma bulunmaktadır. Ancak, bu çalışmalarda immobilizasyon verimi genelde % 100'den düşüktür. Elde edilen immobilize AOG'ların kullanım ve depolama kararlılıkları yüksek olsa bile aktivite verimi düşük olduğundan endüstriyel GOS üretiminde ürün maliyetinde önemli bir azalma sağlanamamaktadır. Literatür araştırmamıza göre AOG'un c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile ilgili henüz herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. c-MWCNT ile enzim immobilizasyon çalışmalarında % 500-1200'e varan aktivite verimleri elde edilmiştir. Ayrıca, karbon nanotüplerin enzimlere karşı doğal olarak aktiviteleri olduğundan, adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonda bile yüksek kullanım ve depolama kararlılıkları elde edilebilmektedir. Bu nedenlerden ötürü, bu tez çalışmasının amacı, AOG'un c-MWCNT üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ile % 100'den daha yüksek bir aktivite verimi ile yüksek kullanım ve depolama kararlılığı elde ederek, GOS'un endüstriyel üretiminde ürün maliyetini daha çok düşüren daha ekonomik bir metot geliştirme imkanlarını araştırmaktır.

Tablo 2. 3. c-MWCNT üzerine immobilize AOG'nin kullanım ve depolama kararlılığının literatürdeki sonuçlarla karşılaştırılması

| Matris | Yöntem | Aktivite verimi (%) | Kullanım Kararlılığı | | Depolama Kararlılığı | | Kaynak |
|--|-------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|
| | | | Kullanım sayısı | Kalan Aktivite (%) | Depolama Süresi (Gün) | Kalan Aktivite (%) | |
| Aljinat boncuklar | Kovalent bağlama | 37.5 | 21 | 60 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Mohy Eldin ve ark., 2005) |
| Kitosan | Kovalent bağlama | 18.4 | 4 | 80 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Gaur ve ark., 2006) |
| Manyetik polisiloksan polivinilalkol partikülleri | Kovalent bağlama | 100 | 10 | 84 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Neri ve ark., 2009) |
| Poli glisidil metakrilat | Kovalent bağlama | 77.3 | 8 | 100 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Sun ve ark., 2010) |
| Duolite A568 | İyonik bağlama çapraz bağlama | 56 | 30 | 51 90 | Belirtilmemiş | Belirtilmemiş | (Guidini ve ark., 2010) |
| Selüloz asetat membran | Kovalent bağlama | 66 | 10 | ~100 | 28 | 100 | (Güleç ve ark., 2010) |
| Çinko oksit nanopartiküller | Adsorpsiyon | 80 | 7 | 75 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Husain ve ark., 2011) |
| Konkanavalin A-kaplı kalsiyum aljinat-selüloz boncukları | Entrapment | 70 | Sürekli proses | | 21 | 80 | (Ansari ve Husain, 2011) |
| Polivinilalkol Sol-Gel | Entrapment | 88.5 73.8 | 7 | 95 65 | 90 | 51 39 | (Jovanovic-Malinovska ve ark., 2012) |
| Silika nanopartiküller | Enkapsülasyon | 90 | 9 | 94.2 | 30 | 87.4 | (Wu ve ark., 2013) |
| Selüloz Asetat-Polimetilmetakrilat Membran | Kovalent bağlama | 93 | 5 | 86 | 35 | 83 | (Ansari ve ark., 2014) |
| Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş Agaroz | Kovalent bağlama | 124.4 | 10 | 96.44 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Cardelle-Cobas ve ark., 2016) |
| Fe ₃ O ₄ -CS ve Fe ₃ O ₄ -CS-THP Nanopartiküller | Kovalent bağlama | 85 70 | 10 | 10 | 13 | 62 50 | (Chen ve Duan, 2015) |
| Purolite ^(R) 109 | Adsorpsiyon | 20.6 | 10 | 50-75 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Carević ve ark., 2016) |
| Grafen | Kovalent bağlama | 93 | 10 | 68 | 12 | 57 | (Satar ve ark., 2016) |
| Asit ile aktifleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp | Kovalent bağlama | 82 | 8 | 30 | Çalışılmamış | Çalışılmamış | (Dutra Rosolen ve ark., 2017) |
| Celite (Selit) | Kovalent bağlama | 27 | 10 | 86 | 270 | 85 | (Fai ve ark., 2017) |
| Kollajen-Alüminyum Şelati | Kovalent bağlama | 99.59 | 20 | 100 | 90 | 62.07 | (Gennari ve ark., 2018) |

3. Materyal Ve Metot

3.1. Materyaller

AOG, Bio-Cat firmasından (Troy, VA, ABD) hibe olarak temin edildi. Karboksillenmiş çok duvarlı karbon nano tüpler (c-MWCNT; iç çapı 5-15 nm, dış çapı 28-48 nm, uzunluk 10-25 µm) Nanografi Co. Ltd. şirketinden (Ankara, Türkiye) satın alındı. Nitroselüloz membran filtreler (por çapı 0.45 µm, membran çapı 47 mm) ISO-LAB (Wertheim, Germany) firmasından satın alındı. UV-VIS Spektrometresi (UV-6300PC), VWR firmasından (Radnor, USA); pH metre (Hanna HI 2020 edge), Hanna Instruments Ltd. firmasından (Bedfordshire, İngiltere), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard), Heidolph UK - Radleys firmasından (Shire Hill, İngiltere), saf su cihazı (Mini Pure 1, MDM-0170), MDM Co. Ltd. firmasından (Suwon-si, Güney Kore), hassas terazi (Shimadzu-ATX224), Shimadzu Corporation firmasından (Kyoto, Japonya), orbital çalkalamalı ısıtmalı inkübatör (Mipro-MCI), Protek Lab Grup Profesyonel Laboratuvar Çözümleri firmasından (Ankara, Türkiye), vakum pompası (Biobase, GM-0.50A), Biobase Biodustry Co, Ltd. firmasından (Shandong, Çin) satın alındı. Laktoz, Bovine serum albumin (BSA), sodyum hidroksit, sodyum dihidrojen fosfat, hidro klorik asit, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA), sodyum potasyum tartrat ve Bradford boyası ise Sigma-Aldrich firmasından (Taufkirchen, Germany) ve sodyum azid, Merck Millipore firmasından (Darmstad, Almanya) satın alınmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çözeltilerin hazırlanması

A. AOG çözeltisi

2.5 g toz haldeki ticari AOG preparatı 50 mL 25 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 4.5) çözülerek hazırlandı.

B. İmmobilizasyon çözeltisi

Önce 1 M stok sodyum fosfat tampon çözeltisi hazırlandı. Daha sonra istenilen derişimlerdeki immobilizasyon çözeltileri bu stok çözeltilisinden seyreltme yolu ile hazırlandı.

C. Substrat (Laktoz) çözeltisi

1000 mL % 1'lik (w/v) laktoz çözeltisi, 10 g laktoz ve 0.2 g sodyum azitin (mikrobiyal bozunmayı önlemek için) 25 mM'lık tampon çözeltide (pH 4.5) çözülerek hacmin aynı tampon ile 1000 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

D. DNSA Çözeltisi

1000 mL % 0.1'lik DNSA çözeltisi 1 g DNSA, 2 g fenol, 0.5 g sodyum sülfid ve 10 g sodyum hidroksitin saf suda çözülerek hacmin 1 litreye tamamlanmasıyla hazırlandı.

E. Rochelle tuzu (Sodyum potasyum tartarat) çözeltisi

500 mL % 1'lik Rochelle tuzu çözeltisi, 5 g Rochelle tuzunun saf suda çözülmesinden sonra hacmin 500 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

3.2.2. AOG'nin c-MWCNT'ler ile immobilizasyonu

İmmobilizasyonlar, adsorpsiyon yöntemine göre 200'er µL AOG çözeltileri ve c-MCNT'lerin optimum pH'taki 5'er mL sodyum fosfat tamponları içerisinde, bir inkübatörde 150 rpm hızla çalkalayarak belirli sürelerde inkübe edilmesiyle gerçekleştirildi. İmmobilizasyon sonunda, immobilize enzimler, nitroselüloz membran filtreler kullanılarak vakum altında süzülüp ve 3 defa 5'er mL 0.1 M'lık fosfat tamponu ile ve 3 defa da 5'er mL saf su ile yıkandıktan sonra immobilizasyon tamponunda ve ilk süzüntülerde UV spektrometresi

ile 595 nm'de absorbanlar ölçülerek protein miktarı tayin edildi. Belirlenen protein miktarları kullanılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı. Standart aktivite tayin metoduna göre tayin edilen serbest ve immobilize enzimlerin bağlı aktiviteleri kullanılarak da aktivite verimleri hesaplandı.

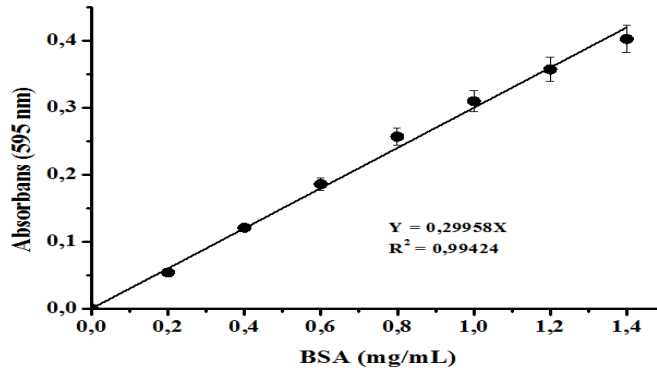
3.2.3. Protein (enzim) tayini

Protein derişimlerinin tayini, 0.25-1.4 mg/mL aralığındaki derişimlerde hazırlanan Bovine Serum Albümin Standart çözeltilerinin çift ışık yollu UV spektrometresinde 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbanları kullanılarak oluşturulan standart grafiğine (Şekil 3.1) ait doğru denklemine (3.1) göre yapıldı (Bradford, 1976).

$$Y = 0.29958X \quad (3.1)$$

3.2.4. AOG aktivitesinin tayini

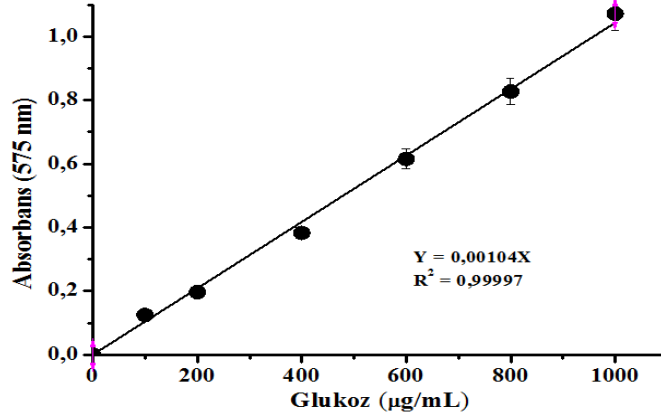
AOG aktivitesi, 25 mM'lık sodyum fosfat tamponunda (pH serbest AOG için 4.5, immobilize AOG için 5.5) çözülerek hazırlanan 200 µL serbest AOG çözeltisi ve 5 mL % 1 (w/v)'lik laktoz çözeltisi standart koşullarda (pH serbest AOG için 4.5, immobilize AOG için 5.5; sıcaklık 55 °C; süre 20 dakika; ve çalkalama hızı 150 rpm) yapılan reaksiyonu ile belirlendi. Bir IU AOG aktivitesi, standart koşullarda, 5 mL % 1 (w/v)'lik laktoz çözeltisinde 1 dakikada 1 µmol D-glukoz oluşturan enzim miktarı (mg) olarak tanımlandı. Oluşan indirgen şeker derişimleri, DNSA metoduna göre (Miller, 1959) Şekil 3.2'de görülen D-glukoz standart grafiğine ait doğru denklemini (3.2) kullanılarak hesaplandı. AOG aktivitesi ise 3.3 denkleminde hesaplandı.



Şekil 3.1. BSA standart grafiği

$$Y = 0.00104X \quad (3.2)$$

$$\text{Aktivite (IU)} = \frac{\text{İndirgen şeker } (\mu\text{mol})}{\text{Kullanılan enzim (mg)} \times \text{reaksiyon süresi (dk)}} \quad (3.3)$$



Şekil 3. 2. Glukoz standart grafiği

3.2.5. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması

İmmobilizasyondan önce ve sonra immobilizasyon çözeltilerindeki enzim miktarları kullanılarak bağlanma verimi Denklem 3.4'ten, serbest ve immobilize enzimlerin güncel aktiviteleri kullanılarak aktivite verimi Denklem 3.5'ten hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (3.4)$$

A: İmmobilizasyon için kullanılan serbest enzim (mg)

B: Süzüntüde kalan serbest enzim (mg)

$$\text{Aktivite Verimi (\%)} = \frac{A_i \text{ (IU)}}{A_s \text{ (IU)}} \times 100 \quad (3.5)$$

A_i: İmmobilize enzimin güncel aktivitesi

A_s: Serbest enzimin güncel aktivitesi

3.2.6. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

3.2.6.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, pH'sı 4.5 olan 25 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL AOG (0.44 IU) çözeltileri ve 25'er mg c-MWCNT'lerin farklı pH'lardaki 5 mL 25 mM'lık sodyum fosfat tamponları içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalayarak oda sıcaklığında 5 dakika süreyle inkübe edilerek gerçekleştirildi. Aktiviteler, pH'sı 4.5 olan 25 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL serbest (0.44 IU) ve 345'er mg (0.68 IU) immobilize AOG'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik laktoz çözeltileri (pH 4.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalayarak 55 °C'de 15 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.6.2. İmmobilizasyon tamponu molaritesinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 250 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL AOG çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 6.5) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 5 dakika süreyle inkübe edilerek gerçekleştirildi. Aktiviteler, pH'sı 4.5 olan 25 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL (0.44 IU) serbest AOG'lerin ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize AOG'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik laktoz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.6.3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 25 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL AOG'ler (0.44 IU) ile farklı miktardaki c-MWCNT'lerin, 5 mL 25 mM'lık sodyum fosfat tamponları (pH 4.5) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalayarak oda sıcaklığında 5 dakika süreyle inkübe edilerek gerçekleştirildi. Aktiviteler, pH'sı 4.5 olan 25 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL (0.44 IU) serbest AOG'lerin ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize AOG'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik laktoz çözeltileri (pH 4.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalayarak 55 °C'de 15 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.6.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 25 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL (0.44 IU) AOG'ler ile farklı miktardaki c-MWCNT'lerin, 5 mL 25 mM'lık sodyum fosfat tamponları (pH 4.5) içinde bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalayarak oda sıcaklığında farklı sürelerde inkübe edilerek gerçekleştirildi. Aktiviteler, pH'sı 4.5 olan 25 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL (0.44 IU) serbest AOG'lerin ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize AOG'lerin 5 mL % 1 (w/v)'lik laktoz çözeltileri (pH 4.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalayarak 55 °C'de 15 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.7. Serbest ve immobilize AOG'lerin karakterizasyonu

Serbest ve immobilize AOG'ler optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve ısı kararlılık ve kinetik sabitler sırayla belirlenerek karakterize edildi (Aslan ve Tanrıseven, 2007).

3.2.7.1. Optimum pH

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (0.44 IU) serbest ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize enzimlerin 5'er mL 25 mM'lık farklı pH'lardaki (4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-6.5-7.0-8.0) fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1 (w/v)'lik laktoz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 15 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edildi. Optimum pH aralığı, bağıl aktivite (%) - pH grafiğinden belirlendi.

3.2.7.2. Optimum sıcaklık

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (0.44 IU) serbest ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize AOG'lerin 25mM fosfat tamponu (pH 4,5) ile hazırlanmış 5'er mL % 1 (w/v)'lik laktoz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-45-50-55-60-65-70-80°C) 15 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, bağıl aktivite (%) - sıcaklık (°C) grafiğinden optimum sıcaklık aralığı belirlendi.

3.2.7.3. pH kararlılığı

200'er µL (0.44 IU) serbest ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize AOG'ler 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'ları farklı (3.0-3.5-4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-7.0-8.0) olan 1'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında (25 °C) 15 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 4.5) ile hazırlanmış 4 mL % 1.25 (w/v)'lik laktoz çözeltileri eklenerek 25°C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda, bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu pH aralığı belirlendi.

3.2.7.4. Isıl kararlılık

200'er µL (0.44 IU) serbest ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize AOG'ler, 10 mL'lık vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'ları 4.5 olan 1 mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-45-50-55-60-65-70-80 °C) 15 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 4.5) ile hazırlanmış 4'er mL % 1.25 (w/v)'lik laktoz çözeltileri eklenerek 55 °C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağlı aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu sıcaklık (°C) aralığı belirlendi.

3.2.7.5. Kinetik sabitler

200'er µL (0.44 IU) serbest ve 345'er mg (0.68 IU) ıslak immobilize AOG'lerin başlangıç aktiviteleri, 10 mL'lık vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 4.5 olan 25 mM'lık fosfat tamponu ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki (30-60-90-120-180-240-300 mM) 5'er mL laktoz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 5 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edilerek, çizilen Lineweaver-Burk Grafiğinden V_{max} ve K_m sabitleri hesaplandı.

3.2.8. İmmobilize AOG'nin kullanım kararlılığı

İmmobilize AOG'nin kullanım kararlılığı, standart koşullarda peşpeşe 20 kez kullanımı sonunda tayin edilen bağlı aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlendi. İmmobilize enzim her kullanımdan sonra sinterli cam süzgeç ve nitroselüloz membran filtreler kullanılarak vakum altında tampon ve saf su ile yıkandı.

3.2.9. İmmobilize AOG'nin depolama kararlılığı

İmmobilize AOG'nin depolama kararlılığı, 20 gün boyunca iki günde bir, standart metoda göre tayin edilen bağlı aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile saptandı. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra saf su ile yıkanarak 5 mL 0.25 M'lık fosfat tamponu çözeltilisi içerisinde buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

3.2.10. İmmobilize AOG kullanarak inek sütü içerisinde laktozdan GOS üretimi

İmmobilize AOG miktarı ve hidroliz süresi GOS üretiminde verimi etkilediğinden, bu parametreler sırayla değiştirilerek etkileri belirlendi.

3.2.11. İstatistiksel analiz

Üçer kez tekrarlanan deneylerin aritmetik ortalamaları ve standart hatalar, Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak hesaplandı. Grafikler ve grafiklerdeki hata çubukları ise Origin 8.0 programı kullanılarak oluşturuldu.

4. Bulgular Ve Tartışma

4.1. Protein Tayini

Denklem (3.1)'e göre, 200 µL serbest AOG içeren 5 mL immobilizasyon çözeltilisi içindeki AOG'nin kütlesi 5.76 mg olarak hesaplandı. 1 g toz haldeki ticari enzim preparasyonundaki enzim miktarının ise, 200 µL serbest AOG çözeltilisindeki enzim miktarının seyreltme katsayısı (250) ile çarpılıp 2.5'e bölünmesi sonucu 576 mg olarak hesaplandı.

4.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

Optimum aktivite tayini koşullarında 200 µL serbest AOG çözeltilisindeki aktivite (3.3) denklemine göre 0.44 IU olarak bulundu. Serbest AOG'nin spesifik aktivitesi, 0.076 IU / mg olarak hesaplandı. 1 g ticari toz AOG preparasyonunun içerdiği aktivite ise 44 IU / g olarak hesaplandı. 1 IU aktiviteye sahip serbest AOG

miktarı ise 13.16 mg olarak hesaplandı. Aktivite verimi % 155.00 olduğundan 0.345 mg ıslak immobilize AOG'nin içerdiği aktivite ise 0.68 IU olarak hesaplandı.

4.3. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

4.3.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.1'de görülmektedir. Tabloya göre immobilizasyon tamponunun pH'sı 3.5 iken % 77.93 olan immobilizasyon veriminin pH 6.5'e çıkarıldığında % 19.00'a düştüğü, aktivite veriminin ise pH 3.5'te % 87.54 iken pH 6.5'e çıkarıldığında % 105.48'e yükseldiği görülmektedir. c-MWCNT üzerindeki karboksil gruplarının (COOH) ortalama pK_a değerleri 3.68'dir (Mansor ve ark., 2012). Karboksil grupları, pK_a'dan düşük pH'larda yüksüz, yüksek pH'larda ise negatiftir. Proteinlerin net yükleri izoelektrik noktalarında (pI) sıfır, altındaki pH'larda pozitif ve üstündeki pH'larda ise negatiftir. AOG'nin pI'sı 4.6 civarındadır (Widmer ve Leuba, 1979). Buna göre, pH 3.5'te hem c-MWCNT'lerin hem de AOG'un yükleri pozitifdir. Dolayısıyla bu pH'taki bağlanmanın iyonik olmayıp, zayıf etkileşimler olan van der Waals, dipol-dipol ve hidrojen bağları aracılığıyla olduğu anlaşılmaktadır. pH 4.5'te ise c-MWCNT'ler negatif, AOG ise pozitifdir. Dolayısıyla bu pH'ta bağlanma iyonik bağlanmadır. 5.5 ve 6.5 pH'larda ise hem c-MWCNT'lerin hem de AOG'un yükleri negatiftir ve pH'nın artmasıyla negatif yük artmaktadır. Dolayısıyla bu pH'larda iyonik bağlanma mümkün olmadığından immobilizasyonda zayıf etkileşimlerin etkili olduğu düşünülebilir. Zayıf etkileşimlerle adsorbe olmuş proteinler ise tampon ile ve saf su ile yıkanma sırasında desorbe olarak immobilizasyon veriminin düşmesine neden olmaktadır. 5.5 ve 6.5 pH'larda immobilizasyon veriminin azalmasına karşılık aktivitenin artması ise, matris üzerindeki immobilize enzim moleküllerinin daha seyrek olması nedeniyle substrat moleküllerinin enzim moleküllerinin aktif bölgesine kolayca ulaşmasıyla açıklanabilir. Aşırı enzim yüklenmesi sonucu enzim molekülleri birbirlerinin aktif bölgelerini kapatarak substrat moleküllerinin aktif bölgeye ulaşmasına engel oldukları için aktivite verimi daha düşük olabilmektedir (Zhang ve ark., 2013).

Tablo 4. 1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

| İmmobilizasyon Tamponu pH'ı | İmmobilizasyon Verimi (%) | Aktivite Verimi (%) |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------|
| 3.5 | 77.93 ± 0.02 | 87.54 ± 0.02 |
| 4.5 | 56.27 ± 0.04 | 93.92 ± 0.04 |
| 5.5 | 35.56 ± 0.03 | 103.82 ± 0.02 |
| 6.5 | 19.00 ± 0.05 | 105.48 ± 0.05 |

4.3.2. İmmobilizasyon tamponu molaritesinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.2'ye göre, tampon molaritesi arttığında immobilizasyon veriminin artmasına karşılık aktivite veriminin düştüğü görülmektedir. Bu deneyde kullanılan bütün tampon çözeltilerin pH'ları 6.5 olduğundan, sonuçlardaki farklılıklar tampon molaritelerinin farklılığından kaynaklandığı söylenebilir. pH 6.5'te hem c-MWCNT'ler hem de AOG negatif yüklü olduğundan, immobilizasyonun zayıf etkileşimler ile gerçekleştiği düşünülebilir. Tampon molaritesinin artması, daha çok sayıda iyonlaşabilen grubun negatif yük kazanmasını

sağladığından miktarını daha fazla artırmaktadır. Bu da matrise zayıf etkileşimlerle bağlanan enzim moleküllerinin sayısını artırdığından immobilizasyon verimi artmaktadır. Molaritenin artmasıyla aktivitenin azalması ise, tampon çözelti içerisindeki iyon sayılarının artması sonucu enzim moleküllerinde molekül içi iyonik bağlar kırılarak enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu üç boyutlu yapının bozulması nedeniyledir (Smalla ve ark., 1988).

Tablo 4. 2. Immobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

| Tampon Derişimi (mM) | İmmobilizasyon Verimi (%) | Aktivite Verimi (%) |
|----------------------|---------------------------|---------------------|
| 25 | 19.00 ± 0.05 | 105.48 ± 0.05 |
| 50 | 37.07 ± 0.03 | 102.72 ± 0.01 |
| 75 | 57.33 ± 0.01 | 90.18 ± 0.04 |
| 100 | 78.02 ± 0.04 | 86.44 ± 0.02 |

4.3.3. c- MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, c-MWCNT miktarı arttığında immobilizasyon veriminin artmasına karşılık aktivite veriminin azalmaktadır. Matris miktarının artmasının daha fazla enzim molekülünün immobilizasyonu ile sonuçlandığı çok iyi bilinmektedir. Matris yüzeyinde immobilize enzim moleküllerinin artması sonucu katalitik bölgenin diğer enzim molekülleri tarafından kapatılması sonucu substrat moleküllerinin enzimin aktif bölgesine ulaşmasını engellediğinden aktivite azalmaktadır (Zhang ve ark., 2013).

4.3.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.4'te, immobilizasyon süresi attıkça immobilizasyon verimi ile beraber aktivite veriminin de arttığı ve 40 dakika sonunda bütün enzim moleküllerinin bağlandığı ve aktivite veriminin en yüksek değere ulaştığı görülmektedir. Ayrıca, sürenin daha fazla artırılmasının immobilizasyon ve aktivite verimini değıştirmediğı de anlaşılmaktadır. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu sonucunda AOG c-MWCNT üzerine zayıf etkileşimlerle adsorpsiyon yöntemiyle % 100 bağlanma verimi ve % 155 aktivite verimi ile immobilize edildi. Yapılan literatür taraması sonucuna göre, bu tez çalışmasında elde edilen aktivite veriminin, literatürdeki çalışmalarda elde edilenler arasında en iyisi olduğu görüldü. Literatüre göre, AOG'nin en yüksek aktivite verimi Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş Agaroz üzerine kovalant bağlama yöntemiyle yapılan immobilizasyonda elde edilmiştir (Cardelle-Cobas ve ark., 2016). Bu çalışmada optimum şartlarda elde edilen en yüksek aktivite veriminin % 124.4 olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 4. 3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

| c-MWCNT (mg) | İmmobilizasyon Verimi (%) | Aktivite Verimi (%) |
|--------------|---------------------------|---------------------|
| 25 | 19.00 ± 0.05 | 105.48 ± 0.05 |
| 50 | 43.24 ± 0.03 | 93.19 ± 0.03 |
| 75 | 67.24 ± 0.01 | 92.72 ± 0.04 |
| 100 | 74.25 ± 0.02 | 91.53 ± 0.01 |

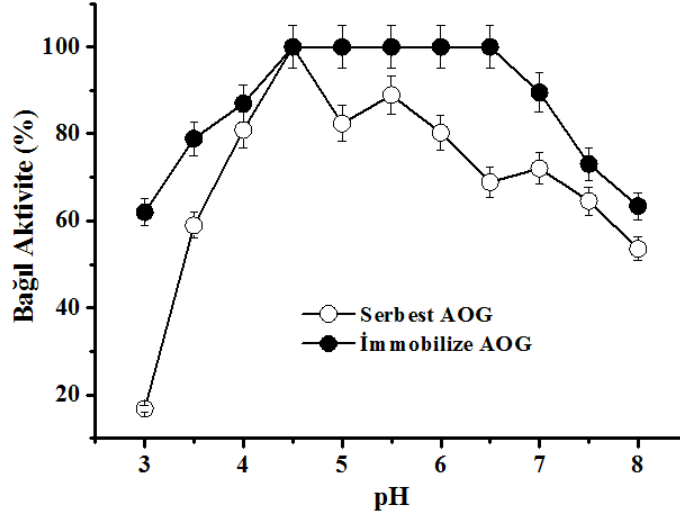
Tablo 4. 4. Sürenin immobilizasyon etkinliğine etkisi

| Süre (dk.) | İmmobilizasyon Verimi (%) | Aktivite Verimi (%) |
|------------|---------------------------|---------------------|
| 0 | 12.38 ± 0.05 | 31.83 ± 0.05 |
| 5 | 19.00 ± 0.03 | 105.48 ± 0.03 |
| 10 | 75.79 ± 0.01 | 113.35 ± 0.04 |
| 20 | 79.13 ± 0.03 | 122.88 ± 0.03 |
| 40 | 100.00 ± 0.04 | 155.00 ± 0.02 |
| 60 | 100.00 ± 0.02 | 155.00 ± 0.01 |

4.4. Sıvı ve İmmobilize AOG'nin Karakterizasyonu

4.4.1. Optimum pH

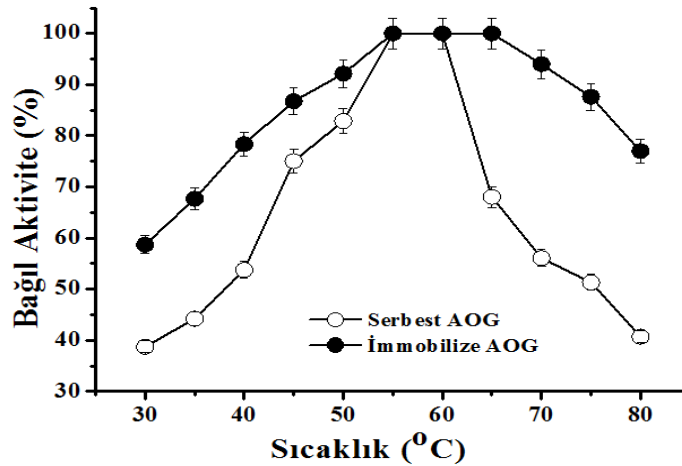
Şekil 4.1'e göre, serbest AOG'nin optimum pH değeri 4.5 iken immobilizasyondan sonra 4.5'den 6.5 değerine kadar genişlediği görülmektedir. İmmobilizasyon sonunda, matrisin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak optimum pH daha yüksek veya daha düşük seviyelere kayabilir (Ferreira ve ark., 2001). Literatürde, immobilizasyondan sonra optimum pH değişimini bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, AOG'nin optimum pH'sı, farklı membranlarla immobilizasyondan sonra 4.0'dan 4.5-5.0 aralığına kaymıştır (Mohy Eldin et al., 2005). Başka bir çalışmada, naylon hydrolonmembrane ile immobilizasyondan sonra, AOG'nin optimum pH değeri 4.0'dan 4.5'e yükselmiştir (El-Masry ve ark., 2000). Optimum pH'daki değişimler muhtemelen enzim ve matris üzerindeki yüklerin değişmesine bağlıdır (Bayramoglu ve ark., 2007).



Şekil 4.1. Serbest ve immobilize AOG'nin optimum pH'sı

4.4.2. Optimum sıcaklık

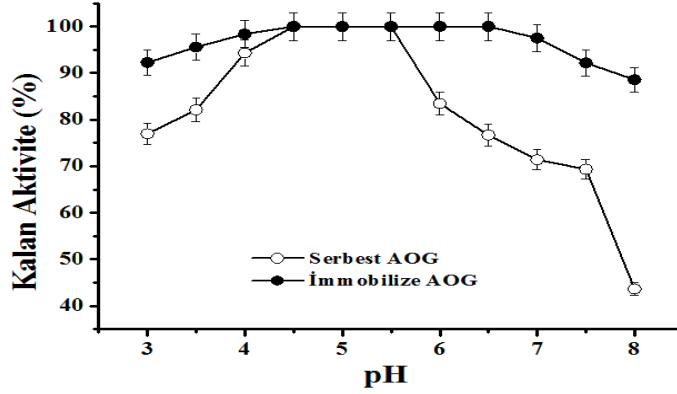
Şekil 4.2'de optimum sıcaklık aralığının (55-60 °C) immobilizasyon sonunda 5 °C yükseldiğini göstermektedir. Benzer sonuçlara literatürde sıklıkla rastlanılmaktadır. Örneğin, AOG'nin magnetik nanopartiküller ile immobilizasyonunda optimum sıcaklık 60 °C'den 70 °C'ye kaymıştır (Zhou ve ark., 2013). Şekil 4.2'de ayrıca immobilize AOG'un, test edilen tüm sıcaklık aralığında serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterdiği de görülmektedir. Çok iyi bilinmektedir ki, immobilizasyon enzimlerin ısıl kararlılığını arttırdığından, immobilize enzimler yüksek sıcaklıklarda serbest enzimlerden daha yüksek aktivite gösterirler. İmmobilize AOG'nin düşük sıcaklıklarda serbest AOG'dan daha yüksek aktivite göstermesi ise, serbest enzimlerin düşük sıcaklıklarda aktivasyon enerjisinden daha az enerjiye sahip olduğundan, substrat ile reaksiyona girebilmek için gerekli olan enzim moleküllerinin konformasyonları bozulur (Gómez-Casati ve ark., 2000). İmmobilizasyon sonucu enzim moleküllerinin en uygun konformasyonları sabitlendiğinden, sıcaklığın düşmesi enzimin konformasyonunu değiştirmedığı için immobilize enzimin aktivitesinin serbest enzime göre daha yüksek olduğu söylenebilir (Elnashar ve Yassin, 2009).



Şekil 4.2. Serbest ve immobilize AOG'nin aktivitesine sıcaklığın etkisi

4.4.3. pH kararlılığı

Şekil 4.3'te gösterildiği gibi, serbest AOG sadece 4.5-5.5 pH aralığında en yüksek kararlılığa sahipken, immobilize AOG daha geniş bir pH aralığında (4.5-6.5) en yüksek kararlılığa sahiptir. Ayrıca, immobilize AOG, test edilen diğer bütün pH değerlerinde serbest enzime göre daha kararlıdır. Optimum pH aralığının dışındaki pH'larda kararlılığın düşük olmasının nedeni destek ve enzim arasındaki bağlanma kuvvetleri zayıf olduğundan pH'daki değişiklikler sonucunda enzim moleküllerinin matristen ayrılmasından kaynaklanabilir (Kennedy ve Cabral, 1987).



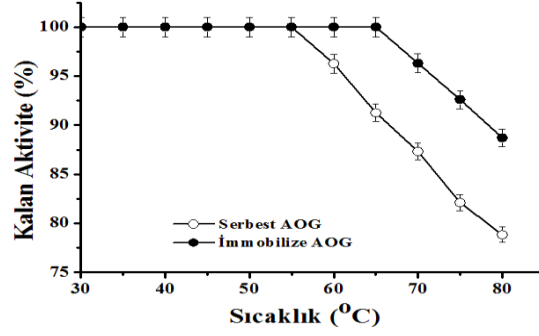
Şekil 4.3. Serbest ve immobilize AOG'nin kararlılığına pH'nın etkisi

4.4.4. Isıl kararlılık

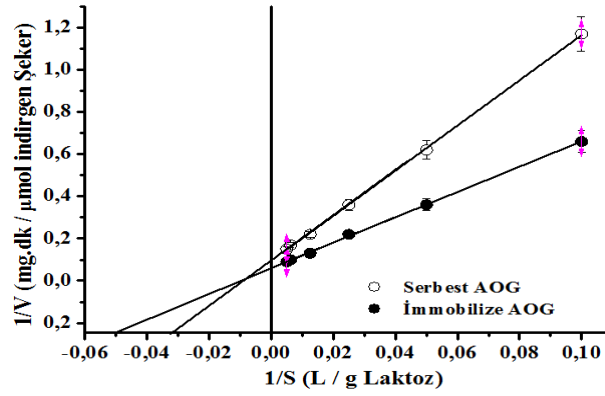
Şekil 4.4 sıcaklığın serbest ve immobilize AOG'nin kararlılığına etkisini göstermektedir. Şekilde, 55 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı yapıda olduğu görülmektedir. 60 °C'de serbest enzim aktivitesinin % 60'ını kaybetmişken immobilize enzim aktivitesinin % 60'dan fazlasını korumakta olduğu görülmektedir. İmmobilize edilmiş enzimin artan stabilitesi, enzimin desteğe tutturulmasının neden olduğu protein yapısının hareket kabiliyetindeki azalmaya bağlanmıştır (Taqieddin ve Amiji, 2004). Artan stabilite, immobilizasyonun enzimin ısıl hareketini yüksek sıcaklıklarda sınırlandırmasının bir sonucu olabilir. Sonuç olarak, termal denatürasyon, hareketsizleştirilmiş bir enzim ile daha yüksek sıcaklıklarda meydana gelmeyebilir. Termostabil enzimler daha yüksek reaksiyon hızı, daha düşük yayılma kısıtlamaları, daha yüksek stabilite ve daha yüksek verim sağlar (Markoglou ve Wainer, 2003).

4.4.5. Kinetik sabitler

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, Serbest ve immobilize enzimin Michaelis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) sabitleri Lineweaver-Burk Grafiği kullanılarak hesaplandı. İmmobilizasyon, K_m sabitinin değerini 31.95 g Laktoz / L'den 20.28 g Laktoz / L'ye düşürürken, V_{max} değerini 10.36 μ mol indirgen şeker / mg.dk'dan 16.10 μ mol indirgen şeker / mg.dk'ya yükseltmiştir. K_m değeri, bir enzimin substrata olan ilgisini göstermektedir. K_m küçüldükçe enzimin substratına olan ilgisi artar.



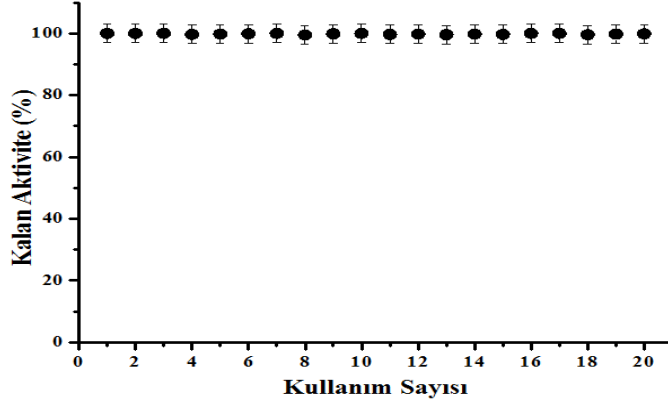
Şekil 4.4. Serbest ve immobilize AOG'nin kararlılığına sıcaklığın etkisi



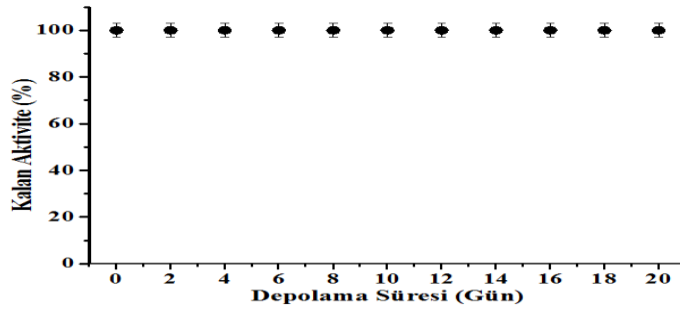
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize AOG'nin Lineweaver-Burk grafiği

4.4.6. İmmobilize AOG'nin kullanım ve depolama kararlılığı

Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi, immobilize enzim kesikli üretim prosesinde optimum koşullarda tekrarlanan 20 kullanım süresince aktivitesini kaybetmediği görülmektedir. Şekil 4.7.'ye göre ise, immobilize enzim kesikli üretim prosesinde optimum depolama koşullarında 20 gün boyunca aktivitesini kaybetmediği anlaşılmaktadır. Bu tez çalışmamızda elde edilen bu sonuçların AOG'nin immobilizasyonu ile ilgili Tablo 2.3.'te özetlenen diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre en iyisi olduğu söylenebilir. Öncelikle, elde edilen aktivite verimi (% 155), önceki çalışmalarda elde edilen en yüksek aktivite veriminden (% 124.4) daha yüksektir. Cardelle-Cobas ve ark. (2016) tarafından yapılan bu çalışmada, hem elde edilen aktivite verimi daha düşük hem de immobilize AOG 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesi % 96.44'e düşmüştür. Güleç ve ark. (2010)'nın yaptığı çalışmada selüloz asetat membran üzerine kovalent bağlama yöntemiyle immobilize edilen AOG başlangıç aktivitesini 28 gün boyunca korumuştur. Anca bu çalışmada elde edilen aktivite verimi olarak bulunmuştur. Fai ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada, Celite üzerine kovalant bağlama yöntemiyle immobilize edilen AOG başlangıç aktivitesinin 85'ini 270 gün sonunda korumuştur, ancak elde edilen aktivite verimi sadece % 27'dir. Bir başka çalışmada (Wu ve ark., 2013), silika nanopartikülleri üzerine enkapsülasyon yöntemiyle immobilize edilen AOG başlangıç aktivitesinin % 87.4'ünü korumuştur fakat elde edilen aktivite verimi % 90 olarak bulunmuştur. Selüloz asetat-polimetilmetakrilat membran üzerine kovalent bağlama metodu ile immobilize edilen



Şekil 4. 6. İmmobilize AOG'nin kullanım kararlılığı



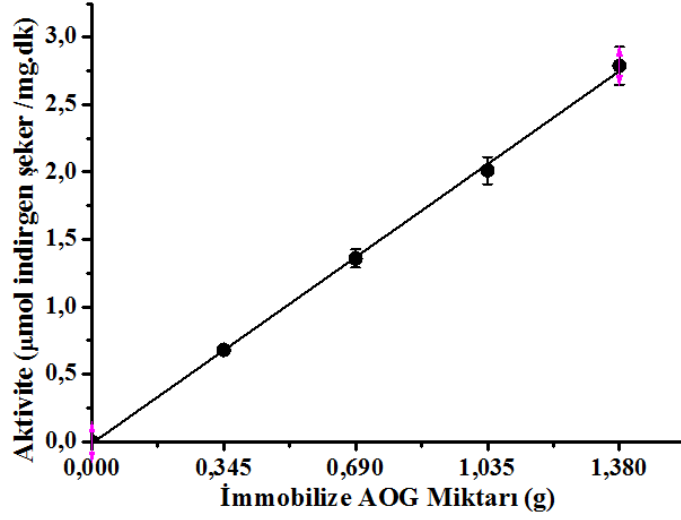
Şekil 4. 7. İmmobilize AOG'nin depolama kararlılığı

AOG 35. günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 83'ünü korumasına karşılık elde edilen aktivite verimi % 93'tür (Ansari ve ark., 2014).

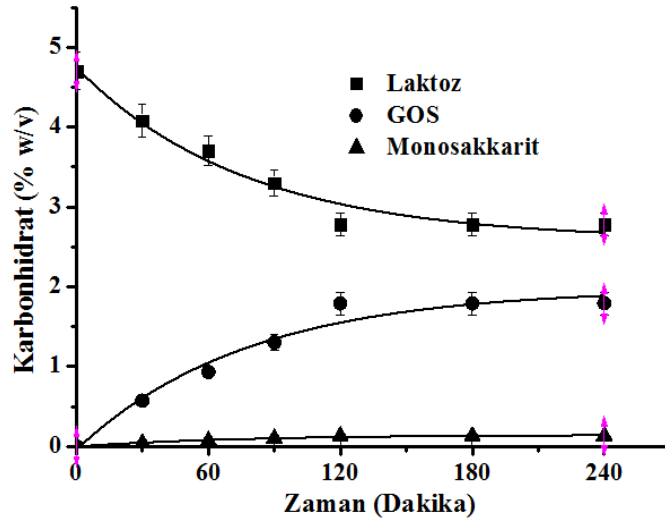
4.5. İmmobilize AOG Kullanılarak Süt İçerisinde Laktozdan GOS Üretimi

AOG kullanılarak, sulu laktoz çözeltisinden ve süt içerisinde laktozdan GOS üretilmektedir. Laktoz çözeltisinden GOS üretiminde laktoz derişimi, enzim miktarı, pH sıcaklık ve reaksiyon süresi gibi faktörler verime etki etmektedir. pH ve sıcaklık normalde reaksiyon hızını az da olsa etkiler, ancak pH ve sıcaklığın değişiminin GOS verimini önemli ölçüde etkilemediği bildirilmiştir (Albayrak ve Yang, 2002). Dolayısıyla, sadece immobilize AOG kullanarak süt içerisinde laktozdan GOS üretiminde immobilize AOG miktarının ve sürenin etkisi incelendi. Şekil 4.8.'de ise, 200 mM'lık laktoz çözeltisinde immobilize AOG miktarı arttıkça üretilen GOS miktarının da doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Oluşan GOS derişimi, immobilize AOG miktarı ile 1.380 g'a kadar doğrusal olarak artarak sabitlendiğinden bir sonraki aşamada optimum immobilize AOG miktarı 1.380 g olarak kullanıldı. Şekil 4.9.'da ise GOS üretimi üzerine hidroliz süresinin etkisi görülmektedir. 1.380 g immobilize AOG ile 10 mL yarım yağlı UHT inek sütünün reaksiyonunda 240 dakika boyunca belirli aralıklarla GOS miktarı tayin edildi. Şekilde görüldüğü gibi, başlangıçta % 4.7 (w/v) olan laktoz derişimi 240 dakika süren reaksiyon sonucunda % 2.78 (w/v)'e düşmüş ve % 1.79 (w/v) GOS oluşurken % 0.13 (w/v) oranında da monosakkarit açığa çıkmıştır. Buna göre laktozun GOS'a dönüşüm oranı % 38.09 (w/w) olarak gerçekleşmiştir. Bu dönüşüm oranı *Bacillus circulans* β-galaktozidaz ile elde edilen orana (% 39) çok yakın (Mozaffar ve ark., 1985) iken, *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidaz ile elde edilen oranlardan (%

16.9) (Rodriguez-Colinas ve ark., 2014) (% 17.3) (Ruiz-Matute ve ark., 2012) ise daha yüksektir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında elde edilen c-MWCNT üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen AOG'nin diğer kaynaklardan (*Bacillus circulans* ve *Kluyveromyces lactis*) elde edilen β -galaktozidazlardan daha yüksek verimle GOS üretiminde kullanılabileceği anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 8. Aktiviteye immobilize AOG miktarının etkisi



Şekil 4. 9. Sütteki laktozdan süt içerisinde GOS üretimine sürenin etkisi.

5. Sonuçlar

Bu çalışmada;

1. AOG literatürdeki sonuçlardan daha yüksek bir aktivite verimiyle (155 ± 0.01) c-MWCNT üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edildi.

2. İmmobilize AOG'nin kesikli proseste peş peşe tekrarlanan 20 kullanım ve optimum koşullarda (Bir buz dolabında +4 °C'de, pH'sı 4.4 olan 5 mL 25 mM sodyum fosfat tamponunda) 20 gün depolama süresince başlangıç aktivitesini koruduğu görüldü.

3. İmmobilize AOG diğer kaynaklardan (*Bacillus circulans* ve *Kluyveromyces lactis*) elde edilen β -galaktozidazlardan daha yüksek verimle GOS üretiminde kullanıldı.

Elde edilen bu sonuçlar, literatürdeki sonuçlardan daha iyi olduğu görülmektedir.

TEŞEKKÜRLER

Yazarlar, bu çalışmayı 2018-SİÜFEB-010 nolu proje ile destekleyen Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürü borç bilirlir. Yazarlar ayrıca, bu çalışmada kullanılan *Aspergillus oryzae* β -galaktozidaz'ı bize hibe olarak sağlayan BIO-CAT Inc. (Troy, VA, USA) firmasına da teşekkürü bir borç bilirlir.

6. KAYNAKLAR

- Albayrak, N., Yang, S.T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 8-19.
- Ansari, S., Husain, Q. (2011). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on concanavalin A-layered calcium alginate-cellulose beads and its application in lactose hydrolysis in continuous spiral bed reactors. *Polish Journal of Chemical Technology*, 13, 15-20.
- Ansari, S.A., Satar, R., Kashif Zaidi, S., Ahmad, A. (2014). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane and its application in hydrolysis of lactose from milk and whey. *International scholarly research notices*, 2014, 1-6.
- Aslan, Y., Tanrıseven, A. (2007). Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45, 73-77.
- Azevedo, R.A.M.(2014). *Immobilization of peroxidase on functionalized carbon nanotubes for synthesis of biocatalysts with high performance*. Master's Thesis, Porto University.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D. (2001). Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 36, 601-606.
- Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Brahmachari, G. (2016). *Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis and Industrial applications*, Massachusetts, *Academic Press*.
- Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. In: Guisan, J. M. (ed.) *Immobilization of enzymes and cells*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Cabral, J., Kennedy, J. (1991). Covalent and coordination immobilization of proteins. *Bioprocess technology*, 14, 73-138.
- Cao, L. (2006). *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*, New Jersey, *John Wiley & Sons*.
- Cao, L., Schmid, R.(2006). Immobilized enzymes: past, present and prospects. In: Cao, L. (ed.) *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Cao, L., van Langen, L., Sheldon, R.A. (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current opinion in Biotechnology*, 14, 387-394.
- Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Corzo, N., Corzo-Martínez, M.(2016). Synthesis of Oligosaccharides Derived from Lactulose (OsLu) Using Soluble and Immobilized *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 1-10.
- Carević, M., Ćorović, M., Mihailović, M., Banjanac, K., Milisavljević, A., Veličković, D., Bezbradica, D.(2016). Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. *International Dairy Journal*, 54, 50-57.
- Chen, S.-C., Duan, K.-J.(2015). Production of galactooligosaccharides using β -galactosidase immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles with tris (hydroxymethyl) phosphine as an optional coupling agent. *International journal of molecular sciences*, 16, 12499-12512.
- Chui, W., Wan, L.(1997). Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *Journal of microencapsulation*, 14, 51-61.

- Dutra Rosolen, M., Gennari, A., Volpato, G., de Souza, C.F.V.(2017). Biocatalytic characterization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35, 260-268.
- Elnashar, M.M., Yassin, M.A.(2009). Lactose hydrolysis by β -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159, 426-437.
- Fai, A., Kawaguti, H., Thomazelli, I., Santos, R., Pastore, G.(2017). Immobilization of fungi β -galactosidase on celite to produce galactooligosaccharides during lactose hydrolysis. *International Food Research Journal*, 24 (1), 353-358.
- Feng, W., Ji, P.(2011). Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnology advances*, 29, 889-895.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66, 365-378.
- Garlet, T., Weber, C., Klaić, R., Foletto, E., Jahn, S., Mazutti, M., Kuhn, R. 2014. Carbon nanotubes as supports for inulinase immobilization. *Molecules*, 19, 14615-14624.
- Gaur, R., Pant, H., Jain, R., Khare, S.(2006). Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, 97, 426-430.
- Gennari, A., Mobayed, F.H., Volpato, G., de Souza, C.F.V. (2018). Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. *International journal of biological macromolecules*, 109, 303-310.
- Gómez-Casati, D.F., Preiss, J., Iglesias, A.A.(2000). Studies on the effect of temperature on the activity and stability of cyanobacterial ADP-glucose pyrophosphorylase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 384, 319-326.
- Grosova, Z., Rosenberg, M., Rebroš, M.(2008). Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry—a review. *Czech Journal of Food Sciences*, Citeseer.
- Guidini, C.Z., Fischer, J., Santana, L.N.S., Cardoso, V.L., Ribeiro, E.J.(2010). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 137-143.
- Güleç, H.A., Gürdaş, S., Albayrak, N., Mutlu, M.(2010). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on low-pressure plasma-modified cellulose acetate membrane using polyethyleneimine for production of galactooligosaccharide. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 1006-1015.
- Hassan Mohamed, E., Tamer Tamer, M., Omer Ahmed, M.(2016). Methods of Enzyme Immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7, 385-392.
- Hassan Mohamed, E.T.T.M., Omer Ahmed, M.(2016). Methods of Enzyme Immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7(6), 385-392.
- Holsinger, V., Kligerman, A.(1991). Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. *Food technology (USA)*, 45 (1), 92-95.
- Husain, Q., Ansari, S.A., Alam, F., Azam, A.(2011). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International journal of biological macromolecules*, 49, 37-43.
- Jamie, A., Alshami, A.S., Maliabari, Z.O., Ali Ateih, M., Al Hamouz, O.C.S.(2016). Immobilization and enhanced catalytic activity of lipase on modified MWCNT for oily wastewater treatment. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35, 1441-1449.
- Jiang, K., Schadler, L.S., Siegel, R.W., Zhang, X., Zhang, H., Terrones, M.(2004). Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. *Journal of Materials Chemistry*, 14, 37-39.

- Jovanovic-Malinovska, R., Fernandes, P., Winkelhausen, E., Fonseca, L.(2012). Galacto-oligosaccharides synthesis from lactose and whey by β -galactosidase immobilized in PVA. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168, 1197-1211.
- Jung, S.K., Chae, Y.R., Yoon, J.M., Cho, B.W., Ryu, K.G.(2005). Immobilization of glucose oxidase on multi-wall carbon nanotubes for biofuel cell applications. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15, 234-238.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S.(1987). Enzyme immobilisation. In: Kennedy, J. F. (ed.) *In Biotechnology, vol. 7a, Enzyme Technology*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Khan, A.A., Alzohairy, M.A.(2010). Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Res J Biol Sci*, 5, 565-75.
- Kobayashi, Y., Kan, T.(1990). *Method for producing processed milk containing galactooligosaccharide*. USA patent application 4944952.
- Mansor, N.A., Tessonnier, J.-P., Rinaldi, A., Reiche, S., Kutty, M. (2012). Chemically modified multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) with anchored acidic groups. *Sains Malays*, 41, 603-609.
- Markoglou, N., Wainer, I.W.(2003). Chapter 7 - Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: On-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery. In: Wilson, I. D. (ed.) *Handbook of Analytical Separations*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Miller, G.L.(1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31, 426-428.
- Mohy Eldin, M., Hassan, E., Elaassar, M.(2005). β -galactosidase covalent immobilization on the surface of alginate beads and its application in lactose Hydrolysis. *Deutsch lebensmittel-Rundschau*, 101, 255-259.
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R.(1985). Formation of Oligosaccharides During Hydrolysis of Lactose in Milk Using β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Food Science*, 50, 1602-1606.
- Neri, D.F., Balcão, V.M., Costa, R.S., Rocha, I.C., Ferreira, E.M., Torres, D.P., Rodrigues, L.R., Carvalho Jr, L.B., Teixeira, J.A. (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115, 92-99.
- O'driscoll, K.(1976). Techniques of enzyme entrapment in gels. *Methods in enzymology*, 44, 169-183.
- Patel, V., Shah, C., Deshpande, M., Madamwar, D.(2016). Zinc oxide nanoparticles supported lipase immobilization for biotransformation in organic solvents: a facile synthesis of geranyl acetate, effect of operative variables and kinetic study. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178, 1630-1651.
- Pavlidis, I., Tsoufis, T., Enotiadis, A., Gournis, D., Stamatis, H.(2010). Functionalized multi-Wall carbon nanotubes for lipase immobilization. *Advanced Engineering Materials*, 12, B179-B183.
- Playne, M., Crittenden, R.(2009). Galacto-oligosaccharides and other products derived from lactose. In: Mcsweeney, P., Fox, P. (ed.) *Advanced dairy chemistry*. New York: Springer.
- Prlainović, N.Ž., Bezbradica, D.I., Knežević-Jugović, Z.D., Stevanović, S.I., Ivić, M.L.A., Uskoković, P.S., Mijin, D.Ž. (2013). Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19, 279-285.
- Rastian, Z., ali Khodadadadi, A., Vahabzade, F., Mortazavi, Y.(2013). Functionalization of Multi -Walled Carbon Nanotubes for Lipase Immobilization. *The Journal of MacroTrends in Technology and Innovation*, 1 (1), 65-71.
- Rastian, Z., Khodadadi, A.A., Vahabzadeh, F., Bortolini, C., Dong, M., Mortazavi, Y., Mogharei, A., Naseh, M.V., Guo, Z.(2014). Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft

- dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization. *Biochemical engineering journal*, 90, 16-26.
- Rivero-Urgell, M. and Santamaria-Orleans, A.(2001). Oligosaccharides: application in infant food. *Early human development*, 65, S43-S52.
- Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A.O., Plou, F.J.(2014). Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. *Food Chemistry*, 145, 388-394.
- Ruiz-Matute, A.I., Corzo-Martínez, M., Montilla, A., Olano, A., Copovi, P., Corzo, N.(2012). Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28, 164-169.
- Satar, R., Ismail, S.A., Rehan, M., Ansari, S.A.(2016). Elucidating the binding efficacy of β -galactosidase on graphene by docking approach and its potential application in galacto-oligosaccharide production. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39, 807-814.
- Sheldon, R.A.(2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1289-1307.
- Smalla, K., Turkova, J., Coupek, J., Hermann, P. 1988. Influence of Salts on the Covalent Immobilization of Proteins to Modified Copolymers of 2-Hydroxyethyl Methacrylate with Ethylene Dimethacrylate. *Biotechnology and applied biochemistry*, 10, 21-31.
- Sun, S., Dong, L., Xu, X., Shen, S.(2010). Immobilization of [Beta]-galactosidase from *Aspergillus Oryzae* on Macroporous PloyGMA Newly Prepared. *International Journal of Chemistry*, 2 (1), 89-96.
- Taqieddin, E., Amiji, M.(2004). Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25, 1937-1945.
- Toher, J., Kelly, A.M., Bickerstaff, G.F.(1990). Stability properties of two supports for immobilization of enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 18, 313-314.
- Wahba, M.I., Hassan, M.E.(2015). Novel grafted agar disks for the covalent immobilization of β -D-galactosidase. *Biopolymers*, 103, 675-684.
- Wang, Q., Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J.(2011). Improved stability of the carbon nanotubes–enzyme bioconjugates by biomimetic silicification. *Enzyme and microbial technology*, 49, 11-16.
- Widmer, F., Leuba, J.L. (1979). β -Galactosidase from *Aspergillus niger*: Separation and Characterization of Three Multiple Forms. *European journal of biochemistry*, 100, 559-567.
- Wu, Z., Wang, Z., Guan, B., Wang, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Zhi, B., Liu, Y., Li, Z., Huo, Q.(2013). Improving the properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via encapsulation in aggregated silica nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 37, 3793-3797.
- Zhang, D.-H., Yuwen, L.-X., Peng, L.-J.(2013). Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. *Journal of chemistry*, 2013, 1-7.
- Zhou, Y., Pan, S., Wei, X., Wang, L., Liu, Y.(2013). Immobilization of β -glucosidase onto magnetic nanoparticles and evaluation of the enzymatic properties. *BioResources*, 8, 2605-2619.
- Zniszczoł, A., Herman, A.P., Szymańska, K., Mrowiec-Białoń, J., Walczak, K.Z., Jarzębski, A., Boncel, S.(2016). Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- and hydroxy-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselective synthesis of Solketal esters. *Enzyme and microbial technology*, 87, 61-69.

BÖLÜM 6

***NEOCALLIMASTIX PATRICIARUM* KSİLANAZIN KARBOKSİLE ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU**

Doç. Dr. Yakup ASLAN¹
Buşra ATALAY²

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051752>

¹Siirt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Siirt, Türkiye
dr_yakup@siirt.edu.tr, Orcid no: 0000-0001-9668-9559.

²Siirt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Siirt, Türkiye
busranuratalay@gmail.com, Orcid no: 0000-0002-8063-8789,

1. GİRİŞ

Kimyasal katalizörlere göre üstün özellikleri sayesinde biyolojik katalizörler olan enzimler, endüstride çok sayıda uygulama alanlarına sahip olmuşlardır. Ancak çözünür formdaki enzimler normalde birçok avantajla sahip olmalarına rağmen endüstrideki sürekli proseslere uygun olmadıkları için kesikli proseslerde bir kere kullanılıp ya ürünle beraber tüketilmekte veya çok pahalı teknikler kullanılarak üründen ayrılmaktadırlar. Bu da ürün maliyetini artırmaktadır. Ayrıca, yüksek sıcaklıklar, ekstrem pH'lar, kimyasal inhibitörler ve kullanım koşulları çözünür formdaki enzimlerin aktivitelerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu yüzden immobilizasyon işlemi bu anlamda birçok avantaj sağlamaktadır. Enzim moleküllerinin birbirlerine veya suda çözünmeyen katı bir desteğe kimyasal bağlarla bağlanarak veya bu moleküllerin desteğin içerisine hapsedilerek hareketlerinin kısıtlanması olan immobilizasyon; çözünür enzimlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için en etkili metottur. Ancak immobilize enzimlerin en önemli dezavantajı, kullanım şartlarında destekten koparak aktivitelerinin zamanla azalmasıdır. Bu bağlamda kullanılan birkaç enzim immobilizasyon metodları mevcuttur. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler arasında, en etkili olan kovalent bağlamadır. Bu yöntemde, enzim molekülleri desteğe en güçlü kimyasal bağ olan kovalent bağ ile bağlandıkları; ve kullanım sırasında enzim molekülleri destekten koparak ayrılmayıp aktivitelerini uzunca bir süre korudukları için sürekli proseslerde yüzlerce kez kullanılarak ürün maliyetini azaltmaktadırlar. Bu nedenle 1960lı yıllardan itibaren endüstride enzimlerin immobilize formda kullanılmaları tercih edilmektedir. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik yüzlerce katı materyal destek olarak kullanılmaktadır. Kullanılacak destek materyalinin dayanıklı, gıdyla temas halinde de kullanılabileceğinden toksik olmama, ucuz ve kolay bulunabilen, doğal olma gibi bazı özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bir immobilizasyon çalışmasında destek olarak kullanılan materyalin fizikokimyasal özellikleri bağlanma ve aktivite verimlerini oldukça etkilemektedir. Nanoteknoloji ürünü olan karbon nanotüpler, enzim immobilizasyonunda destek olarak da kullanılmaktadır. Geniş yüzey alanına sahip olduklarından yüksek enzim bağlama kapasitesine sahiptirler. Ayrıca inert ve antitoksik bir yapıya sahip olduklarından gıda proseslerinde güvenle kullanılabilirler. Ksilanaz, endüstriyel enzimlerin biridir ve substrat olarak ksilan polisakaritini kullanır. Ksiloz birimlerinden oluşur. Ksiloz birimleri birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarla bağlanır. Ksilanazlar; hemiselülozu daha basit birimlere parçalayan bir enzim sınıfıdır. Ksilan, doğada selülozdan sonra ikinci en sık rastlanan polisakarittir. Temel olarak ksilanın doğada dört farklı formu bulunur:

- α -L-arabinofuranosilin tek terminal birimlerinin yan zincirlerini içeren arabinoksilanlar,
- α -D-glukuronik asit ve bunun 4-O-metil eter türevine dayalı glukuronoksilanlar,
- Yapısında hem α -D-glukuronik (hem de 4-O-metil- α -D-glukuronik) asit hem de α -L-arabinoz bulunan glukurono arabinoksilanlar,
- Ksilanlardaki kompleks oligosakkarid yan zincirlerinde terminal β -D-galaktopiranozil kalıntıları ile karakterize olan galakto glukurono arabinoksilanlar (Burlacu ve ark., 2016).

Ksilanazlar, başta gıda endüstrisi olmak üzere yem ve kağıt endüstrilerinde çok yaygın kullanım alanına sahiptir. Bunun dışında; tekstil sanayisinde ve biyoyakıt üretim proseslerinde de kullanıldığı bilinmektedir (Burlacu ve ark., 2016). Aynı şekilde birbirlerine β -(1,4) bağı ile bağlı ksiloz monosakkaritlerinden oluşan ksilooligosakkaritler en önemli prebiyotiklerdendir. Prebiyotikler, insan sindirim sistemi tarafından sindirilmediklerinden kalorisizdirler ve kalınbağırsaktaki probiyotik bakterilerin çoğalmasını uyarak dolaylı yoldan bağırsak fonksiyonlarını düzenler, kalsiyum emilimini hızlandırarak kemik erimesini yavaşlatır ve kalınbağırsaktaki patojen mikroorganizmaların ürettiği kanserojen maddeleri elimine ederek kolon kanserini de önlerler. Sindirim sistemi tarafından hidrolize ve absorbe edilmediğinden ksilooligosakkaritler, bağırsaktayaşayan bakterilere substrat oluşturur. Bağırsak mikroflorasını daha sağlıklı bir yapı olması açısından değiştirir. Kabızlık, kanser, osteoporoz, kalp hastalıkları ve obezite gibi hastalıkları

önlediğinden sağlığa olumlu etkilerde bulunur. Ayrıca minerallerin biyolojik olarak kullanımını iyileştirmektedirler (Erdoğan ve Akpınar, 2006). 1990lı yıllardan itibaren başta Japonya olmak üzere, Çin, Kore, ABD ve Almanya gibi gelişmiş ülkelerde üretilen prebiyotiklerin pazarı dünya çapında hızla artmaktadır. Ancak maalesef, prebiyotikler ülkemizde henüz üretilmediğinden dışarıdan ithal edilerek gıda endüstrisinin ve tüketicilerin bireysel kullanımına arz edilmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Ksilan

Ksilan, heterojen bir yapıya sahip olan karmaşık bir kimyasal bileşiktir ve doğadaki bitkilerde selülozdan sonra en bol miktarda bulunan polisakkarittir (Burlacu ve Cornea, 2016). Yapısı, farklı bitki türlerine göre değişir ve homopolimer omurga zincirine, çeşitli konumlarda farklı yan zincir grupları olabilir ve dört ana gruba ayrılırlar (Motta ve ark., 2013):

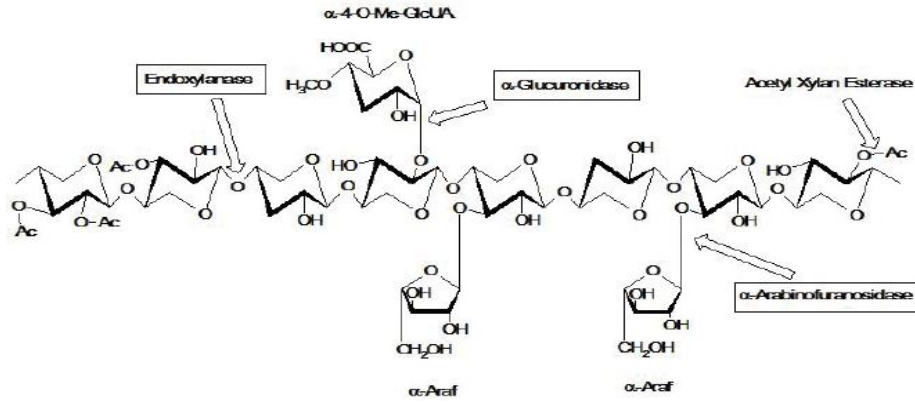
- Sadece α -L-arabinofuranosil'in tek terminal birimlerinin yan zincirlerini içeren arabinoksilanlar;
- Glukuronoksilanlar, sadece α -D-glukuronik bazda asit ve bunun 4-O-metil eter türevidir;
- Glukurono arabinoksilanlar, ki burada hem α -D-glukuronik (hem de 4-O-metil- α -D-glukuronik) asit ve α -L-arabinoz bulunur;
- Galakto glukurono arabinoksilanlar, ksilanlardaki kompleks oligosakkarid yan zincirlerinde terminal β -Dgalaktopiranosil artıklarının varlığı ile karakterizedir.

Ksilan, çeşitli doku ve hücrelerde dağılmış olarak çeşitli bitki türlerinde bulunmaktadır. Sert ağaçlarda (hücre duvarı içeriğinin % 15-30'u) ve yumuşak ağaçlarda (% 7-10) ve yıllık bitkilerde (<% 30) çok miktarda bulunur. Sert ağaçlarda, ksilan O-asetil-4-O-metilglukuronoksilan olarak ve yumuşak ağaçlarda, arapino-4-O-metilglukuronoksilan olarak, çimlen ve yıllık bitkilerde, arabinoksilan formunda bulunur. (Beg ve ark., 2001; Kulkarni ve ark., 1999).

2.2. Ksilanın Enzimatik Hidrolizi

Ksilan'ın parçalanmasında enzimlerin rolü Hopper-Seyler tarafından 100 yıl önce açıklanmıştı (Bastawde, 1992). Ksilan, heterojen bir yapıya sahip olan karmaşık bir kimyasal bileşik olduğundan, tam hidrolizi, farklı aktivite ve özelliklere sahip çeşitli hidrolitik enzimlerin harekete geçilmesini gerektirir: Ksilanolitik enzim sistemi, β -1,4-endoksilanaz, β -ksilosidaz, α -glukuronidaz, α -L-arabinofuranosidaz, asetil ksilan esteraz (Motta ve ark., 2013) ve fenolik asit (ferulik ve p-kumar asit) esteraz enzimlerini içerir (Beg ve ark., 2001; Dhiman ve ark., 2008). Bütün bu enzimlerin sinerjik etkisi, ksilanı bileşenleri olan şekerlere dönüştürür (Şekil 2.1). Monomerik ksilan molekülünün pentoz ünitelerine depolimerizasyonunda kullanılan ksilanazlar arasında, endoksilanazlar ve β -ksilosidazlar en önemlileridir. Endoksilanazlar, glikosidik bağları parçalamaya ve kısa ksiloligosakkaritleri serbest bırakmaya katılırken, ekzoksilanaz olan β -ksilozidazlar, ksiloz monosakkaritlerini ksilooligosakkaritlerin indirgen olmayan uçlarından başlayarak serbest bırakır (Motta ve ark., 2013). Asetil esteraz, ferulik esteraz, glukuronidaz ve arabinosidaz, ksilan omurgasından farklı yan zincirlerin salınması için gereklidir (Dhiman ve ark., 2008). Ancak endüstriyel ksilanazların genellikle mikrobiyal kaynaklı Endo-1,4- β -ksilanazlar (E.C.3.2.1.8) esas olarak bakteriler (*Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*) ve mantarlar (*Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*) gibi mikroorganizmalar tarafından üretildiği rapor edilmiştir. Ksilanaz üreten mikroorganizmalar arasında *Bacillus sp.* ve farklı mantarların bulunduğu da bildirilmiştir (Subramaniyan ve Prema, 2002). Bununla birlikte, pek çok başka kaynağı işaret eden raporlar bulunmaktadır: aşırı olgunlaşma döneminde Japon armut meyveleri, Avrupa buğdayının unu (*Triticum aestivum*) veya tatlı su yumuşakçası gibi (Subramaniyan ve Prema, 2002). β -ksilosidaz, ksilanın hidrolizi sırasında ksiloz salınan endoksilanazlardan etkilenmeyen ksilibiyozu kolayca hidrolize edebilir. α -L-arabinofuranosidazlar (E.C.3.2.1.55), arabinanlar, arabinoksilanlar ve arabinogalaktanların indirgeyici olmayan uçtan α -L-arabinofuranosil gruplarını hidroliz

eder. Bu tür enzimler; mantarlar, aktinomisetler ve diğer bakteriler (*Bacillus polymyxa*, *Rhodothermus marinus*) tarafından üretilir. α -D-glukuronidazlar (E.C.3.2.1.1), ksiloz ve D-glukuronik asit veya onun 4-O-metil eter bağlantısı arasındaki α -1,2-glikosidik bağların hidrolizini katalize

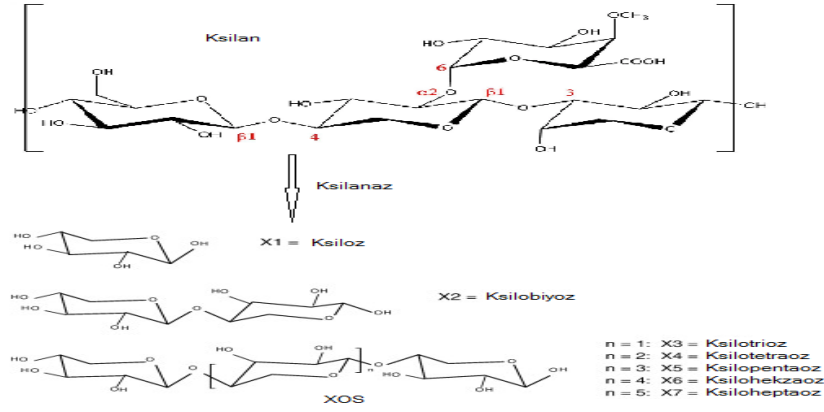


Şekil 2.1. Ksilan'ın yapısı ve bozunmasına katılan ksilanolitik enzimler. Ac: Asetil grubu; α -Araf: Arabino furanoz; α -4-0-Me-GlcA: a-4-0-Metil glukuronik asit (Sunna ve Antranikian, 1997).

eder. Bağlanmış asetik ve fenolik asitleri kaldırmak için esterazları kullanarak doğal glukuronoksilanların tam hidrolizi gereklidir. Asetilksil esteraz (EC 3.1.1.6), ksilozun asetik aside bağlanmasını keserken, feruloil esteraz (EC 3.1.1.73), arabinoz yan zincir kalıntılarını ferulik aside çevirir ve p-kumaroil esteraz, arabinoz yan zincir kalıntısını poularik asit haline dönüştürür. Genellikle, ksilanazlar saf ksilan veya ksilanca zengin ortamda salınan uyarılabilir enzimlerdir (Balakrishnan, 1997). Ksilanazların immobilizasyonu, uygulanabilir amaçlar için gereklidir. Bu nedenle, ya mikroorganizma ya da enzimler, katı materyal üzerine immobilize edilmektedir (Beg ve ark., 2001). Bu tezde, bir endo-1,4- β -ksilanaz (E.C.3.2.1.8) olan *Neocallimastix patriciarum* ksilanaz (NPX) c-MWCNT'ler üzerine immobilize edilmiştir.

2.3. Ksilandan XOS Üretimi

XOS genellikle ksilan açısından zengin lignoselülozik materyallerden (LCM) otohizoliz (suda veya buharda ısıtarak), mineral asitlerle seyreltik sulu solüsyonlarda kimyasal işlemler (Akpınar ve ark., 2009; Parajo ve ark., 2004), linyoselülozik materyallerin doğrudan enzimatik hidroliziyle (de Mendes ve ark., 2009; Brienzo ve ark., 2010; Akpınar ve ark., 2007) veya LCM'nin kimyasal fraksiyonlaması ve ksilan izolasyonunu müteakiben ksilanın XOS'a enzimatik hidrolizi (Şekil 2.2) ile üretilir (Teng ve ark., 2010). XOS'ların üretimi için tipik hammaddeler sert ağaçlar (örneğin huş ağacı, kayın ağacı), mısır koçanları, samanlar, küspeler, pirinç kabukları, malt kekleri ve kepeklerdir (Vazquez ve ark., 2000). Son yıllarda hızla büyüyen fonksiyonel gıda pazarı ve artan sayıda diğer endüstriyel uygulamalar, XOS üretiminde sert kereste ksilanı yerine yenilenebilir ve ucuz ksilan kaynaklarının kullanılmasını teşvik etmektedir. Sonuç olarak, pamuk sapları, tütün sapları ve buğday kepeği gibi tarımsal kalıntılar da yoğun olarak incelenmiştir (Akpınar ve ark., 2009). Ülkemizde 1990 yılından beri yılda ortalama 20 milyon ton buğday üretildiğinden (TMO, 2016), her yıl yaklaşık olarak 5 milyon ton buğday kepeği elde edildiği tahmin edilmektedir. Bu projede elde edilecek olan immobilize NPX enzimi, endüstride hayvan yemi ve diyet lifi üretiminde kullanılan buğday kepeğinden (Doty, 2012) gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de katma değeri yüksek olan XOS üretiminde kullanılabilecektir.



Şekil 2.2. Ksilandan enzimatik hidroliz ile XOS üretimi (Teng ve ark., 2010).

2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, yüzyıllardan beri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmelerin sonucu olarak günümüzde ilaç ve kimya endüstrisinde de uygulama alanları bulmuşlardır. Enzimler kimyasal katalizörlere göre, son derece yüksek katalitik aktiviteye sahiptir ve belirli şartlar altında bu aktiviteleri tek bir substrata veya substrat grubuna özgüdür. Ayrıca ortam koşullarında oldukça etkili katalizörlerdir. Bu nedenle, istenmeyen ürünlerin oluşma ihtimali çok azdır. Ancak, endüstride enzimlerin doğal formlarıyla kullanılmasının önemli dezavantajları vardır. Örneğin, aynı enzim örneği ya bir kere kullanılmakta ve ürünle birlikte tüketime sunulmakta veya tekrar kullanılması için, ancak pahalı teknikler kullanılarak üründen ayrılabilirdiğinden, ürünün maliyeti yükselmektedir. Enzimlerin en büyük dezavantajı olan kısa ömürlü olmalarını gidermeye yönelik son 40 yılda yapılan araştırmalar enzimatik deaktivasyon metodlarına ve biyokatalitik yaklaşımdaki eksikleri gidermeye yönelik olmuştur. Bir diğer dezavantajı ise, pH ve sıcaklıktaki değişimlere, kullanım şartlarına ve saklama koşullarına bağlı olarak, aktivitelerinde önemli kayıpların meydana gelmesidir. Çoğu enzim, düşük sıcaklıklarda ve nötr pH'larda sulu ortamda saklandığında stabildir. Fakat yüksek basınç ve sıcaklık, yüksek pH noktalarına sahip organik çözücüler yada dondurma, kurutma, şelatlama ve denatüre edici ajanların kullanıldığı proseslerde stabil kalmaları güçleşir. Bu dezavantajların giderilmesi için ilk yaklaşım, suda çözünen stabilizatörler ilave etmek olmuştur. Metaller, surfaktanlar, polioller, polietilenglikoller, proteinler, aminoasitler ve bazı şekerler ilave edilerek enzimlerin aktiviteleri kararlı hale getirilmiştir. Bu kararlılık artışı, enzim ve çözücü arasında non-kovalent etkileşimlerin bir sonucudur (Drevon, 2002). Ancak bu yöntem, aynı enzim örneğinin çok defa fazla kullanılması yönünde herhangi bir katkıda bulunmaz. Diğer bir yaklaşım ise enzim immobilizasyonudur. İmmobilizasyon, toksik olmayan işlemlerde enzimlerin katalizör olarak uygulanmasını sağlamak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Drevon, 2002). Ancak bu yöntem, aynı enzim örneğinin çok defa fazla kullanılması yönünde herhangi bir katkıda bulunmaz. İmmobilizasyon, enzim aktivitesini uzun süre korumak için, suda çözünmeyen bir matris adsorbsiyon, kovalent bağlanma veya matris içine hapsederek enzimin hareketinin sınırlandırılmasıdır. İmmobilizasyon çok avantajlı bir işlemdir ve endüstrilerde enzim katalizli reaksiyonlar için çözünür enzimler yerine yaygın olarak kullanılır (Shukla ve arkadaşları, 2012). Enzim immobilizasyonunda organik ve inorganik yapıda çok sayıda doğal veya yapay matris kullanılmaktadır. Eupergit'ler, kalsiyum alginat ($C_6H_7O_6Ca$)_n, jel ve kapsülleri ile aktif karbon ile karbon nanotüpleri yaygın olarak kullanılan matrislerdendir. İmmobilize enzimler, kullanılan matrisin yapısına ve immobilizasyon metoduna bağlı olarak, serbest enzimlere göre farklı özellikler gösterir. İmmobilize enzimin optimum şartları, kinetik sabitleri ve ürün bileşimleri serbest enzime göre farklılık gösterebilir.

İmmobilize enzim kullanımının faydaları aşağıda gösterilmiştir:

- Reaksiyon ortamından basit yöntemlerle ayrılabilir,
- Yüksek sıcaklık ve pH'ya karşı daha dayanıklıdır,
- Sürekli proseslerin uygulanmasını mümkün kılar,
- Defalarca kullanılabilir,
- Saklama şartlarında aktivitelerini aylarca koruyabilir,
- Ürün maliyetini düşürür,
- Saf ürün eldesini mümkün kılar,
- Seçici olarak bazı malzemelerin sentezi mümkün olur,
- Ürün inhibisyonu önlenir.

İmmobilizasyon çalışmaları 1960'ların ilk yarılarında başlamış ve günümüze kadar konu ile ilgili olarak, 10.000'in üzerinde makale ve patent yayınlanmıştır. Tosa ve ark. (1966) tarafından Japonya'da İmmobilize *Aspergillus oryzae* aminoçilaz kolonlarının geliştirilmesi ve sentetik rasemik D-, L-aminoasitlerin aktif enantiyomerlere dönüştürülmesinde kullanılması, immobilize enzimlerle ilgili ilk endüstriyel uygulamadır.

2.4.1. Enzim immobilizasyon metotları

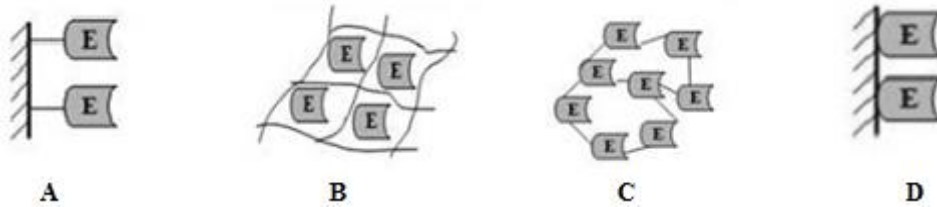
İmmobilizasyon metotları genellikle, bağlanma reaksiyonun tipine göre sınıflandırılır. Buna göre, enzim immobilizasyon metotları; adsorpsiyon, entrapment (bir polimerik jel içine hapsedme), bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanma ve kovalent bağlanma (Şekil 2.3) olmak üzere başlıca dört ana grupta toplanır.

2.4.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu, enzimin en zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir matrikse bağlanmasıdır. Adsorpsiyon oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta matriksle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimle matriks arasında zayıf bağlar (van der Waals ve hidrojen bağları) oluşur ve enzimler matriksten kolaylıkla ayrılırlar. İyon değiştiriciler kolaylıkla proteinleri adsorbe ederler ve enzim immobilizasyonu için endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Tablo 2.1'de, adsorpsiyon için kullanılan adsorbentler yer almaktadır.

2.4.1.2. Entrapment (Hapsedme)

Bir polimerin oluşumu sırasında, enzimin oluşan polimer içinde hapsedilmesine entrapment denir. Bu metot için en yaygın olarak kullanılan polimerlerden birisi aljinik asittir.



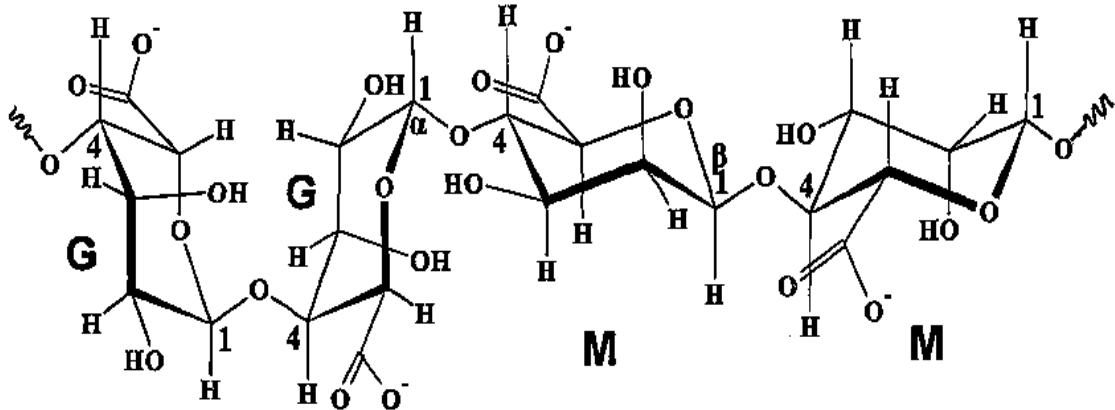
Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon metotları. A) Kovalent bağlama, B) Entrapment, C) Çapraz bağlama, D) Adsorpsiyon.

Tablo 2.1. Adsorbsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler

| Etkileşme | Adsorbentler |
|----------------------|--|
| Fiziksel Adsorbsiyon | Doğal Matrisler Aktif Karbon Silika jel Alumina Cam Nişasta |
| | Modifiye Matrisler Concanavalin A Sephrose Tannin Amino hekzil selüloz Fenoksiasetil selüloz |
| İyonik Bağlanma | Kasyon Değiştiriciler CM-selüloz Dowex 50 Amberlite CG-50 |
| | Anyon Değiştiriciler DEAE-selüloz DEAE-sephadex Amberlite |

2.4.1.2.1. ENZİMLERİN KALSİYUM ALGINAT İLE İMMOBİLİZASYONU

Alginatlar, kahverengi deniz yosunlarından (*Phaeophyceae*, başlıca *Laminaria hyperborea*) elde edilen, α -(1,4)-L-gluronik asit (G) ve β -(1,4)-D-mannuronik asit (M) birimlerinden oluşan anyonik, lineer bir polisakkarittir (Smidsrod ve Skjak-Braek, 1990; Blandino ve ark., 2001). Alginat molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.4'te görülmektedir. Alginat moleküllerinde bulunan G ve M monomerlerinin oranı ve dizilişi, alginatın elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Alginatlar sulu çözeltilerinde, Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlarla iyonik bağlanma yaparak jel oluştururlar. Jel oluşumu, farklı alginat zincirlerindeki G'lerin karboksil grupları ile Ca^{+2} iyonları arasındaki kooperatif bağlanma sonucu gerçekleşir. Alginat kullanılarak enzimler değişik metotlarla immobilize edilebilir. Enzim, alginat çözeltisiyle karıştırılarak kalsiyum klorür çözeltisine damlatıldığında kalsiyum alginat beadleri oluşur. Enzim, kalsiyum klorür ile karıştırılarak alginat çözeltisine



Şekil 2.4. Alginat polimerlerinin molekül yapısı. G: Gluronik asit, M: Mannuronik asit

damlatıldığında ise kalsiyum alginat kapsülleri oluşur. Enzim-alginat-gliserol karışımı, kalsiyum klorür çözeltisine şırınga ile iplik şeklinde enjekte edildiğinde, kalsiyum alginat fiberleri oluşur. Oluşan bead, fiber veya kapsülün gözenek büyüklüğü, kullanılan alginat ve kalsiyum klorür çözeltisinin derişimine bağlıdır. Molekül ağırlığı 300.000 dalton olan enzimler bile alginat jellerinden kaçabilmektedir. Bu nedenle,

kalsiyum alginat ile immobilizasyon genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılır. Alginat ve kalsiyum klorür derişimleri optimize edilerek, enzimler de alginat içerisinde bu üç yöntemden birisi ile immobilize edilmiştir. (Blandino ve ark., 2000; Hayashi ve ark., 1994). Alginatlar, toksik olmayan doğal polimerlerdir ve ekonomik olarak elde edilmektedir. Alginat jellerinin (bead, kapsül, fiber) gözeneklerinin büyük olması ve fosfat gibi bazı anyonlar içeren reaksiyon ortamlarında kararlılığının düşük olması, kullanılmalarını sınırlayan faktörlerdir.

2.4.1.3. Çapraz bağlama

Sulu çözeltilerde çözünebilir enzimler, bifonksiyonel çapraz-bağlayıcı reaktifler kullanılarak birbirine kovalent olarak bağlandıklarında çözünmez hale gelirler. (Chui ve Wan, 1997). Glutaraldehit bu amaç için kullanılan çapraz-bağlayıcı reaktiflerdendir (Klibanov, 1983). Bifonksiyonel glutaraldehit molekülündeki aldehit grupları, enzimlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek enzimleri çapraz bağlar. Çapraz bağlanma moleküller arası veya molekül içi oluşabilir ve protein çöker. Çapraz bağlı protein santrifüj ile kolaylıkla ayrılabilir.

2.4.1.4. Kovalent bağlama

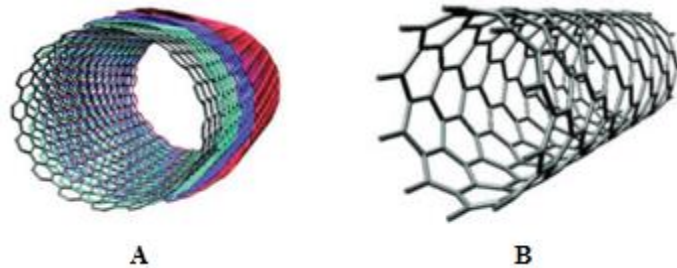
Enzimler genellikle amino, karboksil, sülfidril, hidroksil veya imidazol gruplarıyla, doğal ve yapay çok sayıda katı matrikse kovalent bağlanmayla immobilize edilebilirler. Üzerinde aktif gruplar bulunduran matriksler, uygun tampon çözeltide enzimlerle muamele edilerek immobilizasyon gerçekleştirilir. Üretan prepolimerler kovalent immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan matrikslerdendir. Prepolimerler, diizosiyanat türevlerinin, aktif hidrojen ihtiva eden çeşitli bileşiklerle (glikol, poliglikol, poliol) reaksiyonlarından elde edilirler ve yapılarında izosiyanatlar bulunur. Prepolimerler su ile muamele edildiğinde süngerimsi yapıda polimer meydana gelir. Ortamda enzim bulunduğunda, enzimin aktif hidrojen bulunduran gruplarıyla, izosiyanat grupları kovalent bağlar oluştururlar.

2.5. Enzim immobilizasyon Matrisi Olarak Karbon Nano Tüpler (CNT)

CNT, immobilizasyon işlemi için ilginç ve önemli özellikleri olan yüksek yüzey alanı ve mekanik stabiliteye sahip oldukları için, enzim immobilizasyon için mükemmel matrikslerdir. Bu özellikleriyle enzimler CNT yüzeyine kolaylıkla tutunur (Prlainovic et al., 2013). Karbon nanotüpler tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) olarak iki sınıfa ayrılırlar (Şekil 2.5). İki türün de birbirine göre farklı özellikleri mevcuttur (Saifuddin ve ark., 2013). İkisinin karşılaştırılması Tablo 2.2’de verilmiştir.

2.6. c-MWCNT ile İlgili Enzim İmmobilizasyonu Çalışmaları

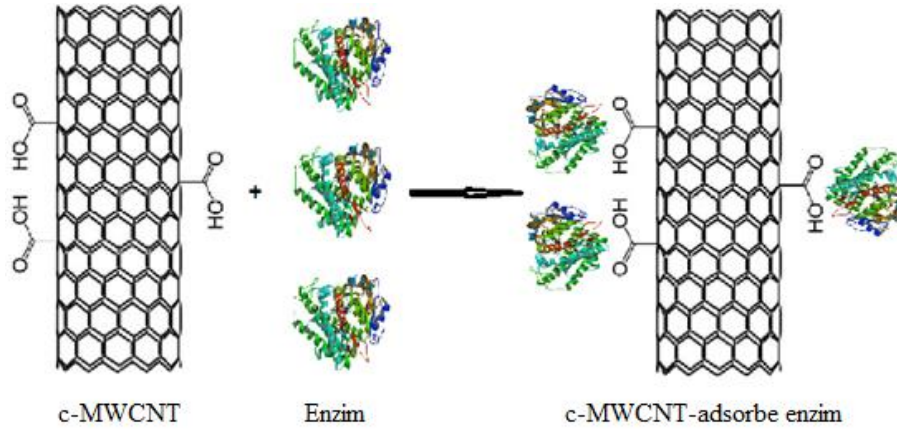
Literatürde, c-MWCNT’lerin enzim immobilizasyonunda kullanılması ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Şekil 2.6’da görüldüğü gibi, adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon, enzim ile matriksin bir tampon çözelti ile karıştırılarak uygun sürede inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Garlet ve ark., 2014).



Şekil 2.5. Karbon nanotüplerin üç boyutlu yapıları. A) MWCNT, B) SWCNT

Tablo 2.2. SWCNT ve MWCNT' in karşılaştırılması

| SWCNT | MWCNT |
|---|--|
| Tek grafen katmanı vardır. | Çoklu grafen katmanı vardır. |
| Sentez için katalizör gereklidir | Katalizör olmadan da sentezlenebilir. |
| Toplu olarak sentezi zordur. | Toplu halde sentezlemek kolaydır. |
| Tam olarak dağılmamıştır ve toplanmış yapılar oluşturur. | Paket şeklinde bir oluşum olmamakla beraber homojen şekilde dağılmıştır. |
| Saflık düşüktür.Fakat ark deşarj sentezi yöntemi kullanılarak% 80'e varan yüksek saflık rapor edilmiştir. | Saflık yüksektir. |
| Fonksiyonelleştirme sırasında bir bozukluk olma şansı daha fazladır. | Özellikle ark deşarj sentezi yöntemiyle sentezlendiğinde bir bozukluk olma şansı daha azdır. |
| Karakterizasyon ve değerlendirme kolaydır. | Çok karmaşık bir yapıya sahiptir. |
| Kolayca bükülebilir ve esneyebilir. | Kolayca bükülemez. |

**Şekil 2.6.** c-MWNT ile enzim immobilizasyonu

immobilizasyonda ilk önce, c-CNT'ler üzerindeki karboksil (-COOH) grupları N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDAC) ile aktifleştirilmektedir. Daha sonra da bu gruplar aracılığıyla enzim molekülleri matrikse bağlanmaktadır (Jiang ve ark., 2004). Enzimler c-MWCNT yüzeyine kovalent bağlanma ve adsorbsiyon ile immobilize edilebilir. Adsorbsiyonun avantajları, enzimlerin immobilize olduktan sonra hem kendi orijinal özelliklerini hemde matriksin özelliklerini koruyabilmesi ve kolayca gerçekleştirilebilen basit bir yöntem olmasıdır (Weiser, 2015). c-MWCNT'ler ile çeşitli enzimler kullanılarak yapılan enzim immobilizasyon çalışmaları mevcuttur. Aşağıda bu çalışmalar özetlenmiştir. Soo-Keun ve arkadaşları 2005 yılında *Aspergillus niger* Glucose oxidase enzimini c-MWCNT üzerine immobilize etmişlerdir (Soo-Keun ve ark., 2005). Pavlidis ve ark. (2010) *Candida antarctica* lipase B enzimini fiziksel adsorbsiyon metoduyla c-MWCNT üzerine immobilize etmiş olup, 6 ay sonunda hala % 55 aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Wang ve ark. (2011) Papain enzimini c-MWCNT üzerine immobilize edip bağlanma veriminin % 18.8, aktivite veriminin % 78.9 ve kullanım kararlılığının da 7 kullanım sonunda % 61 olduğunu bildirmişlerdir. Rastian ve ark. (2013), *Candida rugosa* lipase enzimini MWCNT üzerine immobilize etmişler ve bağlanma verimini % 52, aktivite veriminin % 48 olduğunu belirtmişlerdir. Garlet ve ark. (2014), *Aspergillus niger* inulinaz enzimini MWCNT üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmiş olup, bağlanma veriminin % 90, saklama kararlılığının 5 hafta sonunda hala % 100 aktiviteye sahip olduğunu

bildirmişlerdir. Rastian ve ark. (2014)'nin yaptıkları diğer bir çalışmada *Candida rugosa* lipaz enziminin MWCNT ile immobilizasyonu % 86.7 bağlanma verimi ve % 492.5 aktivite verimi ile sonuçlanmıştır. Ayrıca aktivitenin 7. kullanım sonunda hala % 123.7'si korunmuştur. Azevedo (2014) yılında ticari olarak satın alınmış peroksidaz enzimini MWCNT üzerine immobilize etmiş olup bağlanma veriminin % 100, kullanım kararlılığının 9 kullanım sonunda hiç kalmadığını, ayrıca 40 günün sonunda hala % 34 aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Zniszczoł ve ark. (2016), *Pseudomonas fluorescens* lipaz enzimini kovalent bağlama yoluyla MWCNT üzerine immobilize edip, bağlanma veriminin % 59, aktivite veriminin % 1200 olduğunu, ayrıca kullanım kararlılığının 8 kullanım sonunda % 60 devam ettiğini belirtmiştir. Feng ve arkadaşları (2015) α -Amylase ve glucoamylase enzimlerini MWCNT üzerine immobilize edip % 95.1 aktivite verimi ve 8 kullanım sonunda % 95.1 kullanım kararlılığı elde etmişlerdir. Jamie ve arkadaşları 2016 yılında yeniden *Candida rugosa* lipase enzimini immobilize edip, % 59 bağlanma verimi, % 1200 aktivite verimi ve 8 kullanım sonunda % 60 kullanım kararlılığı elde etmişlerdir.

2.7. NPX'in İmmobilizasyonu ile İlgili Çalışmalar

Yaptığımız literatür araştırmasında, NPX'in immobilizasyonu ile ilgili sadece iki çalışmaya rastlanıldı. Bunlardan ilkinde, Liu ve ark. (1997), *Brassica napus*'ta eksprese edilen rekombinant NPX kanola çekirdeğinden elde edilen oleosin proteini'nin N' ucuna füzyon yolu ile immobilize etmişlerdir. Diğer çalışmada, Liu ve ark., (2008), *Escherichia coli*'de eksprese rekombinant NPX'i, kanola çekirdeklerinden elde edilen oleosin proteini'nin N' ucuna füzyon yolu ile immobilize etmişlerdir. Literatür araştırmamızın sonucu olarak; NPX'in immobilizasyonu az çalışıldığı ve c-MWCNT ile immobilizasyon çalışmalarında yüksek enzim bağlama kapasitesi ve enzim aktivitesinde 12 kata kadar aktivite artışı rapor edildiği görüldü. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, öncelikle NPX'in c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile yüzde yüz immobilizasyon verimi ve yüksek aktivite artışı sağlamak için immobilizasyon koşullarının optimizasyonu amaçlandı. İkinci amaç ise immobilize NPX'i optimum aktivite koşullarını tayin ederek karakterize edip serbest NPX ile karşılaştırmaktı. Son amaç ise, immobilize NPX kullanarak ksilanın hidroliz koşullarını optimize ederek yüzde yüz verimle XOS üretimi imkanlarını araştırmaktı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

NPX, Mega-zyme firmasından (Troy, Amerika Birleşik Devletleri), c-MWCNT'ler (iç çapı 5-15 nm, dış çapı 28-48 nm, uzunluk 10-25 μ m) Nanografi Co. Ltd. şirketinden (Ankara, Türkiye) satın alındı. Nitroselüloz membran filtreler (por çapı 0.45 μ m, membran çapı 47 mm) ISO-LAB (Wertheim, Germany) firmasından satın alındı. Beech wood ksilan SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg Germany) firmasından temin edilmiştir. Ksiloz Sigma-Aldrich firmasından (St. Louis, Missouri, USA) satın alınmıştır. UV-VIS Spektrometresi (UV-6300PC), VWR firmasından (Radnor, USA); pH metre (Hanna HI 2020 edge), Hanna Instruments Ltd. firmasından (Bedfordshire, İngiltere), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard), Heidolph UK - Radleys firmasından (Shire Hill, İngiltere), saf su cihazı (Mini Pure 1, MDM-0170), MDM Co. Ltd. firmasından (Suwon-si, Güney Kore), hassas terazi (Shimadzu-ATX224), Shimadzu Corporation firmasından (Kyoto, Japonya), orbital çalkalamalı ısıtmalı inkübatör (Mipro-MCI), Protek Lab Grup Profesyonel Laboratuvar Çözümleri firmasından (Ankara, Türkiye), vakum pompası (Biobase, GM-0.50A), Biobase Biodustry Co, Ltd. firmasından (Shandong, Çin) satın alındı. Bovine Serum Albumin, Sodyum Hidroksit, Sodyum Dihidrojen Fosfat, Hidro Klorik Asit, 3,5-dinitrosalisilik asit, Sodyum Potasyum Tartrat ve Bradford Reagent ise Sigma-Aldrich firmasından (Taufkirchen, Germany) ve Sodyum Azid, Merck Millipore firmasından (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır.

3.2. Metotlar

3.2.1. c-MWCNT'ler ile NPX immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonunda bağlanma verimini ve aktivite verimini etkileyen koşullar (immobilizasyon yapılacak tamponun pH'sı ve derişimi, matriks miktarı) sırayla değiştirilerek koşullar optimize edildi. Adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon, Garlet ve arkadaşlarının metoduna göre adsorbsiyon ile gerçekleştirildi (Garlet ve ark., 2014).

3.2.2. Protein (enzim) tayini

Protein derişimlerinin tayini, Bradford (1976) metoduna göre, 0.25-1.4 mg/mL aralığındaki derişimlerde hazırlanan Bovine Serum Albümin Standart çözeltilerinin çift ışık yollu UV spektrometresinde 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbanları kullanılarak oluşturulan standart grafiğine (Şekil 3.1) ait doğru denklemine (3.1) göre yapıldı.

$$Y = 0.000336 X + 0.00449 \quad (3.1)$$

3.2.3. NPX aktivitesinin tayini

NPX aktivitesi, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50 µL serbest ksilanaz çözeltisi ve 5 mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan standart koşullarda (pH 5.5; sıcaklık 55 °C; süre 30 dakika; ve çalkalama hızı 150 rpm) yapılan reaksiyonu ile belirlendi. Bir IU NPX aktivitesi, standart koşullarda, 5 mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltisinde 1 dakikada 1 µmol ksiloz oluşturan enzim miktarı (mg) olarak tanımlandı. Oluşan indirgen şeker derişimleri, Şekil 3.2'de görülen ksiloz standart grafiğine ait doğru denklemi (3.2) kullanılarak hesaplandı. Ksilanaz aktivitesi ise 3.3 denkleminde hesaplandı.

$$Y = 0.06686 X + 0.00013 \quad (3.2)$$

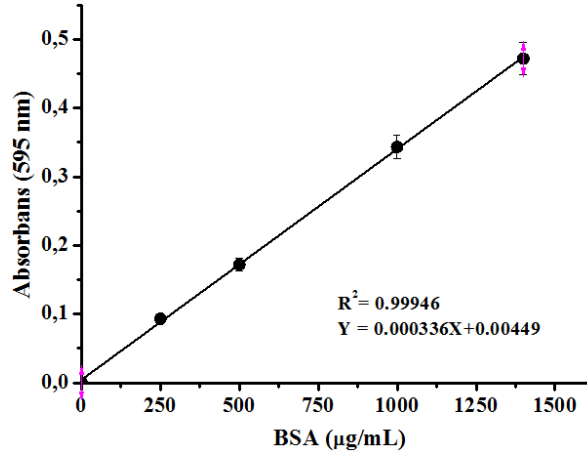
$$\text{Aktivite (} \mu\text{mol/mg.dk)} = \frac{\text{İndirgen şeker (} \mu\text{mol)}}{\text{Kullanılan enzim (mg) x reaksiyon süresi (dk)}} \quad (3.3)$$

3.2.4. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması

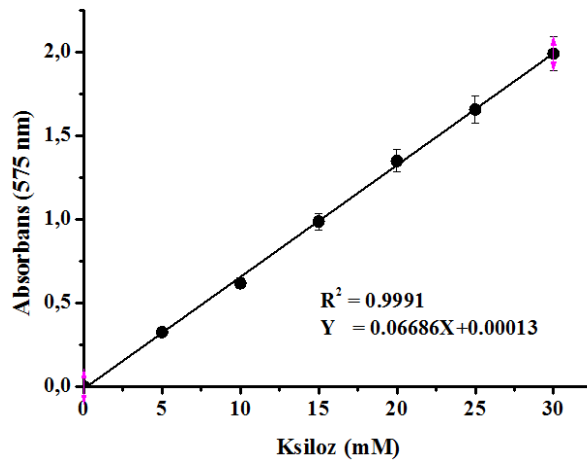
İmmobilizasyondan önce ve sonra immobilizasyon çözeltilerindeki enzim miktarları kullanılarak bağlanma ve aktivite verimleri sırasıyla denklem (3.4) ve (3.5) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = \frac{(\text{İmmobilizasyonda kullanılan enzim} - \text{Süzüntüdeki enzim})}{\text{İmmobilizasyonda kullanılan enzim}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Aktivite verimi (\%)} = \frac{\text{İmmobilize enzimin aktivitesi}}{\text{Sıvı enzimin aktivitesi}} \times 100 \quad (3.5)$$



Şekil 3.1. BSA standart grafiği



Şekil 3.2. Ksiloz standart grafiği

3.2.5. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu

İmmobilizasyonda immobilizasyon tamponunun pH'sı ve molaritesi, sabit miktarda enzime karşı kullanılan matris miktarı ve immobilizasyon süresi immobilizasyon verimi ve aktivite verimini etkilediğinden (Garlet ve ark., 2014), bu faktörlerden her birinin etkisi sırayla incelenerek immobilizasyon şartları optimize edildi.

3.2.4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki pH'ları farklı (4.5-5.0-5.5-6.0-6.5) olan 5'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerine 25 mg c-MWCNT ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest enzim (2.17 IU) ilave ederek 25 °C'de 150 rpm hızla çalkalanan inkübatörde 30 dakika süreyle gerçekleştirildi. İmmobilizasyondan sonra immobilizasyon çözeltileri ile süzüntülerinde enzim tayini ve bağıl aktiviteler 50 µL (2.17 IU) serbest ve 186 mg immobilize NPX'ler, 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker derişimleri kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Elde edilen immobilizasyon ve aktivite verimleri tabloda karşılaştırılarak immobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi incelendi.

3.2.4.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki derişimleri farklı (25-50-75-100 mM) 5'er mL fosfat tamponu çözeltilerine (pH 6.0) 10'ar mg ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ilave ederek 25 °C sıcaklıkta 150 rpm hızla ısıtılmalı orbital çalkalamalı inkübatörde, 30 dakika süreyle gerçekleştirildi. İmmobilizasyondan sonra immobilizasyon çözeltileri ile süzüntülerinde enzim tayini ve 50 µL (2.17 IU) serbest ve 186 mg immobilize NPX'ler, 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker derişimleri kullanılarak bağıl aktivite tayini yapıldı. Elde edilen immobilizasyon ve aktivite verimleri karşılaştırılarak immobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi incelendi.

3.2.4.3. Matriks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki 5'er mL 100 mM'lık dört ayrı fosfat tampon çözeltilerine (pH 6.0) sırasıyla 20, 30 ve 40 mg c-MWCNT ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ilave edilerek, 25°C'de 150 rpm hızla çalkalayan ısıtılmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 30 dakika süreyle gerçekleştirildi. İmmobilizasyondan sonra immobilizasyon çözeltileri ile süzüntülerinde enzim tayini ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186 mg immobilize NPX'ler, 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker derişimleri kullanılarak bağıl aktivite tayini yapıldı. Elde edilen immobilizasyon ve aktivite verimleri karşılaştırılarak immobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi incelendi.

3.2.4.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Bu aşamaya kadar yapılan 30 dakika immobilizasyon maksimum bağlanma ve verim elde edildiğinden dolayı, immobilizasyon etkinliğine sürenin etkisi incelenmedi.

3.2.5. Serbest ve immobilize NPX'in karakterizasyonu

İmmobilize enzimin optimum pH ve sıcaklığı, V_{max} ve K_m sabitleri, pH kararlılığı, termal kararlılığı, kullanım kararlılığı ve saklama kararlılığı gibi kinetik özellikleri belirlenerek immobilize enzim karakterize edildi.

3.2.5.1. Optimum pH tayini

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'lerin 5'er mL 25 mM'lık farklı pH'lardaki (4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-6.5-7.0-7.5-8.0) fosfat tamponu ile hazırlanmış % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtılmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 55 °C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edildi. serbest ve immobilize NPX'in optimum pH aralığı, Bağıl aktivite (%) - pH grafiğinden belirlendi.

3.2.5.2. Optimum sıcaklık tayini

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'lerin 25mM fosfat tamponu (pH 6,0) ile hazırlanmış 5'er mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtılmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-45-50-55-60-

65-70-75-80 °C) 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, Bağıl aktivite (%) - Sıcaklık (°C) grafiğinden serbest ve immobilize NPX'in optimum sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.3. pH kararlılığının tayini

pH kararlılığı, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'ler 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'ları farklı (3.0-3.5-4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-6.5-7.0-7.5-8.0) olan 1'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında (50 °C), 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 5.5) ile hazırlanmış 4'er mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltileri eklenerek 50°C'de, 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edilen kalan aktiviteler karşılaştırılarak belirlendi.

3.2.5.4. Isıl kararlılık tayini

Isıl kararlılık pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'ler 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'ları 5.5 olan 1'er mL 100 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-35-40-45-50-55-60-65-70-75-80 °C) 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 5.5) ile hazırlanmış 4'er mL % 0.625 (w/v)'lik ksilan çözeltileri eklenerek 55 °C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edilen kalan aktiviteler karşılaştırılarak belirlendi.

3.2.5.5. Kinetik sabitlerin tayini

pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'lerin başlangıç aktiviteleri, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık fosfat tamponu ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki (125-1500 µg / mL) 5'er mL ksilan çözeltileri ile 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 10 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda başlangıç hızları tayin edilerek, çizilen Lineweaver-Burk Grafiğinden V_{max} ve K_m sabitleri hesaplandı.

3.2.5.6. İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı

İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı, 186 mg (3.48 IU) immobilize NPX'in standart koşullarda tekrarlanan peş peşe 20 kez tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlendi. İmmobilize enzim her kullanımdan sonra sinterli cam süzgeç ve nitroselülöz membran filtre kullanılarak vakum altında bol miktarda saf su ile yıkandı.

3.2.5.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı

İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı, 186 mg (3.48 IU) immobilize NPX'in 5 mL 0.250 M'lık fosfat tamponu çözeltisi içerisinde buzdolabında +4 °C'de 20 gün boyunca depolandığı süre boyunca iki günde bir, standart metoda göre tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlendi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra bol miktarda saf su ile yıkandıktan sonra % 0.2 (w/v) derişiminde sodyum azid içeren 5 mL 0.25 M'lık fosfat tamponu çözeltisi içerisinde buzdolabında +4 °C'de depolandı.

3.2.6. İmmobilize NPX kullanılarak ksilandan XOS üretimi

3.2.6.1. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi

186 mg (3.48 IU) immobilize NPX'ler farklı derişimlerdeki (125-1500 µg / mL) 5'er mL ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 55 °C'de 30 dakika süreyle

gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda oluşan indirgen şeker derişimleri tayin edilerek, çizilen grafikten maksimum verim elde edilen ksilan derişimi tayin edildi.

3.2.6.2. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi

5'er mL 1500 µg / mL'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) farklı miktarlardaki (186-1860 mg) immobilize NPX'ler ile 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 55 °C'de 30 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda oluşan indirgen şeker derişimleri tayin edilerek, çizilen grafikten maksimum verim elde edilen immobilize NPX miktarı tayin edildi.

3.2.6.3. Hidroliz süresinin XOS verimine etkisi

744 mg (13.92 IU) immobilize NPX ile 10 mL 1500 µg / mL'lik ksilan çözeltilisinin (pH 5.5) reaksiyonu 6 saat süreyle takip edilerek ksilan ve indirgen şeker derişimlerinin zamana karşı çizilen grafiğinden ksilanın tamamen XOS'a dönüştüğü süre belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein (Enzim) Tayini

Denklem (3.1)'e göre, 50 µL serbest NPX içeren 5.05 mL immobilizasyon çözeltisi içindeki enzim konsantrasyonu 1.06 mg olarak hesaplandı. Sıvı halde bulunan NPX preparatındaki enzim konsantrasyonunda 158.625 mg / ml olarak hesaplandı.

4.2. NPX Aktivitesinin Tayini

Optimum aktivite tayini koşullarında oluşan ksiloz miktarı Denklem (3.2)'ye göre 10.325 µmol olarak bulunmuştur. Serbest NPX aktivitesi ise, Denklem (3.3)'ten 2.17 IU enzim olarak hesaplandı. Ayrıca 1 mL NPX preparasyonu 158.63 mg serbest NPX içerdiğinden, sıvı haldeki ticari NPX aktivitesinin substrat olarak Beechwood ksilan için 825.70 IU / mL olduğu hesaplandı. Öte yandan, 1 IU aktiviteye sahip olan serbest NPX miktarı da 2.05 mg olarak hesaplandı.

4.3. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu

4.3.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Tabloya göre, tamponun pH'sı arttığında 6.0'a kadar immobilizasyon verimi ve aktivite veriminin arttığı ve 6.5'te düştüğü görülmektedir. Bu sonuçlara göre yüksek immobilizasyon verimi (% 55.36) aktivite verimi (% 83.18), pH 6.0'da elde edildi. İmmobilizasyonda genel olarak en yüksek immobilizasyon verimi ile en yüksek aktivite veriminin optimum pH'ta elde edildiği çok iyi bilinmektedir.

4.3.3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.2'e göre, tampon derişimi arttığında immobilizasyon verimi ve aktivite verimi artmaktadır. Buna göre, yüksek immobilizasyon verimi (% 55.36) ve en yüksek aktivite verimi (% 112.44) 0.100 M tampon için elde edildi. Enzim immobilizasyonunda immobilizasyon ve aktivite verimleri tuzların özelliklerinden ve derişimlerinden sıklıkla etkilenmektedir. Çünkü tuzlar enzim moleküllerinin üç boyutlu yapılarını değiştirerek aktivitenin azalmasına veya artmasına neden olabilmektedir (Smalla ve ark. 1988).

Tablo 4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

| İmmobilizasyon Tamponu pH'sı | İmmobilizasyon Verimi*(%) | Aktivite Verimi**(%) |
|------------------------------|---------------------------|----------------------|
| 4.5 | 27.36 ± 0.02 | 71.73 ± 0.02 |
| 5.0 | 30.62 ± 0.04 | 68.18 ± 0.04 |
| 5.5 | 33.17 ± 0.03 | 74.03 ± 0.02 |
| 6.0 | 38.73 ± 0.04 | 83.18 ± 0.02 |
| 6.5 | 35.73 ± 0.05 | 75.86 ± 0.05 |

*İmmobilizasyon, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50'şer µL NPX çözeltileri ve 10'ar mg c-MWCNT'lerin farklı pH'lardaki 5 mL sodyum fosfat tamponları (25 mM) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

**Aktiviteler, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50 µL serbest ve 186 mg immobilize NPX'lerin 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

Tablo 4.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

| İmmobilizasyon Tamponu Derişimi (mM) | İmmobilizasyon Verimi*(%) | Aktivite Verimi**(%) |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| 25 | 38.73 ± 0.04 | 83.18 ± 0.02 |
| 50 | 43.14 ± 0.03 | 97.44 ± 0.01 |
| 75 | 47.61 ± 0.01 | 105.12 ± 0.04 |
| 100 | 55.36 ± 0.04 | 112.44 ± 0.02 |

*İmmobilizasyon, 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50'şer µL NPX çözeltileri ile 10'ar mg c-MWCNT'lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 4.0) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakikasüreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi

**Aktiviteler, 200 µL serbest ve 186 mg immobilize NPX'ların 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

4.3.4. Matriks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.3'te görüldüğü üzere, c-MWCNT'nin arttıkça immobilizasyon verimi ve aktivite veriminin arttığı görülmektedir. Matriks miktarının artması, bağlanan enzim miktarını artırdığı için immobilizasyon ve aktivite verimi genellikle arttığı çok iyi bilinmektedir. Bu sonuçlara göre en yüksek immobilizasyon verimi (% 100) ve en yüksek aktivite verimi (% 160.35) 40 mg c-MWCNT için elde edildi. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu ile % 100 immobilizasyon verimi ve % 160.35 aktivite verimi elde edildi. Bu sonuçlar, literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında bugüne kadar elde edilen en iyi sonuçlar olduğu görülmektedir.

4.3.5. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Bu aşamaya kadar 30 dakika süreyle uygulanan immobilizasyonun %100 immobilizasyon verimi ve oldukça yüksek aktivite verimi (% 160.35) ile sonuçlanması sebebiyle immobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi incelenmedi.

4.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

4.4.1. Optimum pH tayini

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi NPX'in optimum pH aralığı (5.5-6.0), Liu ve ark. (1997)'nin çalışmasında bulunan değerle (5.5) ve Liu ve ark. (2008)'nin bulduğu değerle (6.0) uyumlu olup immobilizasyondan sonra değişmemiştir. Ayrıca immobilizasyon NPX'in denenen tüm pH aralığında aktivitesini yükseltmiştir.

4.4.2. Optimum sıcaklık tayini

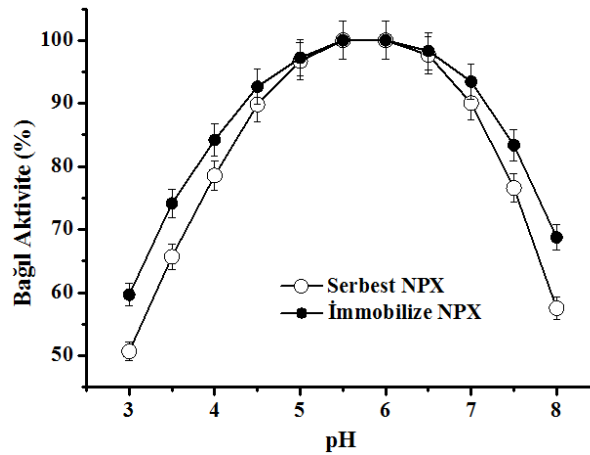
Şekil 4.2'e göre NPX'in optimum sıcaklığı 55-60 °C olup immobilizasyondan etkilenmemiştir. Bu değer Moloney ve ark. (1997)'nin çalışmasında bulunan değerden (40 °C) farklı fakat, Liu ve ark. (2008)'nin bulduğu değerle (59 °C) uyumludur. Ayrıca

Tablo 4.3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

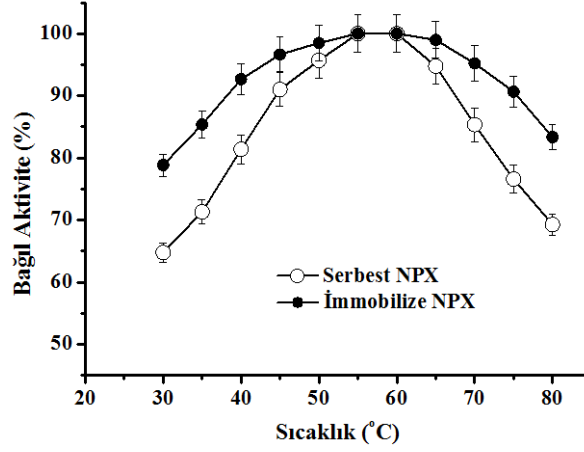
| c-MWCNT (mg) | İmmobilizasyon Verimi*(%) | Aktivite Verimi**(%) |
|-----------------|------------------------------|-------------------------|
| 10 | 55.36 ± 0.04 | 112.44 ± 0.02 |
| 20 | 100.00 ± 0.03 | 134.38 ± 0.03 |
| 30 | 100.00 ± 0.01 | 144.26 ± 0.04 |
| 40 | 100.00 ± 0.02 | 160.35 ± 0.01 |

*İmmobilizasyon, 200 uL NPX'lar ile farklı miktardaki c-MWCNT'lerin, 5 mL 0.250 M'lık sodyum fosfat tamponları (pH 4.0) içinde bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakikasüreye yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

**Aktiviteler, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50 µL serbest ve 186 mg immobilize NPX'ların 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 55 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4.1. Serbest ve immobilize NPX'in aktivitesine pH'nın etkisi



Şekil 4.2. Serbest ve immobilize NPX'in aktivitesine sıcaklığın etkisi

immobilize NPX'in, serbest NPX ile karşılaştırıldığında daha yüksek sıcaklıklarda daha yüksek bağlı aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. İmmobilizasyon enzimlerin ısı kararlılığını artırdığı için aktivitenin serbest enzime göre daha fazla olması beklenen bir sonuçtur.

4.4.3. pH kararlılığının tayini

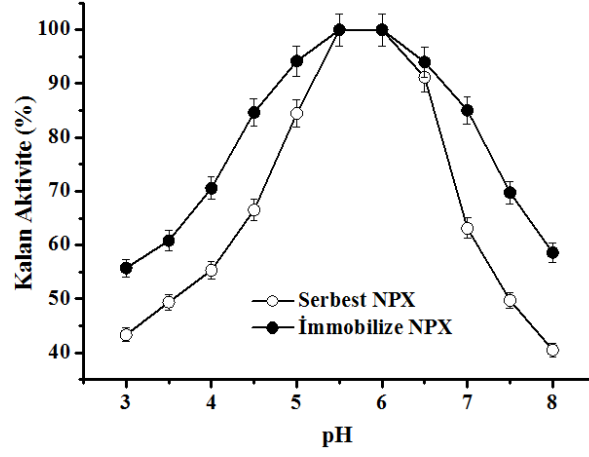
Şekil 4.3'e göre, denenen bütün pH değerlerinde immobilize NPX'in serbest NPX'ten daha kararlı olduğu görülmektedir. Şekilde ayrıca serbest ve immobilize NPX'in en kararlı pH aralığının 5.5-6.0 olduğu görülmektedir. İmmobilizasyonun enzimin pH kararlılığını artırdığı çok iyi bilinmektedir.

4.4.4. Isıl kararlılık tayini

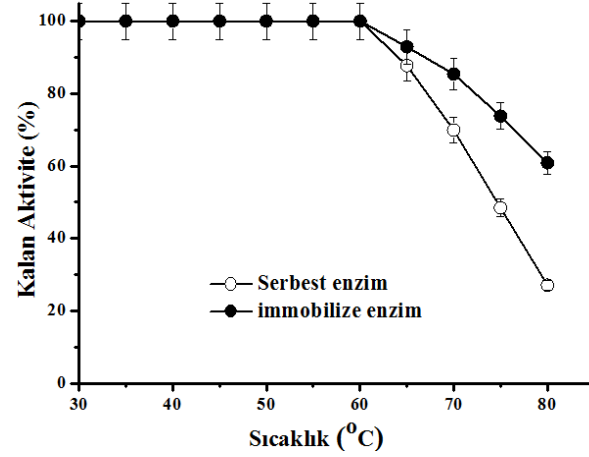
Şekil 4.4, serbest ve immobilize NPX'in kararlılığına sıcaklığın etkisini göstermektedir. İmmobilize enzim daha yüksek sıcaklıklarda serbest enzimden daha kararlıdır. 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu görülmektedir. İmmobilizasyonun, enzimlerin ısı kararlılığını da artırdığı çok iyi bilinmektedir.

4.4.5. Kinetik sabitlerinin tayini

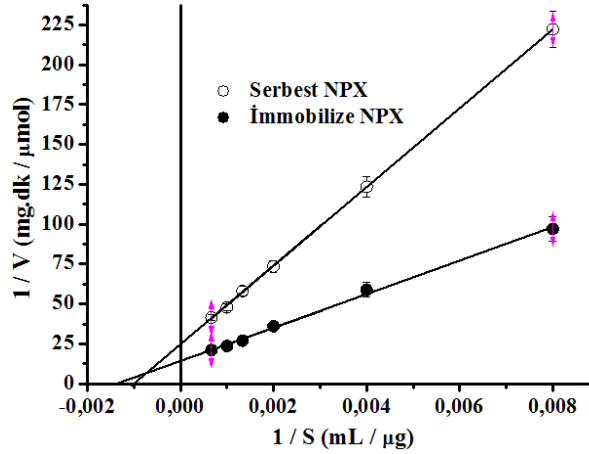
Serbest ve immobilize NPX için kinetik sabitler Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlendi (Şekil 4.5). İmmobilizasyon NPX'in K_m sabitinin değerini 1019.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 'den 704.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 'ye düşürürken, V_{max} değerini 0.0430 $\mu\text{mol} / \text{mg.dk}$ 'dan 0.0690 $\mu\text{mol}/\text{mg.dk}$ 'ya yükseltmiştir. K_m değeri, bir enzimin substrata olan ilgisini göstermektedir.



Şekil 4.3. Serbest ve İmmobilize NPX'in kararlılığına pH'nın etkisi



Şekil 4.4. Serbest ve İmmobilize NPX'in kararlılığına sıcaklığın etkisi



Şekil 4.5. Serbest ve immobilize NPX'in Lineweaver-Burk grafiği

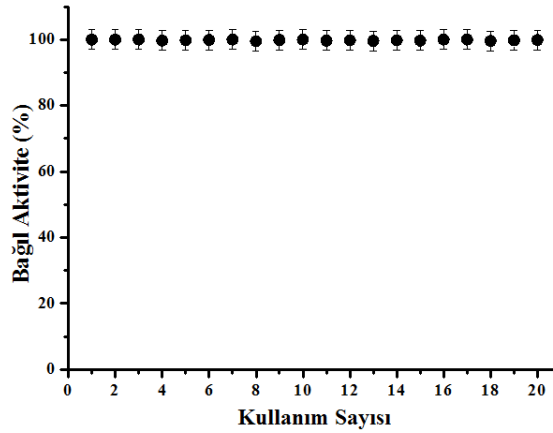
K_m küçüldükçe enzimin substrata olan ilgisi artar. İmmobilize NPX'in K_m değerinin serbest enziminkinden küçük, V_{max} değerinin ise büyük olması, immobilize enzimin serbest enzimden daha yüksek aktiviteye sahip olması ile birbirini desteklemektedir.

4.4.6. İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı

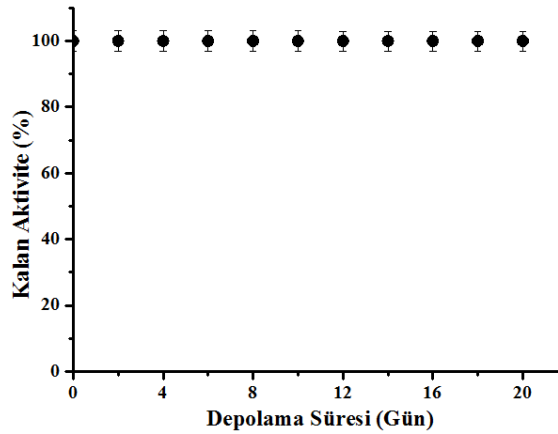
Şekil 4.6'ya göre immobilize enzim optimum koşullarda tekrarlanan yirmi kullanım süresince aktivitesini kaybetmediğinden immobilize NPX'in yüksek bir kullanım kararlılığına sahip olduğu görüldü. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalardan daha yüksektir. Liu ve ark. (1997)'nin elde ettiği immobilize NPX'in başlangıç aktivitesi dördüncü kullanımda % 2 azalırken, Liu ve ark. (2008)'nin elde ettiği immobilize NPX'in başlangıç aktivitesi sekizinci kullanımda % 40 azalmıştır.

4.4.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, immobilize enzim optimum depolama koşullarında yirmi gün boyunca aktivitesini kaybetmediğinden immobilize NPX'in yüksek bir depolama kararlılığına sahip olduğu gözlemlendi. İmmobilize enzimlerin teknolojik yararlarının değerlendirilmesinde en önemli parametrelerden biri de depolama sırasında aktivitesinin ne kadar koruyabildiğidir. CNT ile yapılan immobilizasyon çalışmalarında depolama kararlılığı genel olarak yüksek çıkmıştır (Boncel ve ark., 2016). Bu tez çalışmamızda elde edilen immobilize NPX'in depolama kararlılığı literatürde yer alan iki çalışmaya (Liu ve ark., 1997; Liu ve ark., 2008) göre daha iyi olduğu söylenebilir. Çünkü onlar depolama kararlılığını tayin etmemişlerdir.



Şekil 4.6. Serbest ve immobilize NPX'in kullanım kararlılığı



Şekil 4.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı

4.5. İmmobilize NPX Kullanılarak Ksilandan Ksilooligosakkarit Üretimi

4.5.1. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi

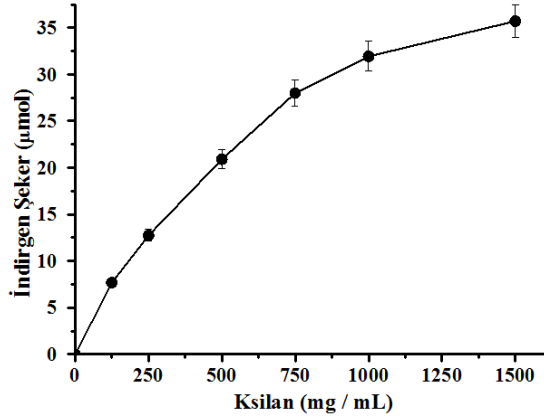
Şekil 4.8'e göre, ksilan derişimi ile oluşan XOS derişimi de artmaktadır. En yüksek verim 1500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ olduğundan bir sonraki aşamada ksilan derişimi 1500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ olarak kullanılmıştır.

4.5.2. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi

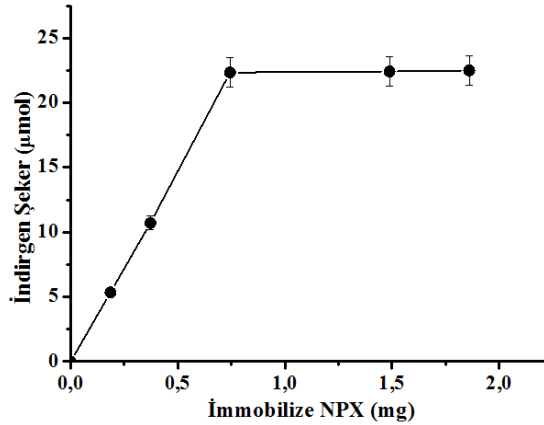
Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, oluşan XOS derişimi immobilize NPX miktarı ile 0.744 mg'a kadar doğrusal olarak artarak sabitlendiğinden bir sonraki aşamada optimum immobilize NPX miktarı 0.744 mg olarak kullanıldı.

4.5.3. Ksilan hidroliz süresinin XOS verimine etkisi

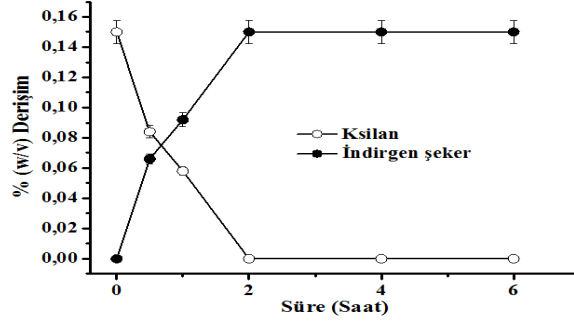
Reaksiyon süresinin XOS üretimine etkisi Şekil 4.10'da verilmiştir. Verilere göre 2 saat sonunda 10 mL % 0.15'lik ksilan çözeltisindeki ksilan tamamen XOS'a dönüşmüştür. Dolayısıyla c-MWCNT-NPX, endüstriyel XOS üretiminde en az 20 kez kullanılabileceğinden ürün maliyetini önemli oranda düşürecektir.



Şekil 4.8. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi



Şekil 4.9. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi



Şekil 4.10. Ksılan hidroliz süresinin XOS verimine etkisi

5. SONUÇLAR

NPX'in immobilizasyon koşulları optimize edilerek literatürdeki sonuçlardan daha yüksek immobilizasyon verimi (% 100) ve aktivite verimi (% 160.35) elde edildi. İmmobilize enzim peş peşe tekrarlanan 20 kullanım boyunca ve buzdolabında saklandığında +4 °C'de depolandığında 20 gün süresince aktivitesini korudu. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen immobilize NPX, prebiyotik olan endüstriyel XOS üretiminde aktivitesinde herhangi bir azalma olmadan kullanılabilir olduğundan ürün maliyetini önemli oranda düşürecektir.

TEŞEKKÜRLER

Yazarlar, bu çalışmayı 2018-SİÜFEB-019 nolu proje ile destekleyen Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürü borç bilirlir.

6. KAYNAKLAR

- Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., Yilmaz, L.(2007). Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14), 5544–5551.
- Akpinar, O., Erdogan, K., Bostanci, S.(2009). Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials, *Carbohydrate Research*, 344 (5), 660–666.
- Azevedo, R.A.M.(2014). Immobilization of peroxidase on functionalized carbon nanotubes for synthesis of biocatalysts with high performance, Master's Thesis. *Porto University*, 1-123.
- Balakrishnan, H., Srinivasan, M.C., Rele, M.V.(1997). Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 18,599-601.
- Bastawde, K.B.(1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8:,353-368.
- Beg, Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S.(2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56,326-338.
- Blandino, A., Macias M., Cantero, D.(2001). Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules, *Process Biochemistry*, 36, 601-606.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D.(2000). Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules, *Enzyme and Microbial Technology*; 27, 319-324
- Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brienza, M., Carvalho, W., Milagres, A.M.F.(2010). Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 (4), 1195–1205.
- Burlacu, A., Cornea, C.P., Israel-Roming, F.(2016). Microbial xylanase: A Review, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 20, 335-342.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K.(2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology, *3 Biotech.* 6, 150-164.
- Chui, W.K., Wan, L.S.C.(1997). Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 14(1), 51-61.
- de Menezes, C.R., Silva, I.S., Pavarina, E.C., Guimaro Dias, E.F., Guimaro Dias, F., Grossman, M.J., and Durrant, L.R. (2009) Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by the white-rot fungi *Pleurotus*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63 (6), 673–678.
- Dhiman, S.S., Sharma, J., Battan, B.(2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review, *BioResources*, 3(4), 1377-1402.
- Doty, N.C.(2012). Value-Added Opportunities and Alternative Uses for Wheat and Barley. *The Agricultural Utilization Research Institute*. Minnesota, 7-33.
- Drevon, G.F.(2002). Enzyme immobilization into polymers and coatings, Ph.D Thesis. *University of Pittsburgh*, Pittsburgh, 1-245.
- Feng, W., Ji, P.(2011). Enzymes immobilized on carbon nanotubes, *Biotechnology Advances*. 29, 889–895.
- Garlet, T. B., Weber, C.T., Klaic, R., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Mazutti, M.A., Kuhn, R.C.(2014). Carbon Nanotubes as Supports for Inulinase Immobilization, *Molecules*, 19, 14615-14624.
- Jamie, A., Alshami, A.S., Maliabari, Z.O., Ateih, M.A., Al Hamouz, O.C.S.(2016). Immobilization and Enhanced Catalytic Activity of Lipase on Modified MWCNT for Oily Wastewater Treatment, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(5), 1-9.
- Jiang, K., Schadler, L.S., Siegel, R.W., Zhang, X., Zhang, H., Terrones, M.(2004). Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 37-39.
- Jung, S.K., Chae, Y.R., Yoon, J.M., Cho, B.W., Ryu, K., G.(2005). Immobilization of glucose oxidase on multi-wall carbon nanotubes for biofuel cell applications, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 234–238.
- Klibanov A.M.(1983). Immobilized enzymes and cells as practical catalysts, *Science*, 219, 722-727.
- Liu, H.J., Selinger, L.B., Cheng, K.J., Beauchemin, K.A., Moloney, M.M.(1997). Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Molecular Breeding*, 3, 463-470.

- Liu, J.R., Hung Y.J., Peng C.C., Tzen, J.T.C., Chen, M.J.(2008). Immobilization of Neocallimastix patriciarum xylanase on artificial oil bodies and statistical optimization of enzyme activity, *Bioresource Technology*, 99 (18), 8662–8666.
- Mazutti, M.A., Weber, C.T., Klaic, R., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Kuhn, R.C.(2014). Carbon Nanotubes as Supports for Inulinase Immobilization, *Molecules*, 19(9), 14615-14624.
- Miller, G.L.(1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Motta F.L., Andrade C.C.P., Santana M.H.A.(2013). A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: Chandel A.K., da Silva S.S. (Eds) Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization, *InTech*, Croatia, 251-266.
- Parajo, J.C., Garrote, G., Cruz, J.M., Dominguez, H.(2004). Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (3–4), 115–120.
- Pavlidis, I., V., Tsoufis, T., Enotiadis, A., Gournis, D., Stamatis, H.(2010). Functionalized multi-wall carbon nanotubes for lipase immobilization. *Advanced Biomaterials*, 12(5), 179-183.
- Prlainovic, N.Z., Bezbradica, D.I., Knezevic-Jugovic, Z.D., Stevanovic, S.I., Ivic, M.L.A., Uskokovic, P.S., Mijin, D.Z.(2013). Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19, 279–285.
- Qing, Q., Li, H., Kumar, R., Wyman, C., E.(2013). Xylooligosaccharides production, quantification and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. In: Wyman.C.E. (Ed). *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*, First Edition., John Wiley & Sons, Ltd., Palo Alto, 391-415.
- Rastian, Z., Khodadadadi, A.A., Vahabzade, F., Mortazavi, Y.(2013). Functionalization of Multi -Walled Carbon Nanotubes for Lipase Immobilization. *The Journal of Macro Trends in Technology and Innovation*, 1(1), 65-71.
- Rastian, Z., Khodadadadi, A.A., Vahabzade, F., Bortolini, C., Dong, M., Mortazavi, Y., Mogharei, A., Naseh, M.V., Guo, Z.(2014). Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 16–26.
- Shrivastava, S., Lata, S., Shukla, P.(2012). An insight on recent advances on immobilization methods for industrial enzymes and its relevance to xylanases. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 6, 57-61.
- Soo-Keun, J., Chae, Y.R., Yoon, J.M., Cho, B.W., Ryu, K.G.(2005). Immobilization of Glucose Oxidase on Multi-Wall Carbon Nanotubes for Biofuel Cell Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 234–238.
- Subramaniyan, S., Prema, P.(2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33-64.
- Sunna, A., Antranikian, G.(1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 39-67.
- Teng, C., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q., Fan, Z., Shi, B.(2010). Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. *Bioresource Technology*, 101 (19), 7679–7682.
- T.M.O.(2016). Yılı Hububat Raporu, Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Ankara. 20-29.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I.(1966). Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water insoluble aminoacylase, *Enzymologia*, 31(4), 214–224.
- Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H., Parajo, J.C. (2000). Xylooligosaccharides: manufacture and applications, *Trends in Food Science & Technology*, 11 (11), 387–393.
- Wang, Q., Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J.(2011). Improved stability of the carbon nanotubes-enzyme bioconjugates by biomimetic silicification, *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 11-16.
- Weiser, D.(2015). Nanostructured systems for enzyme immobilization, Doctoral Dissertation, *Budapest University of Technology and Economics, Faculty of Chemical and Bioengineering, Geroge Oláh Doctoral School*, Budapest, 3.
- Zniszczoł, A., Herman, A.P., Szymanska, K., Mrowiec-Białoń, J., Walczak, K.Z., Jarzębski, A., Boncel, S.(2016). Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- and hydroxy-multi-wall carbon

nanotubes in the enantioselectivesynthesis of Solketal, *Enzyme and Microbial Technology*, 87-88, 61–69.

BÖLÜM 7

BÖBREĞİN YAPISI VE FİZYOLOJİSİ

Arş. Gör. Nigar ABBAK

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051754>

1. BÖBREK YAPISI VE FİZYOLOJİSİ

Böbrekler çok sayıda hayati öneme sahip görevi yerine getirmektedir. Böbreklerin fizyolojik fonksiyonları üç grupta toplanabilir. Bunlar kısaca; idrar oluşumu, homeostatik denge ve endokrin işlevleri başlığı altında toplanmaktadır (Agar,2021). Bu alt başlıklara yakından bakacak olursak;

Tablo 1: Böbreklerin fizyolojik fonksiyonları(Agar,2021;Hall ve Hall.,2020).

| |
|---|
| Homeostatik Dengedeki İşlevi |
| Vücüt sıvı ozmolalitesini ve arteryal basıncın düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu görevi su-tuz tutulumunu veya atılımını düzenleyerek yapmaktadır |
| Elektrolit dengesinin düzenlenmesi ve devamlılığını sağlamaktadır. Potasyum, sodyum ve kalsiyum gibi kritik inorganik iyonların plazma konsantrasyonlarını düzenlemektedir. |
| Kan pH'sının düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu görevi hidrojen H ⁺ ve bikarbonat HCO ₃ ⁻ seviyelerini düzenleyerek yapmaktadır. |
| İdrar Oluşum İşlevi |
| Vücuda alınan veya vücutta sentezlenen yararlı maddeleri tutarken, yabancı maddeleri veya metabolizma sonucu oluşan atık maddelerini vücuttan uzaklaştırır. |
| Plazmayı filtre ederek yararlı maddeleri kana geri gönderirken; istenmeyen atık maddeleri filtrattan idrar şeklinde uzaklaştırır. |
| Endokrin İşlevi |
| Kan hücreleri yapımında öncü maddelerin salınımında görev almaktadır. Kemik iliğinden eritrosit yapımını tetikleyen eritropoietini üretmektedir. |
| Böbrekler D ₃ vitaminine OH ⁻ grubu ekleyerek aktif vitamin D ₃ 'u "kalsitriyol" yaparak kalsiyum absorpsiyonunda rol oynamaktadırlar. |
| Böbrekler renin salgılayarak kan basıncının hızlı kontrolünde katkı sağlamaktadır. |
| Diğer İşlevleri |
| Glukoz metabolizmasında görev almaktadır. Uzun süreli açlıkta amino asitlerden veya diğer öncüllerden glukoneogenez ile glukoz sentezlemektedir. |

1.1.Böbrekler ve Üriner Yolların Genel Organizasyonu

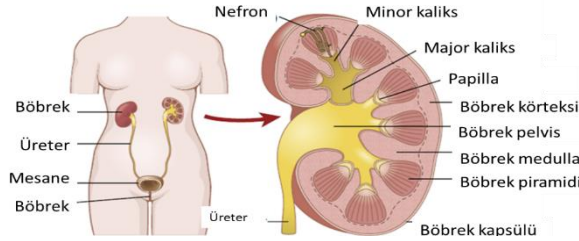
Böbrekler, karın boşluğunun arka duvarında, bulunur. Boşaltım sistemi temel organıdır. Her biri yaklaşık 150 gram ağırlığında ortalama olarak yumruk büyüklüğündedir. Her bir böbreğin üzerinde endokrin sistemde görevli böbrek üstü bezi bulunmaktadır. Torakal 12, lomber 3 vertebralar arasında üst uçları kaburgalarımızın alt kısmına deşmektedir (Vander ve ark.,2019).

1.2.Böbreğin Ana Bölümleri

Böbreklerin her ikisinde de *hilus* adı verilen bir yarık bulunmaktadır. *Hilus*dan böbrek arteri, veni, lenfatikler, sinirler ve üreter yapıları geçmektedir. *Renal Arter*, böbreklere gelen kanı taşır ve özel filtrasyon mekanizmasıyla süzülen kan *renal ven* ile tekrar dolaşım sistemine taşınır. *Üreter* ise oluşan idrarı mesaneye kadar taşımaktadır. Böbrekler, en dışta renal kapsül ile böbrek bütünlüğünü koruyan sert fibröz bir kapsül ile sarıdır. Böbreklerden dikey kesit alındığında böbreğin ana bölümlerini çıplak gözle ayırt edebiliriz. Böbreğin dış kısmı koyu kahve renkli korteks, soluk renkli iç kısım ise medulla olarak isimlendirilmektedir (Agar, 2021; Köylü, 2020). Renal korteks, granüler yapıda görünmekte ve iç

tarafındaki renal medullanın etrafını bir dış kabuk gibi sarmaktadır. Renal medulla, piramit şeklinde renal pramitlerden oluşmaktadır. Renal piramitler, tabanı kortekse dayanan tepesi medullaya inen birçok nefrondan filtratı olarak üretere yönlendiren piramit şeklinde yapılardır. Piramitlerde oluşan idrar kalikslere açılmaktadır. Kaliksler de birleşerek pelvise açılmaktadır. Pelvisin devamı olan üreter yapısı pelvisi mesaneye bağlayan tüp şeklinde yapılardır. Böylece idrar üreterlerden mesaneye geçer. Kaliks, pelvis ve üreter yapılarının duvarları kasılabilir elemanlar içermektedir(Agar,2021;Hall ve Hall.,2020). Nefrondan filtrat oluşuktan sonra idrar oluşumu ve atılımı boyunca böbrek içinden geçtiği yapılar aşağıda özetlenmiştir.

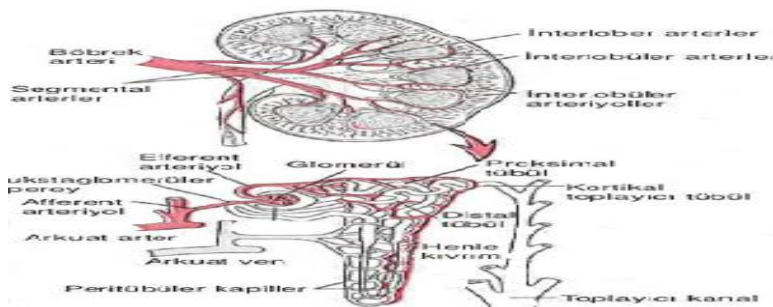
Nefron → piramitler → minör kaliks → majör kaliks → pelvis → üreter → mesane → üretra → çıkış



Şekil 1: Böbrek ve üriner sistemin genel organizasyonu (Hall ve Hall,2020).

1.3.Böbrek Kan Akımı

Böbreklerde özel bir dolaşım ve özel bir tübüler sistem vardır. Böbrekler abdominal aortanın bir dalı olan renal arter sayesinde kalp debisinin ~%22'sini almaktadır bu kan akımı yaklaşık olarak 1100 ml/dk'dır (Hall & Hall, 2020). Vücuttan atık maddeleri uzaklaştırma görevi olduğu için çok fazla kan gelmektedir. Böbreklerde kan akımının fazla olması sebebi yoğun enerji ihtiyacı olması yanı sıra başta glomerüler filtrasyon olmak üzere diğer görevlerini düzgün yapabilmesi için gerekmektedir(Agar,2021; Hall ve Hall.,2020). Böbrekler sistemik dolaşımdan kanı renal arter ile aldıktan sonra hilumdan içeri girerek dallanır. Sırasıyla *segmental arter*, *lober arter*, *interlober arter*, *arkuat arter*, *interlobüler* “*radial arterler* de denir” arterlere ve afferent arteriyollerini oluşturmaktadır. *Afferent arteriyoller* glomerüllerdeki *glomerüler kapilleri* oluşturur. *Afferent arteriyol* nefron yapısının içine girerek idrar yapımının başladığı *glomerüler kapilleri* oluşturması önemlidir (Hall ve Hall.,2020). Her bir *glomerül kapiller efferent arteriyolu* oluşturmak için bir araya gelmektedirler. *Efferent arteriyol* devam ederek, böbrek tübüler yapısını çevreleyen ve bu yapıya paralel ikinci bir kapiller ağ olan *peritübüler kapilleri* oluşturmaktadır. *Peritübüler* kapiller tübüller yapıları ağ gibi sararak en son *inferior vena cavaya* açılmaktadır (Hall ve Hall.,2020). Böbrek kan dolaşımı, glomerüler kapiller ve tübül çevresi “*peritübüler*” kapillerden oluşan iki ayrı kapiller yataktan oluşmaktadır. Glomerüler kapiller hidrostatik basıncın düzenlenmesine yardımcı efferent arteriyol ile devam edip filtratın oluşumunda katkı sağlayan peritübüller kapiller ile devam etmektedir.



Şekil 2: Böbrek ana damarları ve nefrondaki mikrodolaşımın şematik gösterimi (Hall ve Hall.,2020).

2.Nefron Yapısı, Dolaşımı ve Fizyolojik Görevleri

Böbreklerde idrar oluşturma yeteneğine sahip en küçük birime nefron denmektedir. İnsanda her bir böbrekte 1 milyon civarı veya daha fazla nefron bulunmaktadır(Hall ve Hall.,2020). Böbrekteki patolojik hasar dışında yaşlanma ile beraber nefron sayısı da zaman içinde ilerleyerek azalmaktadır kalan nefronlar elektrolit, su ve metabolit düzenlenmesini sağlamak için adaptif değişiklikler gerçekleştirmektedir (Hall ve Hall.,2020). Yaşlanmayla beraber böbreklerde nefron sayısının zamanlar azalması gibi yapısal değişikliklere ek olarak fizyolojik değişikliklerle de izler(Musso ve Oreopoulos.,2011). Yaşlanmayla GFR azalır, damarlanma bozulur, azalan sodyum emilimi ve potasyum salınımı da bunlardan bazılarıdır(Baba ve ark.,2015).

Her bir nefronun, gelen plazmayı süzen glomerüler kapiller kısmı ve tübüler sistem denilen uzun yapısal bir kısım vardır (Agar,2021).

1.Glomerüler yapı: Kandan büyük miktarda sıvının filtre olduğu kısımdır. Bu kısım glomerüler kapiller ağ ve Bowman kapsülünden oluşmaktadır.

2.Tübüler Yapı: Filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü uzun tübüler yapıdır. Tübüler yapı etrafı peritübüller kapiller tarafından sarılmaktadır.

Böbreklerdeki nefronlar iki kapiller ağın olduğu özel bir dolaşım sistemine sahiptir. Glomerüler kapiller ve efferent arteriyolün devamı olan peritübüller kapiller bulunmaktadır.

Nefronlar idrar oluşumunu, üç temel fonksiyon ile yaparlar (Köylü, 2020).

1.Glomerüler filtrasyon (süzülme)

2.Tübüler geri emilim

3.Tübüler sekresyon (salgılanma)

2.1.Glomerüler filtrasyon

Kan plazmasının böbrek glomerüler kapillerden Bowman boşluğuna filtrasyonu diğer kapiller ağlarda gerçekleşen filtrasyonla benzerlik göstermektedir (Agar,2021). Ancak glomerüler kapillere gelen kan yüksek bir hidrostatik basınç ≈ 60 mm Hg ile gelmektedir (Hall ve Hall.,2020). Bu basınç diğer çoğu kapillerin basıncından yüksek olması glomerüler kapillerlerden Bowman aralığına sıvı akışını desteklemektedir. Glomerül kapillerinden Bowman aralığına filtre olan plazma ultrafiltrat adını almaktadır. Ultrafiltrat oluşumu glomerüler kapillerin her iki tarafındaki kolloid ve hidrostatik basınca bağlı olarak gerçekleşmektedir(Agar,2021;Köylü,2020).Diğer kapillerde de olduğu gibi kapiller damarlardaki filtrasyon Starling güçleri tarafından belirlenmektedir. Bunlar; kapiller damar duvarı boyunca etkisini gösteren Bowman boşluğuna filtrasyonu destekleyen glomerüler kılcal damar hidrostatik basınç ve Bowman boşluğu onkotik basıncı (bu basınç ultrafiltrat protein içermediğinden sıfırdır). Bowman boşluğu hidrostatik basıncı ve protein konsantrasyonu farkı nedeniyle oluşan glomerüler kılcal damar onkotik basıncı Bowman boşluğunda oluşan filtrata karşı koymaktadır(Vander ve ark.,2019;Wilson ve Kaplan,2018).

Tablo 2: Glomerüler kapiller filtrasyonda etkili güçler ve filtrasyonu basıncı (Hall ve Hall.,2020)

| Filtrasyonu kolaylaştıran kuvvetler (mm Hg) | |
|--|----|
| Glomerüler hidrostatik basınç (P_G) | 60 |
| Bowman kapsülündeki kolloid osmotik basıncı(Π_B) | 0 |
| Filtrasyona engel olan kuvvetler (mm Hg) | |
| Bowman kapsülündeki hidrostatik basıncı(P_B) | 18 |

| | |
|--|--------------------|
| Glomerüler kapillerdeki kolloid osmotik basıncı(Π_0) | 32 |
| Net filtrasyon basıncı = | 60 - 18 - 32 = +10 |
| mm Hg | |

Glomerüler filtrasyon bariyeri boyunca ultrafiltrata geçecek maddeler iki önemli etkene bağlıdır. Bunlar molekül büyüklüğü ve elektrik yüküdür (Hall ve Hall.,2020) Glomerüler ultrafiltrasyonda; proteinler (serum albümini, globülin gibi), yüksek molekül ağırlıklı birleşikler, hücre ve kanın şekilli elemanları (eritrosit, lökosit, trombosit) yoktur (Hall ve Hall.,2020;Köylü,2020). Geçemeyen moleküller hariç ultrafiltrat, plazma sıvısındaki çözünen maddelerin konsantrasyonu ile aynı olacak şekilde oluşur(Wilson ve Kaplan,2018).

Tablo 3: Moleküler ağırlıklarına göre hücre zarından filtre edilebilirlikleri (Hall & Hall, 2020)

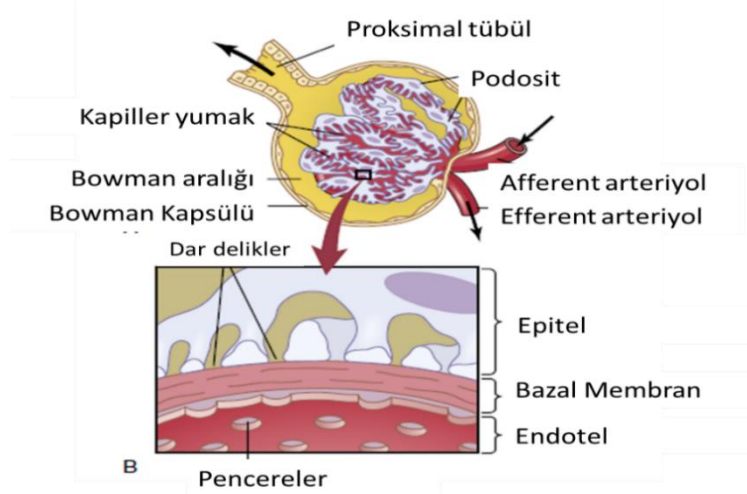
| Substance | Molecular Weight | Filterability |
|-----------|------------------|---------------|
| Water | 18 | 1.0 |
| Sodium | 23 | 1.0 |
| Glucose | 180 | 1.0 |
| Inulin | 5500 | 1.0 |
| Myoglobin | 17,000 | 0.75 |
| Albumin | 69,000 | 0.005 |

Glomerüler kapillerde, Bowman kapsülüne doğru filtratın oluşumunu etkileyen filtrasyon bariyeri bulunmaktadır. Ultrafiltrat oluşumu için özelleşmiş filtrasyon membranında üç katman bulunmaktadır. Özelleşmiş bu üç katman sayesinde normal kapillerden daha fazla su ve madde filtre edilmektedir(Agar,2021;Vander ve ark.,2019). Bu 3 katmana yakından bakarsak;

1-Glomerüler kapillerin iç yüzeyi pencereci (*fenestrel*) endotel hücreleri ile döşenmiştir. Endotel hücrelerinin de yüzeyinde negatif yüklü olan glikokaliks ile sarılıdır(Agar,2021).

2-Glomerüler kapillerlerdeki bazal lamina negatif yükü olup (-) yüklü madde geçişi zorlaştırır. Bazal membran proteoglikanları içerdiğinden negatif yüklerinin sebep olduğu elektrostatik itme nedeni ile özellikle büyük ve negatif yüklü olan çözünen maddelerin geçirgenliğini kısıtlar. Moleküllerin boyutlarına, şekillerine ve yüklerine bağlı geçiş kontrollü olarak sağlanır ve su akışının kısıtlandığı ana bölgedir (Hall ve Hall.,2020; Vander ve ark.,2019). 3-Glomerüler kapillerleri dıştan saran özelleşmiş tek sıra epitel hücrelerinde de podositler (ayak şeklinde çıkıntılar olup filtrasyon yarıkları bulunmaktadır. Negatif yüklü glikoproteinler bulunmaktadır ayrıca filtrasyon yarıklarındaki küçük boyutlarından dolayı da filtrasyonda önemli bir bariyer görevi görmektedir. Bu ayaklı çıkıntılar, *por* denen yarıklarla ile birbirinden ayrılmıştır, bu yarıklar filtrasyonda oldukça önemli bir rol oynar (Agar,2021;Vander ve ark.,2019).

Kılcal damar endoteli, bazal membran ve podositler birlikte filtrasyonu bariyerini oluşturmaktadır. Filtrasyonu bariyeri özellikle plazmadaki proteinlerin filtrata geçmemesi için üçlü negatif bariyer oluşturmaktadır (Agar,2021).



Şekil 3: A. Glomerüler kapiller yapı B. Filtrasyon bariyerini oluşturan yapıların şematik gösterimi (Hall ve Hall.,2020)

Maddenin filtrata çıkabilmesini maddenin elektriksel yükü ve moleküler büyüklüğü belirlemektedir. Negatif yüklü büyük moleküller aynı büyüklükteki pozitif yüklü moleküllere oranla daha zor filtre olmaktadır(Hall ve Hall.,2020). Tablo 3'te belirtildiği gibi geçirgenlikleri 1,0 olan maddeler (sodyum, glikoz gibi) serbestçe filtrasyona uğrarken değer 0'a yaklaştıkça maddenin geçişi zorlaşmaktadır(Hall ve Hall.,2020;Wilson ve Kaplan.,2018). Membran çapı 8 nm, albümin büyüklüğü 6 nm olmasına rağmen albüminin (-) ve bazal membran proteoglikanlarının negatif yüklerinin sebep olduğu elektrostatik itme nedeni ile albüminin filtrasyonu kısıtlanmaktadır(Hall ve Hall.,2020).

2.1.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı ve İdrar Oluşumu

Glomerüler kapillerden, Bowman kapsülünün içine glomerüler filtrasyon bariyerinden birim zamanda filtre edilen sıvı hacmine glomerüler filtrasyon hızı (GFR) denmektedir(Vander ve ark.,2019;Wilson ve Kaplan.,2018). Bowman kapsülünde birim zamanda oluşan hacimdir (ml/dk veya L/gün)(Agar,2021;Vander ve ark.,2019). GFR, sadece glomerüler filtrasyon basıncının değişkenliği ile ilgili değildir. Aynı zamanda glomerüler filtrasyon bariyerinin geçirgenliği ve filtrasyon yüzey alanı da GFR'yi etkilemektedir (Agar,2021; Hall ve Hall.,2020). GFR; glomerüler net filtrasyon basıncı, filtrasyon bariyerini oluşturan yapıların geçirgenliği ve yüzey alanı değişikliklerinden doğrudan etkilenmektedir (Hall ve Hall.,2020).

GFR = Net Filtrasyon Basıncı (NFB) X Glomerüler Kapiller Filtrasyon Katsayısının (K_f)

$$\text{GFR} = K_f \times (P_G - P_B - \Pi_G + \Pi_B)$$

NFB: Kapillerdeki hidrostatik ve kolloid ozmotik basıncın toplamını vermektedir.

K_f: Glomerüler kapillerin sıvı iletkenliğini ve yüzey alanı genişliğini gösteren bir ölçümdür. K_f doğrudan ölçülemez. Böbreklerdeki K_f değeri normal kapillerden yaklaşık 400 kat daha büyük olabilir (Hall ve Hall.,2020). Bazı hastalıklarda glomerüler filtrasyon alanının azalması, glomerüler kapiller sayısının azalması veya glomerüler membran kalınlığının artması K_f'yi azaltmaktadır (Hall ve Hall.,2020). GFR yaş, cinsiyet ve vücut boyutlarına göre değişmekle beraber 70 kg ağırlığındaki bir kişide GFR; ortalama 180L/gün (125 ml/dk) olarak kabul edilmektedir (Hall ve Hall.,2020). Normal yetişkinlerde erkeklerde 90-140 ml/dk ve kadınlarda 80-125 ml/dk arasında değişmektedir(Agar,2021;Kim ve ark.,2019). Su; difüzyon ve ozmoz yasalarına göre tüpün tüm bölümlerinde çeşitli yoğunluklarda yeniden emilmektedir, böylece fizyolojik şartlar altında dakikada 125 ml glomerüler filtrattan sadece 1 ml/dakika mesaneye ulaşması gerekmektedir(Germane,2023). GFR böbrekteki tüm nefronların filtrasyonu fonksiyonun toplamı demektir bu yüzden GFR böbrek fonksiyonlarının bir göstergesi olup böbrek hastalıklarının seyri ve ciddiyeti ile ilgili bilgi verir(Köylü,2020)

3.Böbrek Kan Akımının ve Glomerüler Filtrasyonun Fizyolojik Kontrolü

Glomerüler filtrasyonun fizyolojik kontrolü vazokonstriktör ve vazodilatör kuvvetler arasındaki dengenin hassasiyetine bağlıdır. Glomerüler kapiller damarlardaki kan basıncı, 60 mmHg civarındadır ve bu basınç birçok kapillerin hidrostatik basıncından yüksektir. Bu yüksek glomerüler kapillerdeki kan basıncı sayesinde Bowman aralığına sıvı geçişi desteklenmektedir (Kim ve ark.,2019;Vander ve ark.,2019). Sistemik arter basıncının azalmış olması hidrostatik basıncı azaltarak GFR'yi azaltır. Sistemik arter basıncının artması hidrostatik basıncı arttırarak GFR'yi arttırır. Ancak arter basıncındaki değişiklikler otoregülasyon sistemleri sayesinde afferent ve efferent arteriyol direncini değiştirerek tamponlanır (Vander ve ark.,2019). Afferent arteriyollerin daralması daima GFR'yi azaltırken; afferent arteriyoldeki direncin azalması GFR'yi arttırır(Wilson ve Kaplan,2018). Efferent arteriyol daralmasının etkisi daralmanın şiddetine bağlıdır. Efferent arteriyoldeki orta şiddetteki daralmada GFR artar, şiddetli efferent arteriyol daralmasında (dirençte 3 katından daha fazla artış) ise GFR azalmaktadır (Wilson ve Kaplan,2018). Böbreklerin direnç damarlarının başlıcaları interlobuler arter, afferent arteriyol ve efferent arteriyoldür. Bu yüzden renal vasküler direnci bu üç damar belirlemektedir. Bu damarların direnci değiştirilerek hem glomerüler kapillerin hem de peri tübüller kapillerde hidrostatik basıncı düzenlenerek GFR ve peri tübüler geri emilim değiştirilir(Agar,2021;Costanzo,2021).

GFR'yi kontrol eden mekanizmalar:

(1)sempatik sinir sistemi, (2) hormonlar, (3) otokoidler (salgılandığı böbrek hücrelerine etki eden vazoaaktif maddeler) ve (4) böbreğin otoregülasyon (justaglomerüler kompleksteki sistem) mekanizmalarıdır (Costanzo,2021).

3.1. Böbrek Dolaşımının Sempatik Sinir Sistemi ile Kontrolü

Böbreklerdeki sempatik sinir sistemi lifleri böbrek ve nefrondaki damarlarda oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. GFR ve böbrek kan akımını üzerinde, karotid sinüs baroreseptörlerinde orta derece basınç azalması sonucu orta veya hafif sempatik uyarı az etkiye sahiptir. Ancak kuvvetli basınç kaybı ile sonuçlanan beyin iskemisi, ağır kanamaya bağlı aktive olan kuvvetli sempatik aktivasyon, böbrek arteriyollerini daraltır ve böbrek kan akımı GFR'yi azaltır (Costanzo,2021;Hall ve Hall,2020).

3.1.1.Böbrek Dolaşımının Hormonal ve Otokoid Kontrolü

Bazı hormon ve otokoidler GFR ve böbrek dolaşımını etkileyebilir. Aşağıda etkileyen hormon ve GFR üzerindeki etkileri özetlenmiştir (Hall ve Hall,2020). Norepinefrin, epinefrin ve endotelin böbrek damarlarını daraltarak GFR'yi azaltır. Şiddetli kanama gibi uç koşullar hariç, norepinefrin ve epinefrin böbrek hemodinamiğine çok az etkilidir. Anjiyotensin II; kan basıncı ve GFR düştüğünde Na miktarı ve kan hacmi azaldığı zaman justaglomerüler hücrelerden salınmaktadır. Efferent arteriyolleri daraltmaktadır. Anjiyotensin II hem lokal hem de tüm sistem üzerinde de özellikle venlerde damar daraltıcı olarak işlev gören bir hormondur.Nitrik Oksit; böbrek damarlarında dilatasyon yaparak GFR'yi artırır.Prostaglandinler ve Bradikinin GFR'yi arttırma eğilimi göstermektedir.

3.1.2.GFR'nin Otoregülasyonu

Böbrek dışındaki tüm organlarda otoregülasyonun esas fonksiyonu kan basıncındaki değişikliklerde organın ihtiyacı olan oksijen ve besin maddelerinin sağlanması ve metabolit atıklarının uzaklaştırılmasıdır (Agar, 2021). Böbreklerdeki otoregülasyonun görevi ise ortalama arteriyel kan basıncındaki 70 – 75 mm Hg'ya kadar varan düşme veya 160 – 180 mmHg'ya kadar yükselmelerde GFR'de sadece yüzde birkaç oranında bir değişiklik yapılması hedeflenmektedir (Costanzo,2021;Hall ve Hall,2020).

Arter basıncı arttığında iki nedenle idrar hacmi çok az etkilenmektedir (Agar,2021):

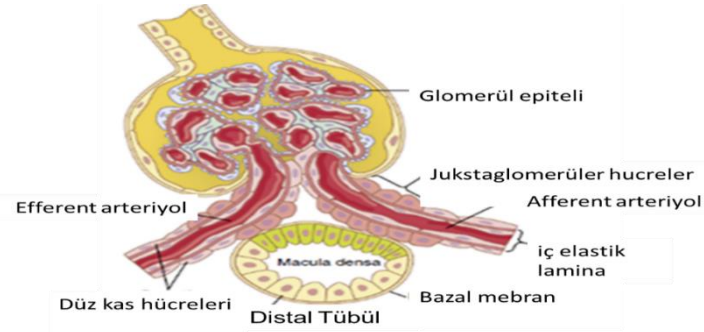
1- Böbrek otoregülasyonu ile GFR'de artış olmaz.

2- Böbrek tübüllerinde GFR arttığında tübüllerin geri emilim hızını da artmaktadır.

Bu özel kontrol mekanizmalarına rağmen arteryel kan basıncı artışı böbrek su ve sodyum atılmasını artırır. Böylece vücut sıvı hacmi kontrol edilerek arteryel basıncın yükselmesi engellenmektedir. Suyun basınca bağlı atılmasına *basınç diürezi* ve tuzun atılmasına da *basınç natriürezi* denmektedir (Agar,2021) Böbrek kan akımı ve GFR'nin otoregülasyonunda rol oynayan miyojenik kontrol ve *Jukstaglomerüler* geri bildirim mekanizması bulunmaktadır(Hall ve Hall,2020; Kim ve ark.,2019).

3.1.3.Jukstaglomerüler geri bildirim mekanizması

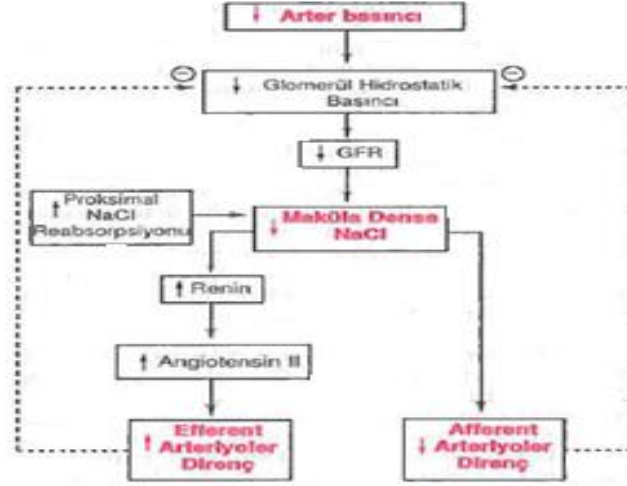
Kan basıncının uzun süreli kontrolünde böbrek – vücut sıvılarının kontrolü mekanizması önemlidir. Bu mekanizma kan hacminin kontrolü ile ilgilidir, ancak sonuçlar arter basıncını etkiler. Distal tübülün başlangıç kısmında NaCl dedektörü olarak bulunan makula densa hücreleri özelleşmiş epitel hücreler olup afferent ve efferent arteriyollerdeki jukstaglomerüler hücreler ile temas halindedir(Agar,2021; Hall ve Hall,2020).



Şekil 4: Tübulo Glomerüler Feed-Back mekanizmasında rol oynayan jukstaglomerüler aparatın yapısı (Hall ve Hall,2020).

Arter basıncı azaldığında, glomerüler hidrostatik basınç da azalacaktır. Azalmış GFR Henle kıvrımında akımı yavaşlatır. Çıkan Henle kolunda sodyum klorür iyonlarının geri emilimi artar. Bu durumda makula densa hücrelerine ulaşan NaCl miktarı azalmaktadır. Makula densa, iki etkiye sahip bir uyarıyı başlatır(Agar,2021; Hall ve Hall,2020;Wilson ve Kaplan,2018). (1)Afferent arteriyolun vazodilatasyonuna (damar genişlemesi) neden olarak glomerüle gelen kan akımı artar ve glomerüler hidrostatik basıncı artırır bu artış GFR'nin gerekli düzeyde yükselmesine yardım eder ve (2) Arter basıncı düştüğünde afferent ve efferent arteriyollerin jukstaglomerüler hücrelerinden “renin”in serbestlenmesini artırır. Reninin kendisi vazoaktif bir madde olmayıp bir enzimdir. Reninin çoğu kan dolaşımına geçer. Bir peptid olan anjiyotensin I' in serbestlenmesine neden olur. Anjiyotensin I orta derecede vazokonstriktör özelliklere olup tek başına dolaşım fonksiyonlarında anlamlı değişiklikler yapmaya yeterli değildir. Anjiyotensin I, akciğer kılcal damarlarından geçerken endotelde bulunan konverting enzim (ACE) tarafından anjiyotensin II haline gelir. Anjiyotensin II oldukça güçlü bir vazokonstriktör olup afferent arteriyol üzerine etkisi oldukça azdır. Asıl etkisi efferent arteriyol üzerindedir ve efferent arteriyolde vazokonstriksiyon yapar artan glomerüler hidrostatik basınç sayesinde GFR'yi arttırmaktadır. GFR'nin artmasıyla plazma içerisindeki üre ve kreatinin gibi maddelerin atılım miktarı artacaktır. Efferent arteriyollerin de daralmasına bağlı olarak peritübüler kapillerlerin kan akımı azalacak bu da su ve sodyumun geri emilimini arttıracaktır, bu sayede kan basıncı ve kan hacmi üzerinde etkisi vardır. Arteryel basınç değişiklikleri sırasında tübüloglomerüler feedback mekanizmasının bu iki komponenti birlikte

çalışarak arteryel basınçta 75 mmHg ile 160 mmHg arasında geniş oynamalar olsa bile GFR çok az değişir (Hall ve Hall,2020).



Şekil 5: Arteryel kan basıncının azalması esnasında glomerüler filtrasyon hızı ve glomerüler hidrostatik basıncın otoregülasyon mekanizması Hall ve Hall,2020).

3.1.4.Miyojenik Otoregülasyon

Damar düz kasının basınca duyarlı olması ile ilgili bir mekanizmadır. Arteryal basınç arttığında damar düz kas duvarını gerer, gerim ile oluşan Ca^{+2} kanalları aktive olur. Hücre içi artan Ca^{+2} konsantrasyonu kasılmaya neden olmaktadır. Arteryal kan basıncı artışı afferent arteriyolün gerilmesine neden olur damardaki düz kasta yanıt olarak kasılır ve damarlar daralır. Afferent arteriyolün direncindeki artış gelen kanın basıncı dengeleyebiliyor. Bu nedenle GFR göreceli olarak sabit kalır(Agar,2021;Hall ve Hall,2020).

4.İdrar Oluşumu sırasında Tübüler geri emilim ve Tübüler sekresyon

Glomerüler filtrasyon sonunda filtrat tübüler bölüme geçer. Bu bölüm kademeli olarak idrarın oluşturulduğu bölümdür. Bu tübüler kısımda geri emilim ve sekresyon gerçekleşmektedir. Glomerüler filtrasyon günde 180 lt/gün olduğunu düşününce günlük idrar oluşumu 1 – 1,5 lt olmasında tübüler sistemdeki geri emilimin ne kadar önemli olduğu anlaşılabilir. Bu geçişler aktif ve pasif taşınma mekanizmaları ile gerçekleşmektedir(Constanzo,2021;Vander ve ark.,2019). Glomerüler filtrat böbrek tübüllerine girdiği zaman idrar olarak atılmadan önce aşağıdaki tübüller kısımlardan sırasıyla geçmektedir.

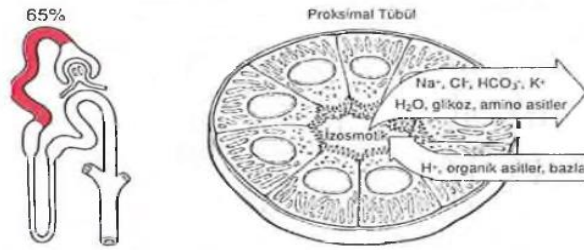
Proksimal tübül ⇒ Henle kıvrımı ⇒ Distal tübül ⇒ Kortikal toplayıcı tübül ⇒ Medüller toplayıcı tübül ⇒ Toplayıcı kanal kısımları boyunca akar (Vander ve ark.,2019).Tübüler yapıdan geçen filtrattaki maddelerin bazıları selektif olarak tübülden geri emilirken, bazıları ise tübül lümeninden çok az veya emilmeden geçer ya da geçiş sırasında tübüle salgılanması devam eder. Böbrekler, 3 temel mekanizmayla idrarı oluşturur. Bu üç işlemin toplamına bağlı idrar miktarı değişebilir(Agar,2021;Wilson ve Kaplan,2018).

İdrar oluşumu = Glomerüler Filtrasyon - Tübüler geri emilim +Tübüler salgılama

Bir maddenin, idrardaki miktarı ile plazmadaki miktarı ile değişebilir. Böbreklerden değişik maddelerin idrar atılım miktarları da farklıdır. İdrar oluşumu ile vücudun ihtiyacı olan elektrolit su dengesi ve kan basıncı düzenlenmiş olur(Agar,2021;Köylü,2020).

4.1.Proksimal Tübülde Geri emilim

Nefronun en fazla geri emilim yaptığı bölgedir. Filtre olan Na^+ , Cl^- , HCO_3^- ve K^+ 'un yaklaşık %65'ini ve glikoz ve aminoasitlerin hepsi proksimal tübülden geri alınır (Hall ve Hall,2020). Glomerulusa filtre olan Ca^{+2} 'nın %65'i proksimal tübüllerden pasif paraselüler mekanizma tarafından geri alınır (Alexander ve Dimke,2022;Alexander ve ark.,2013;Rouffignac ve ark.,1973;Sutton ve Dirks,1975). Proksimal tübüldeki bu yoğun katyon geçişinin ana nedeni sodyumun geri emilmesinin ardından gelen suyun ozmotik basınç farkı oluşturmasıdır (Alexander ve Dimke,2022).Kalsiyumun tübül lümeninden kana konsantrasyon farkı oluşmasına katkıda bulunarak pasif olarak paraselüler yoldan emilime izin verilir aynı zamanda sıkı bağlantı boyunca kalsiyumun paraselüler hareketini de yönlendirerek "solvent sürüklenmesi" görülür(Chawla ve Kimmel,2012). Proksimal tübülden organik asitler, bazlar ve hidrojen iyonları, bikarbonat geri alınırken glikoz ve aminoasitlerin tamamı bu bölümde geri alınır. Bu bölümün tübül hücreleri tek sıra epitel hücreleri olup luminel yüzeylerinde mikrovilli içerirler. Bu sebeple yüksek geri emilim kapasitesi vardır. Geri emilim proksimal tübüleri çevreleyen peritübül kapiler damarlara doğrudur. Bazoletal kısımlarında glukoz geçişi için GLUT 1 ve 2 kapıları bulunmaktadır. Luminal ve bazoletal bölümlerde akuaporinler (AQP) bulunmaktadır ve su geçişi için kullanılmaktadır(Hall ve Hall,2020;Vander ve ark.,2019). Geri emilimdeki temel mekanizma Na^+ 'nın bazoletal tarafa aktif geçiştir. Aktif geçişi Na^+ 'nın hücre içindeki düzeyini düşük tutar böylece luminal taraftan hücre içine doğru Na geçişi olmaktadır. Bu geçiş başta glikoz olmak üzere birçok maddenin geçişini kolaylaştırır. Böylece bu maddelerin hücre içi konsantrasyonları artar ve bazoletal tarafa konsantrasyon farkı dolayısıyla çıkar. Na ile H^+ iyonları karşılıklı değişim ile taşınmaktadır. Böylece nefronda ilk kapillere salgılanmaya başlayan da H^+ iyonu olmaktadır. Na^+ ve su, proksimal tübül boyunca beraber geri emildiklerinden osmolarite tübül boyunca sabit kalmaktadır(Hall ve Hall,2020;Wilson ve Kaplan,2018).



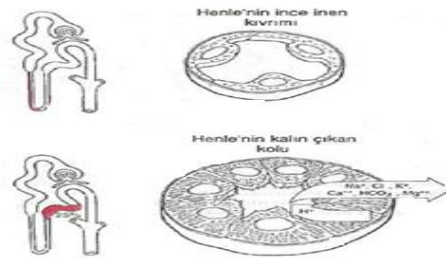
Şekil 6: Proksimal tübüldeki başlıca taşıma mekanizmaları ve hücre yapısı (Hall ve Hall,2020)

Glikoz, aminoasitler ve HCO_3^- yoğunlukları proksimal tübül boyunca giderek azalmaktadır. Aksine üre az, kreatinin hiç emilmediği için tübül boyunca su miktarı da azaldığından dolayı, bu maddelerin yoğunlukları tübülden ilerledikçe artar (Hall ve Hall,2020). GFR testleri, akut veya kronik böbrek hastalığı teşhisinde rutin klinik uygulamalardan biridir(Levey ve ark.,2022). İlk GFR değerlendirilmesinde istenenlerden biri serum kreatinin düzeyi (eGFRcr) ile albüminürinin belirlenmesi olup idrarda albümin/kreatinin oranıdır(Lakhmir ve Chawla,2012;Levey ve ark.,2022). Testlerin ucuz olması ve böbrek hastalıklarının erken teşhisinde bilgi vermesinden dolayı laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Levey ve ark.,2022). Akut böbrek hasarlı kişilerde yapılan çalışmalarda ileri yaş, diyabet varlığı ve eGFR'nin zaman içinde azalmanın ileri evre kronik böbrek hastalığının oluşmasında başlıca risk faktörleri olduğu belirtilmektedir (Amdur ve ark.,2009).

.Proksimal tübül kısmından başka GLUT'lar bulunmadığı için glikozun temel geri emiliminin sağlandığı bölgedir. Proksimal tübüllerdeki GLUT kapılarının maksimal geri emilim kapasiteleri vardır bu sınır aşıldığında glikoz oranlı olarak geri alınmaz ve nefronun diğer bölümlerine geçer. Genelde plazma glikoz düzeyi 200 – 220 mg/dl olduğunda artık glikoz kaçıışı başlar üst sınır 375 mg/dl olduğunda ve sonrasında plazma glikoz düzeyi ne kadar artarsa idrarla atılan glikoz düzeyi de o derecede artmaktadır(Agar,2021;Vander ve ark.,2019). Glomerüler bariyerin bozulduğu hastalık koşullarında, oldukça yüksek konsantrasyonlarda plazma proteinleri tübüle girebilir. Proksimal tübülün başlıca işlevi glomerüler filtrasyon bariyerinden kaçan albümini ve diğer plazma proteinlerini geri kazandırmaktır (Edwards ve ark.,2022). Son çalışmalar, bu koşullar altında PT'nin, filtrelenmiş proteinleri geri kazanmak için normal seviyenin çok üzerinde büyük bir kapasiteyle çalıştığı gösterilmiştir(Weyer ve ark.,2018).. Filtrelenen proteinlerin verimli bir şekilde geri alınmasına, PT hücrelerinde bol miktarda eksprese edilen megalin ve CUBAM (cubilin ve amniyonsuz (AMN) alt birimleri içeren) reseptörleri aracılık eder(Christensen ve ark.,2012;Eshbach ve Weisz,2017). Bu reseptörlerin yokluğunda albumin idrarda %40 seviyelerinde bir artış olduğu gösterilmiştir(Ren ve ark.,2020).

4.2.Henle Kıvrımında Su ve Madde Taşınması

Henle kulbu, medullaya kadar iner ve bir “U” şekli alarak tekrar yukarı kortekse doğru çıkmaktadır. Peritübüller kapiller, henle kıvrımlı tübülü sarar ve derinlere ilerleyerek *vasa rekta* oluşur. Bu yapılar idar konsantrasyonunda, medulla intersitisiyal sıvı ozmolaritesinde önemli rol oynarlar ve venöz sisteme dökülürler(Agar,2021;Hall ve Hall,2020). Henle kulbunun inen kolu sadece suya geçirgen özelliktedir. Burada aktif pompalar yoktur. Solütlerin geri emilimi çok fazla değildir. Bir miktar emilir. İnen henlenin suya geçirgen olmasının nedeni (eğer ki henle medullanın derinliklerine kadar iniyorsa) medullanın interstisyel aralıktaki hiperosmolaritesidir (Agar, 2021).Çıkan kalın henlede aktif geri emilim vardır. Filtre olan Na, K ve Cl'nin %25'ini; Ca, HCO₃⁻ ve Mg önemli miktarı geri emilirken suyun geri emilimi söz konusu değildir. Metabolik aktivite yüksek olduğu için epitellerinde bol mitokondri bulunur. Aktif emilimler sonucu idrar hipoosmotic yani dilüe olmuştur. Yüksek medulla osmolaritesinin en önemli nedeni Henle kıvrımının kalın çıkan kolundan sodyumun aktif olarak potasyum, klorür ve diğer iyonların birlikte taşınmasıyla interstisyum içine girmeleridir(Agar,2021;Hall ve Hall,2020).



Şekil 7: İnen ve çıkan Henle kulbu hücrelerinin yapısı ve başlıca taşıma mekanizmaları (Hall ve Hall,2020).

İnen kolda hücrelerin maddelere karşı geçirgen olması nedeniyle osmotik güçlerin etkisiyle su geçişi olmaktadır. Suyun filtrattan alınması inen koldaki osmolariteyi 1200 mOsm/l'ye kadar çıkarmaktadır. Filtratın osmolaritesi medulle interstisyel sıvı osmolaritesine yakın değerlere gelmektedir. Henle çıkan kolunda ise su hariç çözülmüş maddelerin çıkıyor olması filtratın osmolaritesini düşürür ve bu işlem kalın segmente kadar devam eder. Kalın segment hücreleri farklı yapıdadır aktif sodyum transportu yapabilirler. Henle kalın çıkan

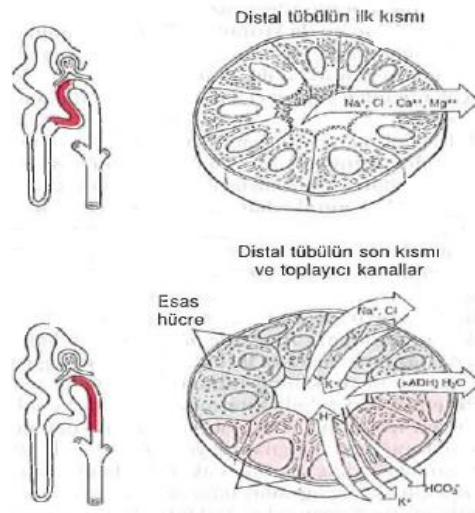
kolda aktif transport yapılmasıyla filtratın osmolar konsantrasyonu plazmanın bile altına inebilir. Distal tübüle geçecek olan filtratın osmolar konsantrasyonu 150 – 200 mOsm/l'ye kadar düşebilir (Agar,2021).

4.3. Distal Tübülden Su ve Madde Taşınımı

Distal tübül ilk kısmında su ve üre hariç diğer çözülmüş iyonların geri emilim işlemi devam eder. Osmolarite Henledeki osmolaritenin de bir miktar altına düşmüş olabilir. Na^+ , K^+ ve Cl^- dahil iyonların önemli kısmının geri alınır ve filtrat oldukça seyreltilmiş olur. Bu geri emilimde Na^+ - Cl^- taşıyıcısı her ikisini de hücre içine taşır, basoleteral taraftaki Na^+ – K^+ ATPaz pompası ile Na^+ ; Cl^- sızma kanallarıyla da hücrelerarası sıvıya difüze olur. Distal tübülün ilk kısmında, jukstaglomerüler kompleks bulunmaktadır (Agar,2021; Hall ve Hall,2020). Hipertansiyon ve kalp yetmezliğinde kullanılan ilaçlardan bazıları Na ve Cl beraber taşıyan bu taşıyıcıyı pompayı bloklamaktadır ve diüretik etki yapar(Costanzo,2021). Distal tübülün son kısmı ve toplayıcı tübüllerde, esas hücreler ve interkale hücreler bulunmaktadır(Hall ve Hall,2020;Vander ve ark.,2019). Nefronun bu segmentinde su geri emilimi antidiüretik hormonu (ADH) kontrolü altındadır (Hall ve Hall,2020)

Esas hücreler lümeninden Na ve su geri emilimi ile K salgılamasını yaparlar. İnterkale hücreler asit baz dengesinde; K ve HCO_3^- iyonunu geri emilimi ve H^+ iyonlarının salgılanmasında rol oynarlar (Hall ve Hall,2020) **İnterkale hücreler** aktif hidrojen ATPaz mekanizması ile bol miktarda hidrojen iyonu salgırlar. Böylece interkale hücreler vücut sıvılarının asit-baz dengesinin düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar(Costanzo,2021;Hall ve Hall,2020).

Distal tübülün son kısmı ve kortikal toplayıcı tübüllerin suya karşı geçirgenliği vazopresin de denilen ADH tarafından kontrol edilir. ADH etkisiyle vücut sıvı dengesine uygun şekilde su geri emilimi olmaktadır. ADH etkisiyle bu tübül segmentleri suya geri emilim oluşturur, fakat ADH yokluğunda suya geçirgenliği tamamen kaybederler. Artık kademe kademe sonraki bölümlerde idrarın yoğunlaştırılma işlemi başlamış olur(Agar,2021).

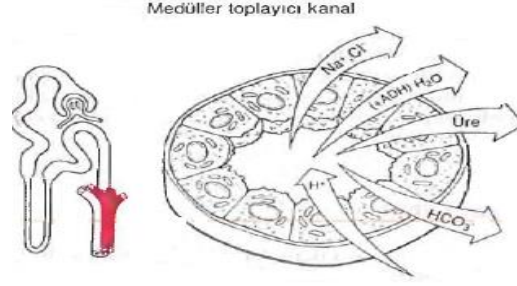


Şekil 8: Distal tübül hücrelerinin yapısı ve başlıca taşıma mekanizmaları(Hall ve Hall,2020)

4.4. Toplayıcı Kanalların fonksiyonu:

İdrarın son konsantrasyonunun ve miktarının oluşturulduğu bölümdür. Kortikal toplayıcı kanallar, iç ve dış medüller toplayıcı kanallar olmak üzere devam etmektedir. Toplayıcı kanal hücrelerinin suya karşı geçirgenliği ADH tarafından kontrol edilmektedir. Böylece medullada yüksek osmolariteye ve idrarın

yoğunlaştırılmasında katkıda bulunur. Bu hücreler aynı zamanda üreye karşı da geçirgendir. Medüller toplayıcı kanallar Na aktif olarak geri emilir, H^+ iyonlarını sekrete eder. Böylece asit baz dengesi korunmuş olur(Agar,2021).



Şekil 9: Medüller toplayıcı kanal hücrelerin yapısı ve başlıca taşıma mekanizmaları (Hall ve Hall,2020)

5.KAYNAKLAR

- Agar, E. (2021). İnsan Fizyolojisi (1st ed.). İstanbul Tıp Kitabevi.
- Alexander, R.T., Dimke, H. (2022). Molecular mechanisms underlying paracellular calcium and magnesium reabsorption in the proximal tubule and thick ascending limb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1518(1), 69-83.
- Alexander, R. T., Dimke, H., Cordat, E. (2013, Aug 1). Proximal tubular NHEs: sodium, protons and calcium? *Am J Physiol Renal Physiol*, 305(3), F229-236.
- Alexander, R. T., Fuster, D. G., Dimke, H. (2022,). Mechanisms Underlying Calcium Nephrolithiasis. *Annu Rev Physiol*, 84, 559-583.
- Amdur, R. L., Chawla, L. S., Amodeo, S., Kimmel, P. L., Palant, C.E. (2009). Outcomes following diagnosis of acute renal failure in US veterans: focus on acute tubular necrosis. *Kidney international*, 76(10), 1089-1097
- Baba, M., Shimbo, T., Horio, M., Ando, M., Yasuda, Y., Komatsu, Y., Masuda, K., Matsuo, S., & Maruyama, S. (2015). Longitudinal study of the decline in renal function in healthy subjects. *PloS one*, 10(6), e0129036.
- Chawla, L. S., Kimmel, P. L. (2012). Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney international*, 82(5), 516-524.
- Christensen, E. I., Birn, H., Storm, T., Weyer, K., Nielsen, R. (2012, Aug). Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)*, 27(4), 223-236.
- Costanzo, L. (2021). *Costanzo Physiology* (7th ed.). Elsevier
- de Rouffignac, C., Morel, F., Moss, N., & Roinel, N. (1973, Nov 30). Micropuncture study of water and electrolyte movements along the loop of Henle in psammomys with special reference to magnesium, calcium and phosphorus. *Pflugers Arch*, 344(4), 309-326
- Edwards, A., Long, K. R., Baty, C. J., Shipman, K. E., Weisz, O. A. (2022, Apr). Modelling normal and nephrotic axial uptake of albumin and other filtered proteins along the proximal tubule. *J Physiol*, 600(8), 1933-1952.
- Eshbach, M. L., & Weisz, O. A. (2017, Feb 10). Receptor-Mediated Endocytosis in the Proximal Tubule. *Annu Rev Physiol*, 79, 425-448
- Germaine, A. M. S. (2023). *Anatomy, Physiology And Pathophysiology*.
- Hall, J. E., Hall, M. E. (2020). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Kim Barrett, S. B., Jason Yuan, Heddwen Brooks. (2019). *Ganong's Review of Medical Physiology*, 26th Edition (26th ed.). McGraw Hill Medical Books.
- Köylü, H. (2020). *Klinik anlatımlı tıbbi fizyoloji* (4th ed.). Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.
- Lakshmi S. Chawla, P. L. K. (2012). Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *International Society of Nephrology*.
- Levey, A. S., Grams, M. E., & Inker, L. A. (2022). Uses of GFR and Albuminuria Level in Acute and Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*, 386(22), 2120-2128.
- Musso, C. G., & Oreopoulos, D. G. (2011). Aging and physiological changes of the kidneys including changes in glomerular filtration rate. *Nephron Physiology*, 119(Suppl. 1), p1-p5.
- Ren, Q., Weyer, K., Rbaibi, Y., Long, K. R., Tan, R. J., Nielsen, R., Christensen, E. I., Baty, C. J., Kashlan, O. B., & Weisz, O. A. (2020, May 1). Distinct functions of megalin and cubilin receptors in recovery of normal and nephrotic levels of filtered albumin. *Am J Physiol Renal Physiol*, 318(5), F1284-F1294
- Sutton, R. A., Dirks, J. H. (1975, Dec). The renal excretion of calcium: a review of micropuncture data. *Can J Physiol Pharmacol*, 53(6), 979-988.
- Vander, A. J., Sherman, J. H., Luciano, D. S. (2019). *Human physiology: the mechanisms of body function* (16th ed.). McGraw Hill Medical Books.
- Weyer, K., Andersen, P. K., Schmidt, K., Mollet, G., Antignac, C., Birn, H., Nielsen, R., & Christensen, E. I. (2018, Feb). Abolishment of proximal tubule albumin endocytosis does not affect plasma albumin during nephrotic syndrome in mice. *Kidney Int*, 93(2), 335-342.
- Wilson, L. B., Kaplan, P. (2018). *USMLE® step 1 lecture notes 2018 : physiology*. Kaplan Medical

BÖLÜM 8

CLAUSTRUM

Dr.Öğretim Üyesi Mehmet KARTAL
Dr. Yasemin ÜSTÜNDAĞ

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051758>

¹ Dr. Mehmet Kartal, İstanbul Gelişim Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye, mkartal@gelisim.edu.tr, ORCID ID 0000-0001-7364-0875

²Dr. Yasemin Üstündağ ,Dokuz Eylül Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İzmir, Türkiye, yasemin.ustundag@deu.edu.tr, ORCID ID 0000-0002-8836-0371

1.GİRİŞ

Clastrum, ön beynin ön-arka uzantısının büyük bir kısmı boyunca kıvrımlı şekilli ince bir tabaka şeklinde uzanan, insular korteksin hemen iç kısmında ve putamenlerin yan tarafında uzanan, iki taraflı bir beyin bölgesidir. (Jackson ve ark., 2020; Atilgan ve ark., 2021). Tüm kortikal katmanla ve geniş bir yelpazedeki heterojen subkortikal yapılarla bağlantısı olan oldukça korunmuş esrarengiz bir yapıdır. İnsanda bu yapı ile diğer beyin bölgeleri arasında milimetre küp başına en yüksek sayıda bağlantıya sahip olduğu düşünülmektedir. Clastrum hakkında nispeten az sayıda işlevsel araştırma yapılmış olsa da, memeli beyinde bilincin oluşmasında anahtar bir rol oynadığı yönündeki spekülasyonlar da dahil olmak üzere pek çok teorik öneri öne sürülmüştür. Diğer iddialar ise daha önemli olup, clastrum'un örneğin kortikal aktivitenin düzenlenmesi, mekansal bilgi işleme veya karar vermede özel bir role sahip olduğunu öne sürmektedir (Dillingham ve ark., 2017). Clastrum, sadece tüm plasental türlerde bulunmakla kalmayıp (Baizer ve ark., 2014), aynı zamanda kanatlılarda da bulunan oldukça korunmuş bir beyin bölgesidir (Puelles ve ark., 2016). Clastrum ayrıca, türler arasında büyük ölçüde korunmuş gibi görünen genetik özelliklere ve kortikal bağlantılara sahiptir (Dillingham ve ark., 2019). İnsanlar, maymunlar, kemirgenler, sürüngenler, tavşanlar ve kediler dahil olmak üzere farklı türler arasında, yapılan geniş anatomik çalışmalar, clastrum ile neocortex arasında yaygın bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Atilgan ve ark., 2021). Anatomik incelemelerde sıklıkla gözden kaçan bir subkortikal yapıdır. İlk olarak on sekizinci yüzyılda Fransız anatomist Felix Vicq-d'Azyr tarafından "nucleus taeniaformis" olarak tanımlanmış daha sonraları ismi "clastrum" olarak değiştirilmiştir. (Parent, 2012; Mathur, 2014, Torgerson ve ark., 2015). Diğer kaynaklara göre, klostrumun ilk olarak 1672'de Tomas Willis tarafından insanlarda tanımlandığı belirtilmiştir. Başka bir kaynağa göre ise Karl Friedrich Burdach tarafından 19. yüzyılın başlarında "vormauer" olarak adlandırıldığı belirtilmiştir (Torgerson ve ark., 2015). Bu bilgiler clastrum'un yapısını ve işlevlerini tanımlayan en erken raporlardandı. Daha sonra, Burdach tanımlanan bu yapının adını "clastrum" olarak değiştirdi (Johnson ve Fenske, 2014). Teodor Meinert ise clastrum bilgi işleme üzerindeki olası rolünü ilk kez öneren kişiydi (Torgerson ve ark., 2014; Smith ve ark., 2019). Francis Crick'in clastrum'u ön plana çıkaran ve yeni bir başlangıç yapan son taslağının yayınlanmasına kadar belirsiz ve yeterince dikkat çekmemiş olan bir beyin yapısı olarak kalmıştır (Jackson ve ark., 2020). Clastrum, korteksin hemen hemen tüm bölgelerine ve birçok subkortikal yapıya karşılıklı olarak geniş çapta dağılmış anatomik projeksiyonlara sahiptir. Yakın zamanda yapılan bir yüksek çözünürlüklü difüzyon görüntüleme çalışması (Park ve diğerleri, 2012), clastrum'un frontal, premotor, ventral anterior singulat, ventral temporal, görsel, motor, somatosensoriyel, koku korteksleri ve en güçlü şekilde entorhinal korteks ile bağlantıları olduğunu bildirmektedir. Ayrıca putamen, globus pallidus ve lateral amigdala gibi bazı subkortikal yapılarla da bağlantıları olduğu gösterilmiştir (Smythies ve ark., 2012).

2.Clastrum'un Anatomisi

Memeli beyninin clastrum'u anatomik olarak önemli ve karmaşık ancak işlevsel olarak yeterince araştırılmamış bir yapıdır (Edelstein ve Denaro, 2004). Sıçanlarda clastrum, büyük ölçüde telensefalonun rostral yarısını kaplayan bir çift subkortikal gri madde tabakasından oluşur. Rostral yönü (striatumun önünde) korpus kallozum'un forseps minörleri ve orbital korteksle çevrilidir; merkezi ve kaudal seviyelerinde, medialde putamen ve striatumun kaudat çekirdekleri ve lateralde insular korteks ile sınırlanmıştır. Sonuç olarak, Clastrum hem uzunlamasına hem de dorso-ventral eksenleri boyunca karmaşık bir üç boyutlu morfolojiye sahiptir. Gerçekten de, hem kortikal hem de subkortikal bölgelere yakınlığı, voksel tabanlı görüntüleme için önemli bir mekansal zorluk oluşturmuş ve benzer şekilde, uzunlamasına yayılışı ve dorso-ventral karmaşıklığı, lezyon analizlerini zorlaştırmıştır. Ancak bu zorluklara rağmen makul sayıda anatomik çalışma ve daha az derecede fizyolojik araştırma yapılmış ve bunların çoğunluğu fonksiyonel görüntüler

değildir çünkü analizler anestezili deneklerde yapılmıştır (Dillingham ve ark, 2017). Claustrum genel olarak üç bölmeye bölünmüştür ; somatosensoriyel ve motor cortexlerle bağlantılı bir anterior-dorsal alan, bir posterior dorsal alan yada görsel korteks ve bir ventral alan yada işitsel korteks (Edelstein ve Denaro, 2004; Crick ve Koch, 2005; Smythies ve ark., 2012).Claustral alt bölümler, ortak kortikal bağlantıyı paylaşan bölgelere göre tanımlanmıştır ki bu bölgeler "su birikintileri" olarak adlandırılır; kortikal bölgelere yakınlığa göre, örneğin insular claustrum ve endopiriform claustrum; veya anatomik konum, bağlantı, genomik ve/veya proteomik kombinasyonlarına göre adlandırıldıkları da görülür (Dillingham ve ark, 2017). "Claustrum" genellikle hem "dorsal claustrum" olarak da bilinen "insular claustrum " veya "alan 8" hem de altında devam eden bir yapı olan "ventral claustrum " yada "ependiform çekirdek" olarak da bilinen alt parçasında içine dahil olduğu bir topluluğu ifade eder(Mathur, 2014). Endopiriform çekirdek daha fazla alt bölümlere ayrılabilir; bunlar dorsal endopiriform çekirdek ve ventral endopiriform çekirdek olarak adlandırılır ventral endopiriform çekirdek, aynı zamanda "claustrum praefiriforme" olarak da bilinir (Mathur, 2014). Claustrum'un genel anatomik özelliklerinin ilk gözlemlerinden bu yana, türler arasında claustrum'un genetik, nörokimyasal ve sito mimari yapısını tam olarak tanımlamak için çok fazla çalışma yapılmıştır. İnsanlarda, primatlarda ve diğer büyük türlerde claustrum, dış ve dış kapsüllerin beyaz maddesinde tamamen kaplanması nedeniyle iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, kapsamlı beyaz madde gelişimi olmayan birçok küçük memelide (özellikle kemirgenlerde), claustrum 'nın tanımlanması zordur ve insular korteksin derin katmanlarıyla kusursuz bir şekilde bütünleşmiş olduğu görünmektedir (Mathur ve ark. 2009). Primatlar ve kemirgenler arasındaki claustrum için nörokimyasal ve genetik belirteçlerdeki homolojiler, artık ön-arka (Dillingham ve ark. 2019), mediolateral ve dorsoventral uzantılarını (Smith ve ark. 2018) daha somut bir şekilde tanımlamak için tanımlanmıştır. Bununla birlikte kemirgenlerde yanlış adlandırılmış dorsal endopiriform çekirdek bulunmaktadır Jackson ve ark., 2020).Literatürde kemirgenlerin claustral sınırlarının belirlenmesine ilişkin bir derece karışıklık ve zorluk var olmaya devam etmektedir; bunun nedeni ağırlıklı olarak lisensefalik türlerin, örneğin kediler ve primatlar gibi girensel türlerin aksine, iyi tanımlanmış bir ekstrem kapsüle sahip olmamasıdır. Claustrum ve komşu korteks süreklidir. Claustrumun ana gövdesinin nükleer sınırı konusunda artık bir fikir birliği mevcut olsa da (yani striatal seviyelerde; Mathur ve diğerleri, 2009; Wang ve diğerleri, 2017), literatürde bunun olup olmadığına ilişkin bir dereceye kadar çelişki mevcuttur (Dillingham ve ark., 2017).Claustrum, neokorteks boyunca yoğun bağlantı sergileyen subkortikal bir çekirdektir. Genetik ve anatomik özelliklerinin belirlenmesinde yakın zamanda kayda değer bir ilerleme kaydedilmiştir, ancak literatürde düzenli olarak sunulan temel tartışmalı bir konu, anatomik sınırının rostral boyutuyla ilgilidir. Dillingham ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sıçan beynindeki bu konuyu ele almaktadır. Bu çalışmada immünohistokimyasal ve nöroanatomik sistem takibinin bir kombinasyonunu kullanılarak, daha önce tanımlanan çeşitli genlerin ekspresyon profilleri claustrum'u çevreleyen kortekse göre incelenmiştir. Bu amaçla parvalbümin (PV), kristalin mu (Crym) ve guanin nükleotid bağlayıcı protein (G proteini), gamma 2'nin (Gng2) ekspresyon profilleri, kortikal anterograd veya retrograd izleyici enjeksiyonlarıyla birlikte veya bunlarla kombinasyon halinde immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Claustrum'un rostral sınırını daha da belirlemek için çeşitli talamik çekirdeklere retrograd izleyici enjeksiyonları kullanılmıştır. Bu üç markerın ekspresyonları,neostriatum'un anterior boynuzunun ötesine (~ 500 µm) uzanan bir nükleer sınırı tanımlamıştır. Sırasıyla kortikal retrograd ve anterograd izleyici enjeksiyonları, kortikal projeksiyonlu claustral nöronların dağılımlarını ve claustrum'a kortikal efferent girişlerin, gen işaretçisi ile türetilmiş claustrum sınırıyla örtüştüğünü ortaya koymuştur. Son olarak, talamusa gönderilen retrograd izleyici enjeksiyonlar, claustral bölge ile güçlü bir şekilde azalmış hücre işareti içeren insular kortiko-talamik projeksiyonları ortaya çıkarmıştır ve bu projeksiyonların striatum'un ötesine doğru uzandığı belirtilmiştir.Buna göre claustrum sınırı striatum'un ön apeksine doğru rostral'de, korpus kallozum'un forseps minörü'nün ventral'inde uzanır. (Dillingham ve ark., 2019).

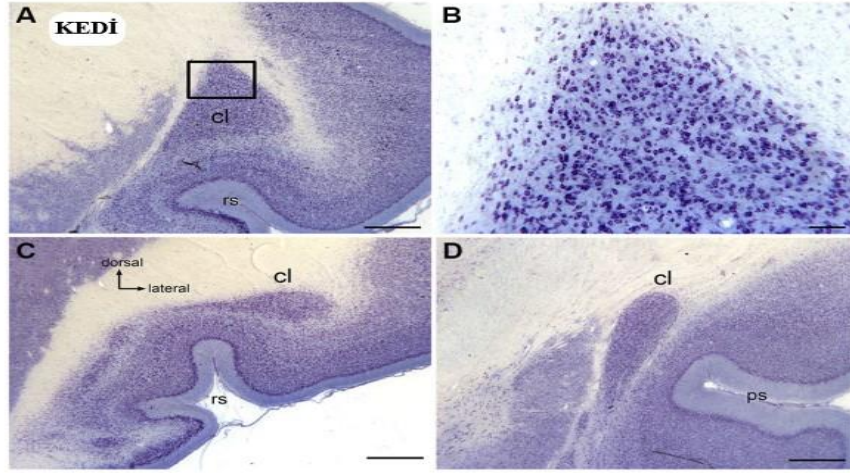
2.1.Kortikal bağlantı

Claustrum ile etkileşime girdiği kortikal alanlar özellikle prefrontal, singulat, işitsel, görsel ve somatosensör korteksler arasında kapsamlı projeksiyonların mevcut olduğu iyi bilinmektedir (Crick ve Koch, 2005;Atlan ve ark, 2017). Son yıllarda, kemirgenlerde yapılan çok sayıda mükemmel ve kapsamlı anatomik çalışma, claustrumun afferent ve efferent kortikal bağlantısını ana hatlarıyla ortaya koymuştur (Wang ve ark,

2017), örneğin parahipokampal (Agster ve ark, 2016; Tomás Pereira ve ark, 2016; Kitanishi ve Matsuo, 2017), somatosensoriyel-motor (Smith ve Alloway, 2010) ve görsel-motor korteks'ler (Smith ve ark, 2014), prefrontal ve entorinal korteksler (Watson ve ark, 2017). İpsilateral yarımkürede daha zayıf olan (ancak yine de mevcut olan) ikili kortiko-klaustral projeksiyonların tutarlı bir modeli vardır. Karşılıklı claustrum-kortikal bağlantı, büyük ölçüde aynı taraftaki yarı küreyle sınırlı olan yoğun projeksiyonlarla karakterize edilir. Daha önceki anatomik çalışmalar, claustrumda kortikal bağlantının ön-arka gradyanının olduğunu, ön kortikal bölgelerin anterior claustruma bağlandığını ve korteksin duyu alanlarının posterior claustruma bağlandığını göstermiştir (Fernández-Miranda ve ark., 2008). Kedi/primat claustrumunda görsel ve işitsel kortikal bağlantının sırasıyla dorsal-ventral olarak bölümlenmiş, ancak belirgin bir ara bağlantının olmadığı görülmüştür (Edelstein ve Denaro, 2004). Sıçanlarda bu durumun tersine, Smith ve Alloway'ın çalışmasında bu dorsal-ventral bölümlendirmenin belirgin olmadığı, anlamlı uzun menzilli claustrum içi bağlantıların olduğu bulunmuştur. (Smith ve Alloway, 2010).

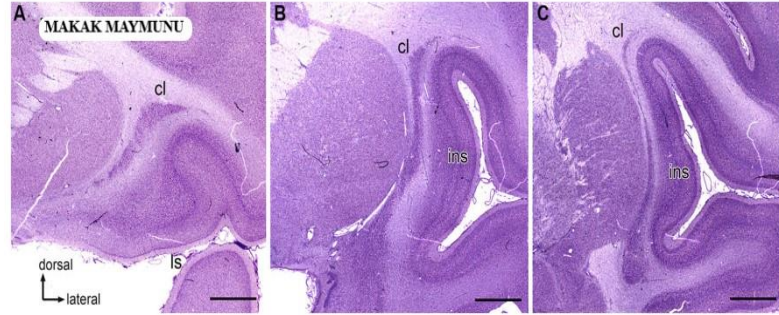
2.2.Subkortikal bağlantı

Kapsamlı kortikal bağlantıya ek olarak, claustrum bir dizi subkortikal yapıyla da, örneğin talamusla yoğun bir şekilde birbirine bağlıdır (McKenna ve Vertes, 2004; Vertes ve ark., 2006; Vertes ve Hoover, 2008), striatum (Wang ve ark., 2017), hipokampus (Zhang ve ark., 2013), amigdala (Majak ve ark., 2002; Wang ve ark., 2017) ve hipotalamus (Vertes, 1992). Talamik etkileşimlerden, claustrum-reuniens ve claustrum rhomboid bağlantısı özellikle dikkat çekicidir (McKenna ve Vertes, 2004; Vertes ve diğerleri, 2006). Nucleus reuniens, hipokampus ve medial prefrontal korteks üzerinde güçlü bir uyarıcı etkiye sahiptir (McKenna ve Vertes, 2004; Vertes ve ark., 2006). Bu iki yapı, ara bağlantı için kritik bir merkez görevi görür (Roy ve ark., 2017), hafızanın pekiştirilmesinde, mekansal hafızanın oluşmasında (Ito ve ark, 2015) ve klasik olarak koşullandırılmış korku anılarının genelleştirilmesinde (Eleore ve ark., 2011; Loureiro ve ark., 2012; Wheeler ve ark., 2013; Xu ve Sudhof, 2013) anahtar rol oynamaktadır. Vertes ve McKenna , nucleus reuniens ve claustrum arasındaki bağlantıların karşılıklı olduğunu ve bu bağlantıların rostral claustrum'da oldukça yoğunlaştığını göstermişlerdir (Vertes ve ark., 2006; McKenna ve Vertes,2004). Claustrum ve ön talamusun hodolojik özellikleri ilginç bir şekilde çok açık benzerlikler gösterir: her ikisi de tek taraflı ve ipsilateral kortikal çıktılarla kontrast oluşturan 6. katmandan kapsamlı, ağırlıklı olarak kontralateral kortikal projeksiyonlar alır (Mathiasen ve ark., 2017). Baizer ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada kedilerin ve makak maymunlarının claustrum'unu tanımlamış, insan da dahil diğer türlerle karşılaştırmışlardır . Kedilerin claustrum rostralkaudal olarak yaklaşık 11 mm kadar uzanır. Şekil 1, kedinin claustrum'unu farklı rostro-kaudal seviyelerde farklı konfigürasyonlarını gösteren üç kesitte göstermektedir. Şekil 1A, claustrum'un merkezi gibi görünen bir kesiti gösterir, büyük dorsal genişleme bölgesinin olduğu yerde görsel bölgenin bulunduğu yerdir. Şekil 1B, kedilerin claustrum'unun üçgen kısmındaki nöronların yuvarlak veya oval gövdeleri olduğunu gösterir. Şekil 1C ve 1D, claustrum'un kaudal ve rostral sınırlarındaki şeklini gösterir (Baizer ve ark., 2014).



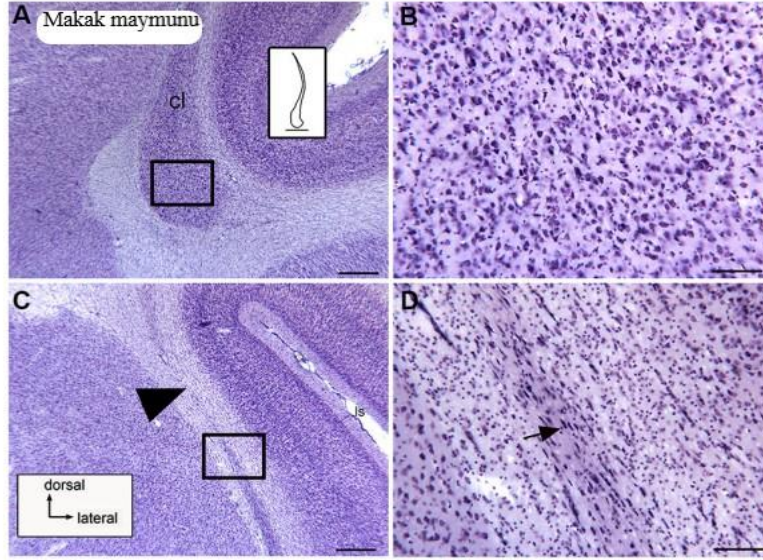
Şekil 1. Cresyl-Violet ile boyanmış kedi claustrum'u. (A):Rostro-caudal merkezden claustrum. Dikdörtgen alan (B)'de görülen alanı temsil eder. (B): Claustrum hücreleri. (C): Claustrum'un rostral sınırı. (D): Claustrum'un caudal sınırı. A, C, D = 1mm; B= 100µm. Kısaltmalar: cl: claustrum; ps: pseudosylvian sulcus; rs: rhinal sulcus (Baizer ve ark., 2014).

Anatomik veriler, makak maymunu claustrum'unun da görsel bir bölgesi olduğunu önermektedir ve bu bölgede görsel alanın birden fazla haritasını içerebilir (Şekil 2A-C, makak maymunu claustrum'unun farklı rostral seviyelerini gösterir). Kedide olduğu gibi, claustrum'un şekli rostro-kaudal seviyeye bağlı olarak değişir (Baizer ve ark., 2014).

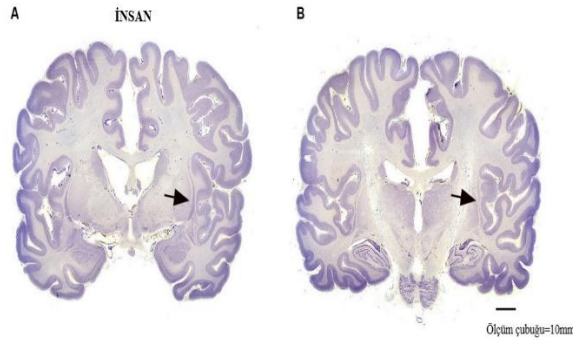


Şekil 2. Makak maymununda claustrum. (A):Rostral claustrum. (B): Rostro-caudal merkezde claustrum. (C): Caudal claustrum. A,B,C = 2mm. Kısaltmalar: cl: claustrum; ls: lateral sulcus; ins: insula. (Baizer ve ark., 2014).

Şekil 3, makak maymunu klostrumundaki nöronları farklı dorso-ventral seviyelerinde gösterir. Şekil 3C ve 3D, claustrum'un uzun, ince yükselen sapında birçok nöronun claustrum'un uzun eksenine paralelinde uzunlamasına uzanan hücre gövdelerine sahip olduğunu gösterir (Şekil 3D), geniş bölgelerde ise nöronların oval/polimorfik gövdeleri olduğunu gösterir (Şekil 3B). Bu hücre gövde şekillerindeki farklılıklar muhtemelen dendritik dalların şekil ve uzantılarındaki farklılıklarla yansıtılır. Ayrıca, claustrum'un uzun dorsal sapı, hücre seyrek bölgelerle kesintili olabilir (Şekil 3C, büyük ok işareti). İlginç bir şekilde, makak maymunu ve kedi arasında klostrumun organizasyonunda büyük bir fark bulunmaktadır. Her iki türde de, claustrum uzun ince bir sap ve bir genişlemeden oluşur, ancak bu genişleme kedide dorsal'de ve makak maymununda ventral'dedir. Hem kedi hem de makak maymununda görsel claustrum bulunur (Baizer ve ark., 2014).



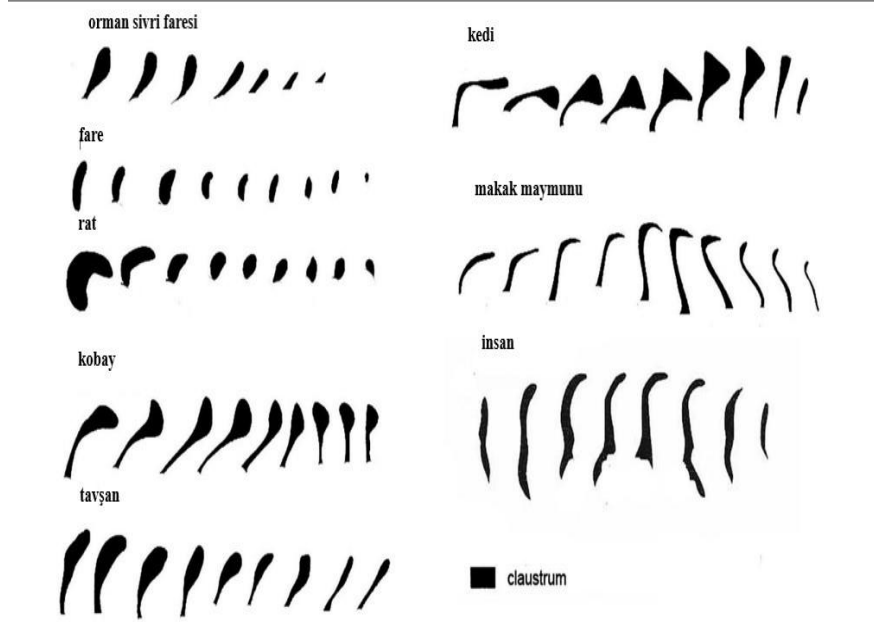
Şekil 3. Makak maymunu calustrum'unda yüksek büyütme nöronal organizasyon. (A): Claustrum'un ventral genişlemesi. Dikdörtgen (B)'de gösterilen alanı temsil eder. (B): Tüm claustrum'un taslak halinde çizimi. (C): Maymunun ventral genişlemesindeki nöronların yuvarlak ve poligon gövdeleri. Ok, hücre ayırma bölgesini gösterir. (D): Dikdörtgen (D)'de gösterilen alanı temsil eder. (D): İnce yükselen kökte, yapının sınırına paralel uzanan nöron gövdeleri. A, C = 500 μ m; B, D = 100 μ m. (Baizer ve ark., 2014).



Şekil 4. (A, B) İnsan beynindeki claustrum. Claustrum insan beyninin yaklaşık 17 mm'lik iki koronal bölümünde gösterilmiştir. (A) daha rostral'dedir. (Baizer ve ark., 2014).

3. Türler arası farklar

Kortikal katlama derecesi ve fonksiyonel kortikal bölgelerin sayısı konusunda türler arasında önemli bir değişkenlik bulunmaktadır;örneğin, primatlar ve kemirgenlerde kortikal görsel, somatosensorik ve işitsel bölgelerin sayılarını karşılaştırıldığında bu farklar daha belirgin olarak görülür. Bu kortikal organizasyon farklılıkları, claustrum'un organizasyonunun da farklılıklar gösterip göstermediği sorusunu gündeme getirir. Claustrum'un genel şeklinde türler arası çok büyük farklar olduğu açıktır. Sekiz türün analizi temelinde, beş farklı "tip" claustrum şekli tanımlanmıştır (Kowianski ve ark.1999). Her bir tür için, claustrum'un farklı rostro-kaudal seviyelerde farklı boyutlarda ve şekillerde farklılaşan sürekli bir yapı olarak göstermektedirler (Şekil 5). Daha yakın zamanlarda, yunus ve balinaların beyinlerinin analizi, bu türlerde claustrum'un çok farklı bir şekle sahip olduğunu gösterdi; bu türlerde claustrum, izole nöron adaları olarak görünmektedir (Baizer ve ark. 2020).



Şekil 5. Dorsal claustrum'un şeklinin 8 farklı türde gösterimi. (Baizer ve ark.,2014).

Çeşitli nöroanatomik çalışmalar, claustrum'un hipokampus, talamus, putamen ve bazal çekirdeklerin yanı sıra temporal, oksipital ve duyuşal lobları içeren subkortikal bölgelerle geniş bir bağlantı ağına sahip olduğunu göstermiştir (Smythies ve ark., 2012; Milardi ve ark., 2015; Patru ve Reser, 2015; Dillingham ve ark.,2017;Nikolenko ve ark.,2021). Claustrum'a bağlı olmayan herhangi bir kortikal bölgenin olup olmadığı henüz belirlenmemiştir (Milardi ve ark., 2015; Patru ve Reser, 2015). Bu nedenle insan claustrum'u, beyindeki birim hacim başına en yoğun şekilde bağlantılı yapılardan biri olarak kabul edilir (Dillingham ve ark.,2017; Sitte ve ark., 2017; Nikolenko ve ark.,2021).Mevcut traktografi çalışmaları dorsal ve ventral olmak üzere iki ana projeksiyon yolunu tanımlamıştır. Dorsal sistem, claustrum'u korteks'in duyuşal ve motor bölgelerine bağlayan bir grup liftir (Fernandez ve ark., 2008; Qadir ve Mathur, 2019). Ventral yol, claustrum'u işitme ve koku alma bölgelerine bağlar(Torgerson ve ark., 2015) . Diğer kaynaklar ise, claustrum'u serebral korteks'e bağlayan dört lif yolunu takip eder: ön, arka, üst ve yan yollar (Milardi ve ark., 2015). Ön ve arka yollar prefrontal korteks'e ve görsel değerlendirici alanlara bağlanır. Üst yol duyu-motor bölgelere, yan yol ise işitsel kortekse bağlanır. Medial yol bazal ganglionlara, özellikle kaudat çekirdeğe, putamen'lere ve globus pallidus'a bağlanır (Jackson ve ark., 2018).Bununla birlikte, bazal ganglionlarla olan bağlantıları tartışmalıdır: çeşitli girdi organizasyonu çalışmaları ile claustrum ile bazal ganglion bağlantıları ortaya çıkarmamıştır. Bununla birlikte bazı hayvan çalışmalarında da bazal gangliyonlar ile claustrum arasında bağlantı bulunmadığı belirtilmiştir (Atlan ve ark., 2017; Zingg ve ark., 2018). Ek çalışmalar, claustrum ile kontralateral serebral hemisfer arasındaki bağlantıları göstermiştir (Smith ve ark., 2010) bunlar arasında interhemisferik kortikocalustral lifler ve claustrum arası lifler bulunur. Difüzyon tensör görüntüleme ile yapılan traktografi çalışmaları anatomik bağlantıyı değerlendirmenin kesin bir yolu değildir. Bu nedenle, claustrum ağının gerçek kapsamı ve bağlantısı henüz tam olarak gösterilmemiştir.Claustral sinir devreleri, anterior singulat girus, prelimbik bölge ve medial prefrontal korteks dahil olmak üzere frontal korteks'e yüksek afinite gösterir. Birincil duyu-motor bölgelerinin claustrum'a zayıf bir şekilde bağlı olduğu görülmektedir (Krimmel ve ark. 2019). Claustrum sinir devreleri işlevsel olarak anterior singulat girusu görsel ve parietal kortekse bağlar ve bu projeksiyonlar, bilginin işlenmesi ve iletilmesinde rol oynayan claustrum nöronlarının inhibitör devresini ayırt eder (White ve Mathur, 2019). Claustrum bu nedenle frontal korteks, ön singulat girus ve ikincil görsel korteks (B1/B2), parietal ilişkisel korteks ile bağlantılıdır ve belirli kortikal alanların uzaysal-zamansal kontrolünü

koordine eder (Nikolenko ve ark.,2021).Claustrum'un, bilişsel etkileşimi teşvik etmek için singulat ve prefrontal korteks ile bağlantılı olduğu Krimmel ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir.Bilişsel görev performansı, belirli kortikal bölgelerin etkinleştirilmesi ve devre dışı bırakılmasına eşlik eder, bu da claustrum devreleri ile ilişkilendirilen işlevsel bağlantıyı sağlar (Krimmel ve ark., 2019). Bu nedenle, insan claustrum'unun, duyuşsal-motor işlemden bağımsız olarak özel görev kontrolü dahil olmak üzere biliş kontrolünde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Mevcut çalışmalar, kortiko-claustral projeksiyonların, orbitofrontal, singulat ve ikincil motor korteks gibi ön korteks bölgelerinden kaynaklandığını göstermektedir. Somatosensör, işitsel ve görsel bölgelerin kortikal-klostral girdilere minimum düzeyde bağlandığı görülmektedir (Jackson ve ark., 2020). Kortikal-claustral karşı taraf projeksiyonlarının, kortikal- kortikal-claustral aynı taraf projeksiyonlarından çok daha yoğun olduğu bildirilmektedir (Berman ve ark., 2020). Bu bağlantılar, frontal korteks bölgelerini desteklerken, duyuşsal korteksle olan afferent ve efferent bağlantılar nispeten daha belirgin değildir. Claustro-kortikal bağlantılar, claustrum'un dorsoventral eksenini boyunca topografik olarak düzenlenmiş olup, farklı korteks bölgeleri ile modaliteye özgü modülleri oluşturur. Örneğin, claustrum'un, öncelikle frontal korteks bölgelerinden, örneğin frontal göz alanlarından girdi aldığı görülmektedir, ancak daha sonra bu girdileri hem frontal hem de duyuşsal korteks gibi modaliteyle ilgili kortikal bölgelere geri gönderir. Buna dayanarak ortaya çıkan fikir, doğrudan kortiko-kortikal bağlantıları paylaşan korteks bölgeleri, aynı claustrum bölgesinden girdileri paylaşacaklardır, bu da klostrum nöronlarının her iki kortikal bölgeyi aynı anda innerve eden ikiye ayrılan akson kollateralleri göndereceği anlamına gelir. Gerçekten de, tek hücre izleme tekniğiyle, claustrum nöronlarının aksonlarının birçok beyin bölgesine geniş bir şekilde dallandığını, bunların arasında kontralateral kortikal yarımküreye kollateralizasyon yaptığını doğrulamıştır. Son olarak, kortiko-claustral ve claustro-kortikal etkileşimlerin ilginç bir yönü, daha güçlü bir şekilde internöronlara hedeflemeleridir, bu da karşılıklı beslemeli bir geri beslemeli inhibisyon devresi oluşturur (Smith ve ark., 2020).Kortikal bağlantılarının ötesinde, claustrum'un son zamanlarda tek yönlü girdiler aldığı gösterilmiştir. Bu girdiler, basolateral amigdala (BLA), hipokampus (CA1) ve limbik ve intralaminar talamusun çok sayıda çekirdeği (mediodorsal, MD; centromedian, CM; reuniens, Re; parafasiküler, Pf gibi) dahil olmak üzere birçok limbik subkortikal yapının yanı sıra bazal ön beyin kolinerjik merkezlerden (substantia innominata gibi) ve beyincik serotonerjik çekirdeklerden (dorsal raphe gibi) ve dopaminerjik girdilerden önemli derecede nöromodülatör girdi alır. Bu limbik ve nöromodülatör girdiler, farklı claustrum alt bölgelerinin genel olarak farklı claustrum çıkışlarının uyarılabilirliğini genel olarak artırma veya baskılama amacıyla etki edebilirler (Jackson ve ark., 2020; Smith ve ark., 2020). Norimoto ve arkadaşlarının sürüngenler üzerinde yaptığı çalışmada ise rostrokaudal ekseninde yayılan geniş bir ağ boyunca intraclaustral bağlantılara dair kanıtlar mevcuttur (Norimoto ve ark., 2020).Uyanık durumdaki claustrum'un rolüne bakıldığında, claustrum'un işleviyle ilgili hipotezler, korteksle olan güçlü bağlantılarına işaret eden anatomik izleme verilerine dayanmaktadır. Claustrum, en güçlü şekilde frontal bölgelerle bağlantılı olduğundan, yürütme, daha yüksek düzeydeki işlevleri, bilinç dahil, yönlendirmede bir rolünün olabileceği önerilmiştir. Bu bağlamda, dikkat ve odaklanma ile ilgili konularla da ilgili olduğu ortaya çıkmıştır (Smith ve ark., 2020). Claustrum'un işlevi hakkındaki ipuçları, hem kemirgenlerde hem de insanlarda dinlenme durumunda fonksiyonel MRI kullanarak yapılan son çalışmalardan gelmektedir (Smith ve ark, 2019; Jackson ve ark., 2020). Uyanık sıçanların dinlenme durumunda fonksiyone MRI kullanarak yapılan bazı son çalışmalarda claustrum'u, kemirgenlerin önemli bir düğümü olan saliens ağının homologu olarak göstermektedir. Saliens ağı genellikle dikkati kontrol eden singulat korteks ile değer işleme yapan insula arasındaki güçlü işlevsel bağlantı olarak tanımlanırken, Smith ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sıçanlarda singulat korteksinin hem anatomik hem de işlevsel olarak özellikle insula yerine claustrum ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Yine bu çalışmada, claustrum'un çekirdek bazlı analizlerinde bütün beyini geçen sinyallerin fonksiyonel olarak iki ana

bölge dağıldığı görülmüştür. Bu bölgeler singulat korteks ve mediodorsal talamus'tur. Singulat korteks ve mediodorsal talamus'ta çekirdek bölgelerinin sonraki analizleri, bu işlevsel bağlantıların özgüllüğünü doğrulamıştır. İlginç bir şekilde, anestezi edilen hayvanlarda, bu işlevsel bağlantıların özellikle zayıfladığı, diğer birçok bağlantının ise devam ettiği bulunmuştur. Claustrum duyusal bağlantılarıyla birlikte düşünüldüğünde ve basolateral amigdala gibi limbik yapıların belirgin girdileriyle, değerlendirme ve değer hakkındaki bilgileri duyusal bilgi ile entegre etme potansiyeline sahip görünmektedir. Bu bilgiler daha sonra dikkati yönlendirmek için singulat korteks aktivitesini yönlendirebileceği düşüncesini doğurur. (Smith ve ark., 2020).

4. Claustrum'un fizyolojisi

Claustrum'un anatomisi hakkındaki bilgiler oldukça kapsamlı olmasına rağmen, fizyolojisini araştıran çok az çalışma vardır. Farklı claustral nöron alt tiplerinin içsel özelliklerini tanımlayan ilk in vitro çalışmalar ancak yakın zamanda yürütülmüştür (Kim ve ark. 2016, Chia ve ark. 2017, White ve Mathur 2018, White ve ark. 2018). Son zamanlardaki dilim kayıt çalışmalarının tümünde, ani frekans adaptasyonu, claustrum'u uyarıcı nöronların ayırt edici nörofizyolojik özelliği olarak ortaya çıkmıştır. Claustrum nöronları, hem mevcut enjeksiyona hem de uyarıcı sinaptik girdilerin optogenetik aktivasyonuna yanıt olarak hızlı adapte olan veya hafif adapte olan ateşleme hızı fenotipleri sergilemiştir. Ek olarak, bu farklı claustral nöron alt tiplerinin rostrokaudal eksen boyunca farklı şekilde dağıldığı ve ayrılabilir neokortikal hedeflere yansıdığı görülmüştür (Chia ve ark. 2017, White & Mathur 2018, White ve ark. 2018). Claustrum projeksiyon nöronlarının (ve internöronların) farklı alt tiplerini tanımlamak için moleküler yaklaşımları kullanan ve claustrum nöronlarının projelendirdiği çeşitli aşağı akış bölgelerinden retrograd izlemeyi kullanan gelecekteki çalışmalar, claustrum'u oluşturan hücrelerdeki heterojenliğin boyutunu belirlemek için çok değerli olacaktır. Claustrum'un in vivo nöral ateşlemesine ilişkin fizyolojik çalışmaların çoğu, kedilerde ve primatlarda hücre dışı kayıtlar kullanılarak, öncelikle duyusal uyaranlara verilen yanıtlar değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. Ortak bir tema, claustrum'un modaliteye özgü alt bölgelerinin, bu modalitenin uyaranlarına yanıt vermesi, ancak karşılık gelen kortikal alanlara göre daha az spesifik olması gibi görünmektedir. Kedilerde yapılan ilk çalışmalar, kedilerin claustrum'un a görsel ve somatosensoryel haritaların varlığını ortaya koymuştur (Olson ve Graybiel, 1980; Sherk ve LeVay, 1983), ilgili uzaysal konumlarında hem retinotopik hem de somatotopik haritaları göstermektedir. Görsel uyaranlar durumunda, claustrum nöronlarının görsel korteks'e kıyasla benzersiz tepki özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin, claustrum nöronlarının yönelim ayarlaması sergilerken, uzun uyaranları tercih ettiği gözlemlenmiştir (LeVay ve Sherk, 1981). Daha sonraki çalışmalar, claustrum'un ortadan kaldırılmasının tek sonucunun, aynı taraftaki birincil görsel korteksteği uç-durdurulmuş hücrelerin (hiper-kompleks hücreler) sayısında bir azalma olduğunu göstermiştir. Bunun, uzun uyaranlara yanıt veren claustrum hücrelerinin kaybından kaynaklandığı öne sürülmüştür; bu hipoteze göre, normalde sonu durdurulan hücreler için çevre inhibisyonu sağlanmalıdır (Sherk ve LeVay, 1983). Primatlarda işitsel ve görsel tepkiler, sırasıyla claustrum'un farklı merkezi ve ventral bölgelerinde ölçülmüştür (Remedios ve ark. 2010). Bu dorsoventral yanıt haritalaması işitsel ve görsel kortekslerden gelen anatomik girdilerle uyumludur (Pearson ve ark. 1982). Claustrum'daki işitsel tepkilerin farklı ses kategorilerinde (çevresel sesler, vokalizasyonlar vb.) benzer büyüklüklere sahip olduğu bulunmuştur. Claustrum nöronlarındaki duyusal tepkiler, bir uyarının sunulmasından sonraki ~ 60 ms içinde 30 Hz'den daha yüksek hızlı patlamalar göstermiştir; bu aktivite, hareketsiz bir uyarı öncesi taban çizgisinden ortaya çıkar ve ardından hızla düşer (Remedios ve ark. 2014). Claustrum ve korteks arasındaki karşılıklı döngülerin anatomik tanımlanmasıyla birleştiğinde, bu fizyolojik sonuçlar, duyusal bilgi sağlayan ilgili neokortikal alana geri bildirim için hızlı bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Claustrum'un kortekse sağladığı feed-back engellemesine dayanarak, claustrum'daki duyusal

tepkiler, sinyali artırarak değil , başlangıçta claustrum'a duyuşal bilgi sağlayan duyuşal korteksteki gürültüyü azaltarak dikkatin odaklanmasına yardımcı olabilmektedir. Motor sistemi ile ilgili olarak, temel kol hareketleriyle ilgili primat claustrum aktivitesi rapor edilmiştir (Shima ve ark. 1996). Yukarıda tartışılan claustrum'un topografik organizasyonunu desteklemek üzere , bu yanıtlar, somatosensoryel ve motor kortekse bağlandığı bilinen claustrum'un en dorsal yönünden elde edilmiştir (Pearson ve ark. 1982). Genellikle tek bir kol hareketine (itme, çekme veya dönme) seçici olarak yanıt veren motor kortikal nöronların aksine, çoğu claustrum nöronu, diğer hareketlere olmasa da birden fazla kol hareketine yanıt vermiştir. Claustrum'un hareketiyle ilgili aktivite, motor kortekse benzer şekilde hareketin başlangıcından önce gerçekleşir; bu, motor korteksin, claustrum'daki bu motor aktivitenin muhtemel itici gücü olduğunu göstermiştir. Bu ilk bulgular, claustrum'un frontal motor korteksten motor planlama bilgisi aldığını, bunun da duyuşal korteksin öncelikli bölgelerini oluşturabildiğini ve bu alanlardaki arka plan gürültüsünü azaltarak, planlanan motor eyleme dayalı olarak beklenen duyuşal olaylara yönelik dikkati keskinleştirebildiğini göstermektedir. Örneğin, frontal göz sahası yaklaşan bir seçirme hakkında motor planlama bilgisi sağlayabilir ve bu bilgi de claustrum tarafından dikkati beklenen görsel hedefe odaklamak amacıyla görsel korteksteki aktiviteyi başlatmak için kullanılır. Bu motif, frontal göz sahası ile görsel korteks arasındaki doğrudan kortikokortikal bağlantıya ek olarak arka (duyuşal) kortikal bölgelerdeki nöral aktivitenin claustrum aracılı, yukarıdan aşağıya kontrolü için bir yol önermektedir. Duyusal ve motor işlemenin ötesinde, sıçanlarda claustrum'un ön bölgelerinden alınan kayıtlar, küçük bir nöron popülasyonunda (%3) yer hücresi ateşlenmesini de göstermiştir (Jankowski ve O'Mara, 2015). Claustrum'daki bu tür yüksek dereceli işlemler, ventral hipokampus'tan veya entorhinal veya retrosplenial korteks gibi hipokampal çıkıtlarla ilgili kortikal girdilerden kaynaklanabilir. Claustrum'un tam anatomik bağlantısı göz önüne alındığında, mekansal navigasyondan biliş ve ötesine kadar üst düzey süreçlerde claustrum'un çok sayıda olayla meşgul olması mümkün olduğu savunulmaktadır.

5.KAYNAKLAR

- Agster, K., L., Tomás Pereira, I., Sadoris, M. P., Burwell, R. D. (2016) Subkortikal connections of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat, II: Efferents. *Hippocampus*, 26(9), 1213–1230.
- Atilgan, H., Doody, M., Oliver, D. K., McGrath, T. M., Shelton, A. M., Echeverria-Altuna, I., Tracey, I., Vyazovskiy, V. V., Manohar, S. G., Packer, A. (2021). Does the claustrum have a function? Lessons from human lesion and animal studies point to divergent multifunctionality. *The University of Oxford Center for Open Science*. DOI: 10.31234/osf.io/gufd6
- Atlan, G., Terem, A., Peretz-Rivlin, N., Groysman, M., Citri, A. (2017) Mapping synaptic cortico-claustral connectivity in the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 525(6), 1381–1402.
- Baizer, J. S., Sherwood, C. C., Noonan, M., Hof, P. (2014). Comparative organization of the claustrum: what does structure tell us about function? *Front. Syst. Neurosci*, 8, 117. doi: 10.3389/fnsys.2014.00117
- Baizer, J. S., Webster, C.J., Baker, J. F. (2020). The Claustrum in the Squirrel Monkey. *The Anatomical Record*, 303, 1439–1454.
- Berman, S., Schurr, R., Atlan, G., Citri, A., Mezer, A.A. (2020). Automatic segmentation of the dorsal claustrum in humans using in vivo high-resolution MRI. *Cereb Cortex, Commun*, 1 (1), tgaa062.
- Dillingham, C. M., Jankowski, M. M., Chandra, R., Bethany E. Frost, B. E., O'Mara, S.M. (2017). The claustrum: Considerations regarding its anatomy, functions and a programme for research. *Brain and Neuroscience Advances*, 1, 1–9.
- Dillingham, C.M., Mathiasen, M.L., Frost, B.E., Lambert, M. A. C., Bubb, E. J. (2019). The anatomical boundary of the rat claustrum. *Front. Neuroanat*, 13, 53.
- Chia, Z., Silberberg, G., Augustine, G. J. 2017. Functional properties, topological organization and sexual dimorphism of claustrum neurons projecting to anterior cingulate cortex. *Claustrum*, 2, 1. <https://doi.org/10.1080/20023294.2017.1357412>
- Christopher M. Dillingham , Mathias L. Mathiasen , Bethany E. Frost , Marie A. C. Lambert , Emma J. Bubb , Maciej M. Jankowski , John P. Aggleton and Shane M. O'Mara. (2019) The Anatomical Boundary of the Rat Claustrum. *Frontiers in Neuroanatomy*. 13(53): 1-17.
- Crick, F.C., Koch, C. (2005) What is the function of the claustrum? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*. 360(1458), 1271–1279.
- Edelstein, L.R., Denaro, F. J. (2004). The claustrum: A historical review of its anatomy, physiology, cytochemistry and functional significance. *Cellular and Molecular Biology*, 50(6), 675–702.
- Eleore, L., López-Ramos, J.C., Guerra-Narbona, R., Delgado-Garcia, J. M. (2011) Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning (ed I Izquierdo). *PLoS ONE* 6(8): e23538.
- Fernández-Miranda, J. C., Rhoton, A. L., Kakizawa, Y., Choi, C., Alvarez-Linera, J. (2008) The claustrum and its projection system in the human brain: A microsurgical and tractographic anatomical study. *Journal of Neurosurgery*, 108(4), 764–774.
- Ito, H.T., Zhang, S. J., Witter, M.P. (2015) A prefrontal–thalamo–hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature*, 522(7554), 50–55.
- Jackson, J., Karnani, M. M., Zemelman, B. V., Burdakov, D., Lee, A. K. (2018). Inhibitory control of prefrontal cortex by the claustrum. *Neuron*, 99(5), 1029–1039.
- Jackson, J., Smith, J. B., Lee, A.K. (2020). The Anatomy and Physiology of Claustrum-Cortex. *Interactions. Annu. Rev. Neurosci*, 43, 231–47.

- Jankowski, M. M., O'Mara, S. M. (2015). Dynamics of place, boundary and object encoding in rat anterior claustrum. *Front. Behav. Neurosci.* 9:250
- Johnson, J.I., Fenske, B.A. (2014) History of the study and nomenclature of the claustrum. In: J. Smythies, L. Lawrence Edelman & V. Ramachandran (Eds.), *The claustrum* (pp. 1–27)Amsterdam: Elsevier.
- Kim, J., Matney, C. J., Roth, R. H., Brown, S. P. (2016). Synaptic organization of the neuronal circuits of the claustrum. *J. Neurosci*, 36(3),773–784.
- Kitanishi, T., Matsuo, N. (2017) Organization of the claustrum-to-entorhinal kortikal connection in mice. *J Neurosci*, 37(2),269-280. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1360-16.2016.
- Kowianski, P., Dziewiatkowski, J., Kowianska, J., Morys, J. (1999). Comparative anatomy of the claustrum in selected species: A morphometric analysis. *Brain Behav Evol*, 53,44–54.
- Krimmel, S. R., White, M. G., Panicker, M. H., Barrett, F. S., Mathur, B. N., Seminowicz, D. A. (2019). Resting state functional connectivity and cognitive task-related activation of the human claustrum. *Neuroimage*,196,59–67.
- LeVay, S., Sherk, H. (1981). The visual claustrum of the cat. III. Receptive field properties. *J. Neurosci*, 1(9),993– 1002.
- Loureiro, M., Cholvin, T., Lopez, J., Merienne, N., Latreche, A., Cosquer, B., Geiger, K., Kelche, C., Cassel, J.C., Pereira de Vasconcelos, A. (2012) The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(29), 9947–9959.
- Majak, K., Pikkarainen, M., Kempainen, S., Jolkkonen, E., Pitkänen, A. (2002) Projections from the amygdaloid complex to the claustrum and the endopiriform nucleus: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 451(3), 236–249.
- Mathiasen, M.L., Dillingham, C.M., Kinnavane, L., Powell, A.L., Aggleton, J.P. (2017). Asymmetric cross-hemispheric connections link the rat anterior thalamic nuclei with the cortex and hippocampal formation. *Neuroscience*, 349, 128–143.
- Mathur, B. N., Caprioli, R. M., Deutch, A. Y. (2009). Proteomic analysis illuminates a novel structural definition of the claustrum and insula. *Cereb. Cortex*, 19(10),2372–2379.
- Mathur, B.N. (2014). The claustrum in review. *Front. Syst. Neurosci.* 8:48
- McKenna. J.T., Vertes, R.P. (2004). Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, 480(2), 115–142.
- Milardi, D., Bramanti, P., Milazzo, C., Finocchio, G., Arrigo, A., Santoro, G.(2015). Cortical and subcortical connections of the human claustrum revealed in vivo by constrained spherical deconvolution tractography. *Cereb Cortex*,25(2),406–414.
- Nikolenko, V.N., Rizaeva, N.A., Beeraka, N.M., Oganesyanyan, M.V., Kudryashova, V.A., Dubovets, A.A., Borminskaya, I.D., Bulygin, K.V., Sinelnikov, M.Y., Aliev, G. (2021).The mystery of claustral neural circuits and recent updates on its role in neurodegenerative pathology. *Behav Brain Funct*,17(1),8. doi: 10.1186/s12993-021-00181-1.
- Norimoto, H., Fenk, L. A., Li, H. H., Tosches, M. A., Gallego-Flores, T., Hain, D., (2020). A claustrum in reptiles and its role in slow-wave sleep. *Nature*, 578(7795),413–418.
- Olson, C. R., Graybiel, A. M. (1980). Sensory maps in the claustrum of the cat. *Nature*, 288(5790),479–481.
- Parent, A. (2012). The history of the basal ganglia: the contribution of Karl Friedrich Burdach. *Neurosci. Med*, 3(4),374–379.
- Patru, C.M., Reser, D. A. (2015). New perspective on delusional states: Evidence for claustrum involvement. *Front Psych*, 6,158.

- Pearson, R. C., Brodal, P., Gatter, K. C., Powell, T. P. (1982). The organization of the connections between the cortex and the claustrum in the monkey. *Brain Res*, 234(2),435–441.
- Puelles, L., Ayad, A., Alonso, A., Sandoval, J. E., Martínez-de-la-Torre, M., Medina, L., Ferran, J.L. (2016). Selective early expression of the orphan nuclear receptor Nr4a2 identifies the claustrum homolog in the avian mesopallium: impact on sauropsidian/mammalian pallium comparisons. *J. Comp. Neurol*, 524, 665–703. doi: 10.1002/cne.23902
- Qadir, H., Mathur, B. N.(2019). Identifying SUM projections to claustrum is about knowing your limits. *Clastrum*, 4(1),1609865.
- Remedios, R., Logothetis, N. K., Kayser, C. (2010). Unimodal responses prevail within the multisensory claustrum. *J. Neurosci*, 30(39):12902–12907.
- Roy, A., Svensson, F.P., Maze, A., Kocsis, B. (2017). Prefrontal-hippocampal coupling by theta rhythm and by 2–5Hz oscillation in the delta band: The role of the nucleus reuniens of the thalamus. *Brain Struct Funct*, 222(6),2819-2830. doi: 10.1007/s00429-017-1374-6
- Shima, K., Hoshi, E., Tanji, J. (1996). Neuronal activity in the claustrum of the monkey during performance of multiple movements. *J. Neurophysiol*, 76(3),2115–2119.
- Sherk H., LeVay, S. (1983). Contribution of the cortico-claustral loop to receptive field properties in area 17 of the cat. *J. Neurosci*, 3(11),2121–2127.
- Sitte, H.H., Pif, C., Rajput, A.H., Hörtnagl, H., Tong, J., Lloyd, G. K. (2017). Dopamine and noradrenaline, but not serotonin, in the human claustrum are greatly reduced in patients with Parkinson’s disease: possible functional implications. *Eur J Neurosci*, 45(1),192–197.
- Smith, J. B., Alloway, K. D. (2010) Functional specificity of claustrum connections in the rat: Interhemispheric communication between specific parts of motor cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(50), 16832–16844.
- Smith, J. B., Alloway, K. D., Hof, P. R., Orman, R., Reser, D. H. (2018). The relationship between the claustrum and endopiriform nucleus: a perspective towards consensus on cross-species homology. *J. Comp. Neurol*, 527(2),476–99.
- Smith, J.B., Watson, G., Liang, Z., Liu, Y., Zhang, N., Alloway, K. (2019). A role for the claustrum in salience processing?. *Front Neuroanat*,13,64.
- Smith, J.B., Lee, A.K., Jackson, J. (2020).The claustrum. *Curr Biol*, 30(23):R1401-R1406. doi: 10.1016/j.cub.2020.09.069.
- Smythies, J., Edelstein, L., Ramachandran, V. (2012). Hypotheses relating to the function of the claustrum. *Frontiers in Integrative Neoruscience*, 6,53.
- Stewart, G., Richardson, J., Zhang, J., Robinson, C.(2014). The structure and function of allergens. In: Jr. N. F. Adkinson, B.S. Bochner, A. W. Burk, W. W. Busse, S. T. Holgate, R. F. Lemanske, & R. E. O’Hehir (Eds.), Middleton’s allergy principles and practice (pp. 398 – 429). 6th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Tomás Pereira, I., Agster, K. L., Burwell, R. D. (2016) Subkortikal connections of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat, I: afferents. *Hippocampus*, 26(9), 1189–1212.
- Torgerson, C.M., Van Horn, J.D. (2014). A case study in connectomics: the history, mapping, and connectivity of the claustrum. *Front Neuroinform*, 8,83.
- Torgerson, C.M., Irimia, A., Goh, S.M., Van Horn, J.D. (2015). The DTI connectivity of the human claustrum. *Hum Brain Mapp*, 36(3),827–838.
- Vertes, R.P. (1992). PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 326(4), 595–622.

- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Do Valle, A.C., Sherman, A., Rogrizez, J.J. (2006.) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 499(5), 768–796.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B. (2008.) Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 508(2), 212–237.
- Wang, Q., Ng L., Harris, J. A., Feng, D., Li, Y., Royall, J. J., Oh, S. W., Bernard, A., Sunkin, S. M., Koch, C. Zeng, H. (2017). Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 525(6), 1317–1346.
- Watson, G. D. R., Smith, J. B., Alloway, K. D. (2017). Interhemispheric connections between the infralimbic and entorhinal cortices: The endopiriform nucleus has limbic connections that parallel the sensory and motor connections of the claustrum. *The Journal of Comparative Neurology*, 525(6), 1363–1380.
- Wheeler, A.L., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Xiong, X., Kovacevic, N., Lerch, J.P., McIntosh, A.R., Parkinson, J., Frankland, P.W. (2013). Identification of a functional connectome for long-term fear memory in mice (ed O Sporns). *PLoS Computational Biology*, 9(1): e1002853.
- White, M.G., Mathur, B. N.(2018). Frontal cortical control of posterior sensory and association cortices through the claustrum. *Brain Struct. Funct*, 223(6),2999–3006.
- White, M. G., Mathur, B. N. (2019). Frontal cortical control of posterior sensory and association cortices through the claustrum. *Brain Struct Funct*, 223(6),2999–3006.
- White, M. G., Panicker, M., Mu, C., Carter, A. M., Roberts, B. M. (2018). Anterior cingulate cortex input to the claustrum is required for top-down action control. *Cell Rep*. 22(1):84–95.
- Xu, W., Sudhof, T.C. (2013). A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science*, 339(6125), 1290–1295.
- Zhang, S. J., Ye, J., Miao, C. (2013) Optogenetic dissection of entorhinal-hippocampal functional connectivity. *Science*, 340(6128), 1232627.
- Zingg, B., Dong, H. W., Tao, H. W., Zhang, L. I.(2018). Input–output organization of the mouse claustrum. *J Comp Neurol*, 526(15),2428– 2443.

BÖLÜM 9

DOĞAL BALIN BİYOLOJİK BİLEŞENLERİNİN ANTİKANSER ve ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Öğr. Gör. Dr. İlhan SABANCILAR

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051760>

1.GİRİŞ

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre bal; 'Bitki nektarlarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürünü' olarak ifade edilmektedir (TGK, 2020). Bal, iyileştirici, antibakteriyel, antikanser, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle dünya çapında alternatif tedavi amaçlı kullanılan, oldukça besleyici bir doğal gıda ürünüdür (Assim ve ark., 2010). Güçlü antioksidan özelliklere sahip polifenoller ve flavonoidler gibi biyoaktif maddeler içeren balın, serbest radikal temizleyici etkisi nedeniyle vücuttaki patolojik değişiklikleri önlemek ve ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır (Ahmed ve ark., 2007). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda balın biyolojik bileşenlerinin karakterizasyonu büyük ilgi görmektedir. Bal gıda ürünü glukoz, früktoz, sükröz gibi şekerler, fenolik asitler, flavonoidler, amino asitler, proteinler, vitaminler ve enzimler dahil olmak üzere yaklaşık 200 biyolojik bileşenler içerir (Wang ve Li, 2011). Bitki ekstraktında ve balda bulunan Fenolik bileşikler balın antioksidan ve diğer faydalı özelliklerine katkıda bulunan ana bileşenler arasında yer alır (Gheldof ve Engeseth, 2002). Fenolik asitler, antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan ve anti-aterojenik özellikler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Rocha, ve ark., 2012). Taze balmumunun lipid imzası, balmumu esteri, doymuş yağ asidi, n-alkan ve alkol profilleri ile karakterize edilir. Uzun zincirli çift numaralı palmitat mum esterlerinde yer alan karbon izotopları (C40–C52), C46'da maksimuma çıkan en belirleyici işaretleyici olarak yer alır (Tulloch ve Hoffman, 1972). Balın ana bileşenleri su, glikoz, maltoz, fruktoz ve sakkarozdur; küçük bileşenleri amino asitleri, proteinleri, organik asitleri, flavonoidleri, vitaminleri ve asetilkolini içerir (Silva ve ark., 2016). Balda ısı işlem balın kristalleşme eğilimini değiştirir, ilk görünümünü korur ve ürünü kirletebilecek mikropları yok eder (Türkmen ve ark., 2006). Doymuş yağ asitleri çift sayılı ve uzun zincirlidir (C14:0–C36:0), lignoserik asit (C24:0) ağırlıklıdır. Bir kez bozduğunda, palmitat mum esterlerinin hidrolizinden artan miktarda palmitik asit (C16:0) oluşur (Regert ve ark., 2001).

Her yıl milyonlarca insana kanser teşhisi konuluyor ve vakaların büyük çoğunluğu ölümlerle sonuçlanıyor. Gastrointestinal sistemde kanserin sık görülmesinin temel nedeni bu bölgedeki hücrelerde genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişen hücre sinyal yollarının oluşmasıdır. Değişen hücre içi sinyal yolları kolon ve ince bağırsak dokusunda oluşan oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt ile karsinogenezin şiddeti arasında doğrudan bir ilişki yapılan çalışmalarda rapor edilir (Mabrouk ve ark., 2002). Amerikan Kanser Derneği'ne göre kanserden kaynaklanan ölümler, dünya çapında kaydedilen yıllık ölümlerin %2-3'ünü oluşturmaktadır (Acs ve ark., 2009). Bu nedenle kanser tedavisinde kemoterapötiklerle birlikte spesifik antioksidanların kullanılmasının kanser ilaçlarına bağlı yan etki görülme sıklığını azaltabileceği ve bu ilaçların anti-karsinogenik etkilerini artırabileceği ileri sürülmektedir (Hamza ve ark., 2013). Antioksidanlar hücreleri hasara karşı etkili bir şekilde koruyabilir ve bu nedenle hücre ve dokuların homeostazisi için hayati önem taşırlar (Alzahrani ve ark., 2012). Ayrıca toplam oksidan durum (TOS)/toplam antioksidan durum (TAS) oranıyla ifade edilen oksidatif stres indeksi (OSI) değeri de oksidatif stresin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak yer alır (Usta ve ark., 2018). Kolon kanseri modelinde oksidatif stres, inflamasyonun şiddeti, patogenezinin şiddeti ile tümörün gelişim hızı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu yapılan çalışmalarda veriler bulunmaktadır (Jisha ve ark., 2020). Oksidatif stresin doku ve kandaki oksidasyonun bir göstergesi olan PON-1 ile değerlendirilmesinde ve serbest radikaller değişikliklere bağlı olarak PON-1 düzeyleri değişmektedir (Aviram ve Rosenblat, 2004). Doğal balda yer alan biyolojik bileşenlerin antioksidan özellikleri ve sitotoksik aktiviteleri ile ilgili in vivo ve in vitro birçok çalışmada değerlendirilmiştir (Biluca ve ark., 2020). Bal, vücut dokusuyla temas ettiğinde hidrojen peroksit salınımını uyaran glikoz-oksidad adı verilen ve arındırıcı etkiye sahip bir enzim içerir (Hislop ve ark., 1995; Anderson 2006). Bal, lenfosit ve fagositlerin

artmasını kolaylaştırır ve monositlerin sitokin ve interlökin salgılamasına yardımcı olur, böylece iyileşme sürecini uyarır (Molan, 2001). Son olarak bazı bal türlerinde bakteri yok edici özelliklere sahip olduğu bilinen fitokimyasallar (bitki kimyasalları) mevcuttur (Molan 2001a ve Anderson, 2006). Antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç ve standart tedaviyle iyileşmeyen yaralar, balın tıbbi amaçlarla kullanımına olan ilginin yeniden canlanmasına neden olmuştur (Molan 2001a ve Schumacher, 2004). Balın faydalarına ilişkin anekdotal kanıtlar ve bilimsel olmayan çalışmalar şeklindeki raporların artması, daha fazla araştırmaya ve daha kapsamlı bir sistematik incelemeye duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır (McIntosh ve Thomson, 2006). Balın iyileşme sürecini kolaylaştırdığına inanılan bir takım özellikleri vardır. 3,2 ila 4,5 arasında değişen bir pH ile asidiktir ve mikropların büyümesini engellemeye yarar, çünkü mikropların çoğunluğu 7,2 ila 7,4 arasındaki bir pH'ta gelişir (Molan 2001a ve Stephen-Haynes, 2004). Yüksek şeker içeriği yaradan su çekerek suyun mikroplara ulaşmasını azaltır, bu da mikrobiyal büyümeyi daha da engeller (Lusby ve ark., 2002).

2.Oksidanlar

Oksidanlar, normal vücut sürecinde oksijenden türetilen bir yan üründür (Rahmen ve Adcock, 2006). Son yıllardaki çalışmalarda, reaktif oksijen türlerinin (ROS), normal hücre büyümesi, dönüştürülmüş durumun indüksiyonu ve sürdürülmesi, programlanmış hücre ölümü ve hücre yaşlanma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlere aktif olarak katıldığını göstermiştir. Bu biyolojik sonuçların, oksidan patlamasının seviyesinde, süresinde veya bu oksidatif strese eşlik eden hücre bağlamındaki ince farklılıkları yansıttığı gözlenebilir. Oksidanlar, substrat olarak moleküler oksijeni kullanan birden fazla enzim tarafından hücre içinde üretilebilir. İki klasik fagositik ROS üreten enzim, çok alt birimli NADPH oksidaz ve miyeloperoksidaz (MPO), konakçı savunmasındaki temel rolleri nedeniyle ilk olarak incelenmiştir. NADPH oksidaz ve MPO tarafından üretilen oksijen radikallerinin ve diğer toksik türlerin, mikroorganizmaların öldürülmesinden doğrudan sorumlu olduğu düşünülüyordu; ancak yeni kanıtlar Bakteriyel yıkım için gerekli olan ROS'un kendisi değil, nötrofil içindeki proteazların miktarı önem göstermektedir (Reeves, 2002). NADPH oksidaz ailesinin genişleyen üyelerine ek olarak, yeni oksidazlar veya oksidoredüktazlar da gelişiminde pleksin aracılı aksonal itme çeşitli işlevlerde rol oynamıştır (Terman ve ark., 2002). Önceki çalışmalar, çok sayıda peptit büyüme faktörünün reseptör bağlanması ROS üretimini uyardığını ve bu oksidan patlamasının aşağı akış sinyallemesinin belirli yönleri için gerekli olduğunu göstermiştir (Droge, 2002).

3- Antioksidanlar

Çeşitli proteinler süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksit gibi radikallerde temizleyici ajanlar olarak işlev görürler. Bu proteinler arasında SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, tioredoksin ve peroksiredoksin gibi protein ailesi yer alır. Bu antioksidanların yanı sıra enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, oksidan yükünü ortadan kaldırmada görev almaktadırlar. Tioredoksin enzimi ile yapılan iki yeni çalışmada, çeşitli oksidan türler ile antioksidan bileşenler arasında dinamik bir etkileşim olduğunu öne sürüyor. Oksidatif strese maruz kalan T hücrelerinde, glutatasyona uğrayan proteinlerin analizi sonrasında ana hedefinin aslında tioredoksin olduğunu ortaya çıkardı (Casagrande ve ark., 2002). Bu çalışmada nitrik oksidin S-nitrosilat Cys69'a bağlandığı ve böylece temizleme aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, protein ve protein olmayan antioksidan sistemleri aracılığıyla ROS ve RNS arasında bir çapraz etkileşim olduğunu göstermektedir. Antioksidanlar, canlı dokulardaki oksidasyonun olumsuz etkileriyle mücadele edebilen bileşiklerdir. Bununla birlikte, ne yazık ki bazen gıdalara sahte antioksidanlar da ekleniyor ve bunların yetersiz beslenmeyle doğrudan etkilerini doğrulayan çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, hayvanlar üzerinde yapılan laboratuvar çalışmalarında, bu tür sahte ürünlerin karaciğer hasarı ve kanser riskini artırdığını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla minimum toksisiteye sahip, yüksek etkili antioksidanlara ihtiyaç duyulması kaçınılmaz bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır. Balda güçlü antioksidan aktiviteye sahip farklı

bileşiklerin varlığı çeşitli çalışmalar tarafından doğrulanmıştır (Gorjanovi ve ark., 2013; Beretta ve ark., 2005). Bu bileşikler askorbik asit, fenolik asitler, glikoz oksidaz, flavonoidler, katalaz, amino asitler ve proteinleri içerir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda baldaki en önemli antioksidanların fenoller olduğunu göstermektedir (Hussein ve ark., 2011; Aljadi ve Kamaruddin, 2004; Blasa ve ark., 2006).

Tablo 1. Hidrofilik ve lipofilik fazda bazı antioksidanlar (Sorg, 2004).

| Antioksidan | Faz | Etki |
|--------------------------------|---------------------------|--|
| Süperoksit dismutaz(SOD) | Hidrofilik | O ₂ 'nin H ₂ O ₂ ve O ₂ 'edismutasyonu |
| Katalaz(CAT) | Hidrofilik | H ₂ O ₂ 'nin H ₂ O ve O ₂ 'edismutasyonu |
| Glutatyon peroksidaz(GSH-Px) | Hidrofilik veya Lipofilik | R-OOH'nin R-OH indirgenmesi |
| Glutatyon redüktaz (GSH-Rd) | Hidrofilik | Okside glutatyonunindirgenmesi |
| Glutatyon S - transferaz (GST) | Hidrofilik | R-OOH'nin GSH ilekonjugasyonu |
| Metallotieninler | Hidrofilik | Geçiş metalleriylenötralizasyon |
| Tiyoredoksinler | Hidrofilik | R-S-S-R'nin R-SH'a indirgenmesi |
| Glutatyon | Hidrofilik | R-S-S-R'nin R-SH'a indirgenmesi Serbest radikal temizleyicisi GSH-Px ve GST'nin kofaktörü |
| Ubikinon | Lipofilik | Serbest radikal temizleyicisi Lipid peroksidasyonundan korur |
| Askorbik asit | Hidrofilik | Serbest radikal temizleyicisi Tokoferol kazanımı Enzimlerin redükte formda korunması |
| Karotenler | Lipofilik | Serbest radikal temizleyicisi O ₂ ' baskılayıcı |
| Tokoferol | Lipofilik | Selenyum absorpsiyonunu artırır Serbest radikal temizleyicisi Lipid peroksidasyonundan korur |
| Selenyum | Amfilik | Tiyoredoksin, GSH-Px yapıtaşı |

4.Flavonoidler

Flavonoid analizi son zamanlarda bitki kaynaklı gıdaların coğrafi ve botanik kökenine ilişkin çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu nedenle şaraplar (Etievant ve ark., 1988; Tomas-Lorente ve ark., 1989), meyve suları (Rouseff ve ark., 1987; Rouseff, 1988) ve arı poleni (Tomas-Barberan ve ark., 1989) üzerine çalışmalar rapor edilmiştir. İspanya'nın farklı bölgelerinden gelen balın coğrafi kökenini araştırmaya yönelik araştırma programının bir parçası olarak, çeşitli bölgelerden toplanan on La Alcarria balı örneğinde bulunan flavonoidleri incelenmiştir. Analiz sonrasında balda yalnızca birkaç flavonoid tespit edilmiştir. Böylece, flavanon pinocembrin balda bulunan antimikrobiyal bileşiklerden biri olarak tespit edildi (Villanueva ve ark., 1970; Bogdanov, 1984), flavonoller kaempferol ve kersetin ve flavanonlar naringenin ve pinocembrin ayçiçeği balında tespit edildi (Sabatier ve ark., 1989). Ayrıca bal tanımlamasında flavonoid analizinin tanımlayıcı olarak kullanılması önerilmiştir (Amiot ve ark., 1989). HPLC'nin flavonoidlerin analizi için tercih edilen bir yöntem olduğu iyi bilinmektedir. Baldaki flavonoidlerin analizindeki temel sorun, baldaki çok yüksek şeker içeriğidir;

bu da bu metabolitlerin ekstraksiyonunu ve HPLC analizi için numune hazırlamayı zorlaştırır. Sıvı-sıvı bölmeler, flavonoidlerin tamamen geri kazanılmasına izin vermeyen uygunsuz ara fazlar üretir. Bu sorun yakın zamanda iyonik olmayan polimerik reçine Amberlite XAD-2 kullanılarak çözülmüştür (Ferrerres ve ark., 1991; TomásBarberán ve ark., 1992). Önceki bir makalede, Amberlite XAD-2 ve Sephadex LH-20 kolon kromatografisinin bir kombinasyonu ile hazırlanan numunelerin HPLC analizi yoluyla balda 16 flavonoidin tanımlandığını bildirmiştik (Ferrerres ve ark., 1991). Ancak bu tekniğin sınırlamaları, özellikle Sephadex LH-20 kromatografisi açısından oldukça karmaşık olması ve kalite kontrol belirlemelerinde rutin analizler için uygun olmamasıydı. Buna ek olarak, flavonoidlerin Sephadex LH-20 kolonundan geri kazanımı belirlenmesinde, flavonoid fraksiyonunun önceki elüsyon yapan fenolik türevlerden ayrılmasının net bir şekilde gerçekleşmemesinden, flavonoidlerin miktarının net olarak belirlenmesine izin vermemesiydi.

5. Polifenoller

'Fenolik' veya 'polifenol' terimi, kimyasal olarak, fonksiyonel türevler (esterler, metil esterler ve glikozitler) dahil olmak üzere bir veya daha fazla hidroksil ikame edicisi taşıyan aromatik bir halkaya sahip bir madde olarak tanımlanabilir. Bu biyoaktif maddeler bitkiler aleminde geniş çapta dağılmıştır, taze işlenmiş bitkisel gıdaların duyuusal ve besleyici kalitesiyle yakından ilişkilidir (Higdon ve Frei, 2003). Bazı fenolik bileşikler son derece yaygındır, diğerleri ise belirli bitki ailelerine özgüdür ve yalnızca belirli bitki kısımlarında belirli gelişim aşamalarında bulunur. Sebze ve meyvelerden zengin bir diyetle her yerde bulunan doğal antioksidanların büyük bir grubu olan bitki polifenollerini kesinlikle ciddi adaylardır. Sinamik asitler, benzoik asitler, proantosiyanidinler dahil flavonoidler, stilbenler, kumarinler, lignanlar ve ligninler dahil olmak üzere çok çeşitli bitki (poli)fenollerini mevcuttur (Yang ve ark., 2001). Antioksidan özelliklerine ek olarak polifenoller, hayvan modellerinde ve in vitro sistemlerde birçok ilginç etki gösterir; serbest radikalleri yakalar ve temizler, nitrik oksidi düzenler, lökosit immobilizasyonunu azaltır, apoptozu indükler, hücre çoğalmasını anjiyogenezini inhibe eder bununla birlikte fitoöstrojenik aktivite sergilerler (Nijveldt ve ark., 2001). Bu verilerin, biyoyararlanımın metabolizmaya bağlı polifenollere maruz kalmanın düşük konsantrasyonlarda olması insan hastalıklarının sonuçlarıyla ilgili olup olmadığı sorusu hala devam etmektedir. Önemli bir olgu, polifenollerin emildikten sonra faz II metabolizmasına maruz kalması metoksilenmiş, glukuronidlenmiş ve sülfatlanmış bileşiklerin oluşmasıdır (Hollman ve Arts, 2000). Bu onların biyoaktivitesini büyük ölçüde etkileyebilir, ancak bugüne kadar sadece birkaç çalışma bunu incelemiştir. Ayrıca insan kolonunda bulunan bakteriler polifenollerini metabolize eder. Bu polifenol metabolitleri homovanilik asit gibi çeşitli fenolik asitleri içerir (Olthof ve ark., 2003).

6.KAYNAKÇA

- Ahmed, H.H., El-Abhar, H.S., Hassanin, E.A.K, et al (2017). Punica granatum suppresses colon cancer through downregulation of Wnt/ β -Catenin in rat model. *Rev Bras Farmacogn*, 27, 627-635.
- Aljadi, A., Kamaruddin, M. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* 85, 513-518.
- Alzahrani, H.A., Boukraa, L., Bellik Y, et al. (2012). Evaluation of the Antioxidant Activity of Three Varieties of Honey from Different Botanical and Geographical Origins. *Glob J Health Sci*, 4, 192-196.
- American Cancer Society. (2009). A biotechnology company dedicated to cancer treatment [Internet] viewed on October 21, available From: www.cancervax.com/info/index.htm.
- Amiot, M.J., Aubert, S., Gonnet, M., Tacchini, M. (1989). Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie*, 20, 115-125.
- Anderson, I. (2006). Honey dressings in wound care. *Nursing Times*, 102, 40–42.
- Assim, M., Achoui, M., Mustafa. M.R., Mohd, M.A., Yusoff, K.M. (2010). Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutr Res*, 30, 650–659.
- Aviram, M., Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*, 37, 1304–1316.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/ fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, 533, 185-191.
- Biluca, F.C., Silva, B., Caon, T., et al. (2020). Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Res Int*, 1290-1756.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C., Piatti, E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* 97, 217-222.
- Bogdanov, S. (1984). Characterisation of antibacterial substances in honey. *Lebens Wixs Techno1ogy*, 17, 74-76.
- Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A., Ghezzi, P. (2002). Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci*, 99, 9745-9749.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47-95.
- Etievant, P., Schlich, P., Bertrand, A., Symonds, P., Bouvier, J.C. (1988). Varietal and geographic classification of French red wines in terms of pigments and flavonoid compounds. *J Sci Food Agric*, 42, 39-54.
- Ferrerres, F., Tomas-Barberán, F.A., Gil, M.I., TomásLorente, F. (1991). An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *J Sci Food Agric*, 56, 49-56.
- Gheldof, N., Engeseth, N.J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J AgricFood Chem*, 50, 3050–3055.
- Gorjanovic, S.Z., Alvarez-Suarez, J.M., Novakovi, C.M.M., Pastor, F.T., Pezo, L., Battino, M., Suznjevic, D.Z. 2013. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *J. Food Compos. Anal.* 30, 13-18.

- Hamza, A., Khalil, W., Ahmad, H. (2013). Possible therapeutic mechanisms of turmeric against colo-rectal cancer induced by N-methylnitrosourea in experimental models. *J Med Plant Res*, 7, 1940-1950.
- Higdon, J.V., Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43, 89 –143.
- Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Scraufstatter, I.U., Cochrane, C.G., Kunz, S., & Vosbeck, K. (1995). Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic anti-biotic: implications for host defense. *Free Radical Biology & Medicine*, 19, 31–37.
- Hussein, S.Z., Yusoff, K.M., Makpol, S., Yusof, Y.A.M., 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey. *Molecules*, 16, 6378-6395.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80, 1081–93.
- Jisha, N., Vysakh, A., Vijeesh, V. (2020). Methanolic Extract of *Muntingia Calabura* L. Mitigates 1,2-Dimethyl Hydrazine Induced Colon Carcinogenesis in Wistar Rats. *Nutr Cancer*, 25, 1-13.
- Lusby, P.E., Coombes, A., & Wilkinson, J.M. (2002). Honey: a potent agent for wound healing? *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, 29, 295–300.
- Mabrouk, G.M., Moselhy, S.S., Zohny, S.F. (2002). Inhibition of methylnitrosourea (MNU) induced oxidative stress and carcinogenesis by orally administered bee honey and *Nigella* grains in Sprague Dawely rats. *J Exp Clin Cancer Res*, 21, 341-346.
- McIntosh, C.D., Thomson, C.E. (2006). Honey dressing versus paraffintulle gras following toenail surgery. *Journal of Wound Care*, 15, 133–136.
- Molan, P.C. (2001a). Honey as a topical antibacterial agent for the treatment of infected wounds. *World Wide Wounds* Available at: <http://www.worldwidewounds.com/2001/november/molan/honey-as-topical-agent.html>
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74, 418 –25.
- Usta, A., Dede, S., Çetin, S. (2018). Deneysel diyabetli ratlarda timokinon uygulanmasının doku total oksidan ve antioksidan durumuna etkisi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 13, 84-91.
- TGK. (2020). Türk Gıda Kodeksi: Bal Tebliği. Resmi Gazete, 22 Nisan 2020- 31107. Tebliğ No: 2020/7. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm>.
- Terman, J.R., Mao, T., Pasterkamp, R.J., Yu, H.H., Kolodkin, A.L. (2002). MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell*, 109, 887-900.
- Tomris-Barberan, F.A., Tomis-Lorente, F., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C. (1989). Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee-pollen. *J Sci Food Agric*, 47, 337-340.
- Tomas-Lorente, F., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., Navarro, G. (1989). Analisis por HPLC de polifenoles en algunos vinos tintos españoles. *Rev Ayroquim Tecnol Aliment*, 29, 399-406.
- Tomás-Barberán, F.A., Blázquez, M.A., GarcíaViguera, C., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F. (1992). A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoids analysis. *Phytochem Anal* 3, 178-181.
- Tulloch, A.P., Hoffman, L.L. (1972). Canadian Beeswax: analytical values and composition of hydrocarbon, free acids and long chain esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 49, 696–699. (doi:10. 1007/BF02609202)
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S., Velioglu, Y.S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.* 95, 653-657.

- Rahman, I., Adcock, I. (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *European Respiratory Journal*, 28(1), 219-242.
- Regert, M., Colinart, S., Degrand, L., Decavallas, O. (2001). Chemical alteration and use of beeswax through time: accelerated aging tests and analysis of archaeological samples from various environmental contexts. *Archaeometry* 43, 549–569. (doi:10.1111/1475-4754.00036).
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., Segal, A.W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K_p flux. *Nature*, 416, 291-297.
- Rocha, L.D., Monteiro, M.C., Anderson, J.T. (2012). Anticancer properties of hydroxycinnamic acids-A Review. *Cancer and clinical oncology*, 1, 1927–4866.
- Rouseff, R.L., Martin, S.F., Youtsey, C. (1987). Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in Citrus. *J Agric Food Chem.* 35, 1027-1030.
- Rouseff, R.L. (1988). Liquid chromatographic determination of naringin and neohesperidin as a detector of grapefruit juice in orange juice. *J Assoc Offic Anal Chem.* 71, 798-802.
- Sabatier, S., Amiot, M.J., Aubert, S., Tacchini, M., Gonnet, M. (1989). Importance des flavonoïdes dans les miels de tournesol. *Bid Tech Apic*, 64, 171—178.
- Stephen-Haynes, J. (2004). Evaluation of a honey-impregnated tulle dressing in primary care. *British Journal of Community Nursing Supplement*, 9, 21–27.
- Schumacher, H.H. (2004). Use of medical honey in patients with chronic venous leg ulcers after split-skin grafting. *Journal of Wound Care* 1. 3, 451–452.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649- 662.
- Olthoff, M.R., Hollman, P.C.H., Buijsman, M.N.C.P. Amelsvoort, J.M.M., Katan, M.B. (2003). Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr.* 133, 1806–14.
- Villanueva, V.R., Barbier, M., Gonnet, M., Lavie, P. (1970). Les flavonoïdes de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bactériostatique: la pinocembrine (dihydroxy-5,7- flavanone). *Ann Inst Pasteur*, 118, 84-87.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 21, 381– 406.
- Wang, J., Li, Q.X. (2011). Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Adv Food Nutr Res*, 62, 89–137.

BÖLÜM 10

KANSERLE MÜCADELEDE SÜLFORAFAN

Arş. Gör. Dilek CANLAR AKAR
Prof. Dr. Funda KIRAL

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051762>

¹ Dilek CANLAR AKAR Dokuz Eylül Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İzmir, Türkiye, dilek.canlar@deu.edu.tr, ORCID ID 0000-0002-4981-8968

¹ Prof. Dr. Funda KIRAL Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Aydın, Türkiye, fkargin@adu.edu.tr, ORCID ID 0000-0001-9348-8401

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EGFR:Epidermal büyüme faktörü

ER: Östrojen reseptörü

GLC:Glukozinolat

GSH:Glutatyon

GI:Gastrointestinal sistem

HER2: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2

IC₅₀: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu

ITC:Izotiyosiyanat

MPP: 1-metil-4-fenil piridin

MTS: (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum)

NF-E2: Nükleer eritroid faktör 2

Nrf2: Nükleer eritroid faktör 2 ilişkili faktör 2

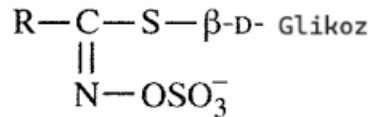
PBMCs:Periferel kan mononükleer hücreleri

PR: Progesteron reseptörler

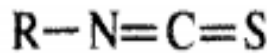
SFN:Sülforafan

1.GİRİŞ

Sülforafan (4-metilsülfolilbütıl izotiyosiyanat- SFN) ilk olarak Y. Zhang, Talalay, Cho ve Posner, (1992), tarafından brokoliden izole edilen ve kansere karşı koruyucu etkileri gösterilen bir izotiyosiyanattır (ITC) (Y. Zhang, Kensler, Cho, Posner ve Talalay, 1994). 100'den fazla sentetik analogla yapılan bir çalışmada sitoprotektif (Faz 2) enzimleri SFN'den daha güçlü bir şekilde indükleyen başka bir madde bulunamamıştır (Posner, Cho, Green, Zhang ve Talalay, 1994). Sülforafan brokoli, karnabahar, lahana, kara lahana gibi krusifer (turpgiller) grubu bitkilerden elde edilen bir fitokimyasaldır. Sülforafanın biyolojik prekürsörü olan glukorafaninin (4-metilsülfolilbütıl glukozinolat) brokoli köklerinde bol miktarda bulunduğu ve hayvan karsinogenik modellerinde aktif olduğu gösterilmiştir (Jed W. Fahey, Zhang ve Talalay, 1997). Brokoli filizi 100 gr'da 1153 mg sülforafan içeriği ile en yüksek sülforafan içeriğine sahipken, olgun brokoli 100 gr'da 44-171 mg kuru ağırlığa sahiptir (Nakagawa ve ark., 2006). İzotiyosinatlar bir alkil, alkenil, tioalkil, tioalkenil, aril, arilalkil ya da indonil parçası içeren, aglikanlı β-tioglokozit N-hidroksisülfat olan glukozinolatların (GLC), mirosidaz (thioglukositolglukohidrolaz) enzimi tarafından hidrolize edilmesiyle oluşurlar (Şekil 1) (Rosa, Heaney, Fenwick ve Portas, 2010; Shapiro, Fahey, Wade, Stephenson ve Talalay, 1998).



Şekil 1. GLC genel yapısı (Rosa ve ark., 1997).



Şekil 2.ITC yapısı (Rosa ve ark., 1997).

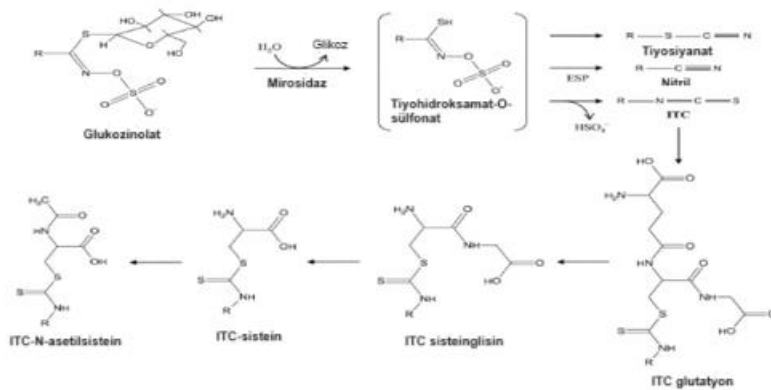
Sülforafanın kanser gelişiminin birçok basamağını etkilediği in vitro ve vivo çalışmalarda rapor edilmiştir. SFN karsinojenik sürecin erken basamaklarını modüle edebilir ya da apoptozis, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez gibi gelişim ve ilerleme fazlarını da içeren daha spesifik hücre olaylarını etkileyebilir (Fimognari ve Hrelia, 2007).

2.Glukozinolatların Sınıflandırılması

Glukozinolatlar yapısal benzerlikleri temel alınarak sınıflandırılır. En kapsamlı olarak çalışılan alifatik, ω -metiltioalkil, aromatik ve heterosiklik GLC'lerdir. Birçok GLC düz ya da dallı karbon zinciri içerir. Bu bileşiklerin çoğu çift bağlar, hidroksil, karbonil ya da sülfür bağları içerir. Bilinen 120'den fazla GLC türü vardır (J. W. Fahey, Zalcmann ve Talalay, 2001)

3.Glukozinolatların Yıkımlanması ve Dağılımı

Izotiyosiyanatlar enzimatik hidroliz yoluyla biyolojik prekürsör olan GLC'lerden doğal olarak oluşurlar. Bitki hücresindeki GLC'lerden fiziksel olarak ayrılmış endojen bir bitki enzimi olan mirosinaz doğrama ya da çiğneme gibi etkilerde salınır, böylece ITC'leri ve nitrilleri içeren çeşitli ürünlere hidrolize edilmiş olur (Matusheski ve Jeffery, 2001). Buna ek olarak gıdayı hazırlama sırasında ısı etkisiyle mirosinaz enzimi denatüre olursa GLC'ler bağırsak mikroflorası tarafından ITC'lere yıkımlanabilir. Bununla birlikte bağırsak mikroflora hidrolizinin insanlarda oldukça değişken ve etkisiz olduğu rapor edilmiştir (Clarke, Hsu, Riedl, ve ark., 2011; Conaway ve ark., 2000; Egner ve ark., 2011; Vermeulen, Klöpping-Ketelaars, Van Den Berg ve Vaes, 2008). Glukozinolatlar ITC'lere dönüşüm sonrası merkaturik asit yolağı ile metabolize edilirler. ITC önce glutatyona, bunu takiben sırasıyla ITC-sisteinglisin, ITC-sistein ve ITC-N-asetilsistein'e konjuge olur (Şekil 3). Farelerde yapılan bir çalışmada ITC-SFN'nin konsantrasyonunun ve metabolik konjugatlarının en yüksek olduğu dokuların ince bağırsak, prostat ve böbrek olduğu tespit edilmiştir (Bricker ve ark., 2014; Clarke, Hsu, Williams, ve ark., 2011).



Şekil 3. GLC metabolizması (Bricker ve ark., 2014).

4.Sülforafanın Kansere Üzerindeki Etki Mekanizması

Sülforafanın antikanser aktivitelerinin altında yatan mekanizmalar ile ilgili çalışmalar, bu bileşiğin tümör hücre döngüsü, apoptoz ve anjiyogenez üzerinde düzenleyici etkileri olduğunu, ilgili sinyal yollarının ve genlerinin modülasyonuna aracılık ettiğini göstermektedir. Hücre döngüsü analizleri, SFN'nin siklin B1 ve siklin D1 genlerinin aşağı regülasyonu ile ilişkili olan tümör proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Cheng, Tsai ve Hsu, 2016; Zuryń ve ark., 2016). Sülforafanlar karsinojenlerin etkilerini yok eden, değiştiren

ya da azaltan hücre içindeki çeşitli yolları hedef alır. Faz 1 enzimlerini metabolize ederek ilk kemoprevensiyonu sağlarlar (Langouët ve ark., 2000). SFN apoptozu indükleyerek kansere karşı koruyuculukta rol oynamaktadır (Myzak, Dashwood, Orner, Ho ve Dashwood, 2006; Shankar, Ganapathy ve Srivastava, 2008). Sülforafan proapoptotik protein Bax'ın ekspresyonunu artırarak ve antiapoptotik protein Bcl-x'in ekspresyonunu azaltarak kanser hücrelerinin apoptozisini de indükler (S. H. Kim, Park ve Moon, 2017). Oksidatif stresin DNA hasarı, mutasyonu ve inflamasyonunu indükleyen karsinojenik etkilere neden olduğu bilinmektedir. Nükleer eritroid faktör 2 (NF-E2-) ilişkili faktör 2 (Nrf2) antioksidatif stres cevabında önemli bir transkripsiyonel faktördür ve antikarsinojenik aktiviteleri olan sitoprotektif genlerin ekspresyonunu indükler. SFN'nin ise Nrf2'nin güçlü bir aktivatörü olduğu rapor edilmektedir (Johnson ve ark., 2017; Kensler ve ark., 2013; Liu ve ark., 2015; Narendhirakannan ve Hannah, 2013).

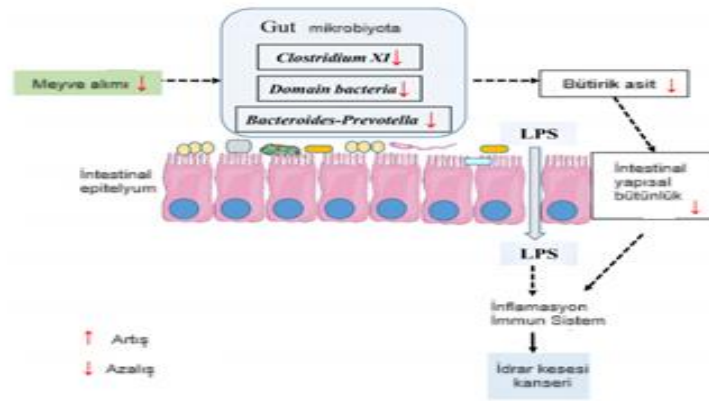
4.1 Sülforafanın Meme Kanseri Üzerine Etkileri

Meme kanseri Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılı verilerine göre 2,3 milyon vaka sayısı ile en yaygın ve kansere bağlı ölümler arasında beşinci sırada yer alır. 2,3 milyon vakanın yaklaşık %45'i çok yüksek insani gelişme indeksine sahip ülkelerde görülürken bu oran düşük insani gelişme indeksine sahip ülkelerde yaklaşık %5'tir. Bununla birlikte düşük insani gelişme indeksine sahip ülkelerde ölüm oranı yaklaşık %50 iken çok yüksek insani gelişme indeksine sahip ülkelerde bu oran yaklaşık %20'dir. Düşük insani gelişme indeksine sahip ülkelerde oranın bu kadar yüksek olmasının nedeni hastalık tanısının vaktinde koyulamamasıdır (The International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2020). Meme kanseri prognozu, bireysel tedaviye verilen cevap, doğal seyrine, klinik risk faktörlerine ve farklı biyolojik davranışlarına göre; luminal A, luminal B, HER2-pozitif luminal B, üçlü negatif ve non-luminal HER2 pozitif olmak üzere beş farklı alt tip içeren heterojen bir kanserdir (J. Li, Chen, Su ve Zeng, 2015). Sınıflandırmada dört belirteç değerlendirilir. Bunlar östrojen reseptörleri (ER), progesteron reseptörleri (PR), insan epidermal büyüme faktörü-2 (HER-2) ve hücre proliferasyonunun bir belirteci olan Ki-67'dir (Goldhirsch ve ark., 2011). İnsan meme kanseri hücre dizisi olan SUM159 ve MCF7'de SFN'nin anti-proliferatif etkileri hücrelere 48 saat boyunca artan konsantrasyonlarda sülforafan uygulanarak değerlendirildiğinde sülforafan konsantrasyonu arttıkça hücrelerin hayatta kalma oranının azaldığı gözlemlenmiştir ve bu oran SUM159 için yaklaşık olarak 10 µM ve MCF7 için 16 µM olarak ölçülmüştür (Y. Li ve ark., 2010). Pledge-Tracy, Sobolewski ve Davidson (2007), MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 ve T47D meme kanseri hücre hatlarında sülforafanın hücre büyümesi üzerinde etkilerini incelemişlerdir. Bu hücre hatları çeşitli meme kanseri fenotiplerinin temsilcisi oldukları için seçilmiştir. Meme kanseri tedavisinde en önemli hedeflerden biri olan ER, MCF-7 ve T47D hücrelerinde eksprese edilirken epigenetik baskılama nedeniyle MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatları ER ekspresyonundan yoksundur. Meme kanseri gelişmesi ve tedavisinde diğer iki anahtar protein olan epidermal büyüme faktörü (EGFR) ve insan HER-2'nin ekspresyonu ise bu hücre hatları arasında çeşitlilik gösterir. HER-2, ER-negatif hücre hatları MDA-MB-231 ve MDA-MB-468'de aşırı eksprese edilirken, ER-pozitif hücre hatları olan MCF-7 ve T47D'de yüksek seviyelerde eksprese edilir. Hücreler 72 saat süreyle farklı dozlarda (5, 15, 25 µM) SFN'ye maruz bırakılmış ve farklı hücre hatlarında doza bağımlı olarak hücrelerin üreme oranlarında azalma gözlenmiştir. Üçlü negatif meme kanseri ER, PR ve HER2 ekspresyonundan yoksun olan oldukça agresif, zayıf prognozlu ve meme kanserleri arasında yüksek ölüm oranına sahip bir kanser türüdür (J. Zhang ve ark., 2013). Castro ve ark., (2019), in vitro çalışmalar için insan üçlü negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-Luc-D3H1 ve fare üçlü meme kanseri hattı olan JygMC(A) ve in vivo çalışmalar için 6-9 haftalık dişi Balb/C çıplak farelerini kullanarak SFN'nin etkilerini incelemişlerdir. Hücre hatlarına 48 saat boyunca artan konsantrasyonlarda SFN (0-20 µM) uygulamışlardır. MDA-MB-Luc-D3H1 hücre hattı için 15 µM ve JygMC(A) hücre hattı için 20 µM SFN'nin hücre

proliferasyonu üzerinde baskılayıcı etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Meme yağ dokusu içerisine MDA-MB-231-Luc-D3H1 hücrelerinden nakledilen farelere 50 mg/kg SFN uygulanmıştır. İlk gruba tümör hücresi uygulamasından önce 2 hafta boyunca, ikinci gruba ise tümör hücreleri ile eş zamanlı olarak SFN uygulanmıştır. SFN tedavisine hücre enjeksiyonundan sonra 3 hafta daha devam edilmiştir. İlk grupta tümör hücrelerinin uygulanmasından sonraki 31. günde SFN'nin etkilerinin maksimuma ulaştığı görülmüştür. Kontrol tümör grupları ile karşılaştırıldığında ilk grupta tümör hücre hacminde %29'luk bir azalma gözlenirken, bu durum ikinci grupta ilk gruba göre %50 daha azdır. SFN tüketiminin kanser oluşumundan önce başlanmasının kanser hücrelerinin hacmini azalmasında daha etkili olduğunu söylemek mümkündür.

4.2 Sülfurafanın İdrar Kesesi Kanseri Üzerine Etkileri

İdrar kesesi kanseri tüm kanser türleri arasında en yaygın 10. kanser türüdür ("Cancer Today", 2020). Everolimus meme kanseri, ilerlemiş böbrek kanseri, pankreatik nöroendokrin tümörler ve subependimal dev hücreli astrositoma için ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan tek mTOR inhibitörüdür. Diğer antineoplastik tedavilerde olduğu gibi uzun süreli everolimus tedavisinde de direnç oluşmaktadır (Tian, Li ve Zhang, 2019). Justin ve ark., (2020) mTOR inhibitörü everolimusla birlikte uzun ve kısa vadede SFN'nin idrar kesesi kanseri hücre hatları olan RT112, UMUC3 ve TCCSUP üzerindeki etkilerini incelemiştir. Akut everolimus uygulamasında RT112 hücrelerinde motilite azalırken, kronik everolimus uygulamalarında ise tam tersi etki görülmüştür. TCCSUP hücre hattında da aynı etki gözlenirken, UMUC3 hücre hattında kronik ve akut everolimus uygulamalarının her ikisinde de direnç gözlemlenmemiştir. SFN'nin ise her üç hücre hattında da tek başına kemotaksiyi bloke ettiği görülmüştür. Everolimus-SFN kombinasyonunun RT112 ve TCCSUP hücre hatlarında kemotaksik artışı baskılayarak everolimusun kronik uygulamalarında görülen istenmeyen artışı önlediği ve kombinasyonun UMUC3 hücrelerinde everolimusun tek başına gösterdiğinden daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Gastrointestinal sistem (GI) yaklaşık 10^{14} kadar bakteri, çok sayıda arke, ökaryot ve virüslerden oluşan bir mikrobiyotaya sahiptir (Sekirov, Russell, Caetano M Antunes ve Finlay, 2010). İnsan sağlığında GI mikrobiyota özellikle inflamasyon ve immün yanıt gibi fizyolojik süreçlerde bölgesel ve genel mekanizmalarda rol oynayarak konakçı sistemini dengede tutmaktır (Xue ve ark., 2018). He ve ark., (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ise idrar kesesi kanseri ve bağırsak mikrobiyotası arasında bir mekanizma belirlenmiştir. N-bütül-N-(4-hidroksibütül)-nitrozamin ile indüklenen idrar kesesi kanserine sahip erkek C57BL/6 fareler ile yapılan çalışmada, SFN'nin bağırsak bariyerinin fizyolojik yıkımını onardığı, bağırsak mikroflorasını normalleştirdiği ve bununla birlikte immün tepkiyi ve yangıyı azaltarak kimyasal olarak indüklenmiş idrar kesesi kanserine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (He ve ark., 2018).



Şekil 4. Bağırsak mikrobiyotası ve idrar kesesi kanseri arasındaki ilişki (He ve ark., 2020)

4.3 Sülforafanın Gastrointestinal Sistem Kanseri Üzerine Etkileri

Mide kanseri yaklaşık bir milyon vaka ile tüm dünyada tanısı koyulan kanserler arasında en yaygın görülen beşinci kanser türüdür. Sıklıkla ileri evrede teşhis edilmesi nedeniyle mide kanserine bağlı ölüm oranı yüksektir ve yaklaşık 770 000 ölüm vakası ile kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sırada yer alır (Bray ve ark., 2018; The International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2020). (Kiani ve ark., 2018), brokoli köklerinden elde edilen farklı konsantrasyonlardaki saflaştırılmış SFN'nin (31,25, 62,5, 125 ve 250 µg/ml) iki mide kanser hücre hattı olan AGS ve MKN45 ve normal hücre hattı olan HF2FF üzerindeki etkilerini incelemiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında AGS ve MKN45 hücrelerinde 112 ve 125 µg/ml yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) değerinde doza bağımlı anti-proliferatif etkiler gözlemlenmiştir. Ayrıca 48 saatlik inkübasyon sonrasında AGS ve MKN45 hücrelerinde apoptotik hücreler gözlenirken, HF2FF hücrelerinde gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte farklı SFN konsantrasyonlarında AGS ve MKN45 mide kanseri hücre hatlarında CDX1, CDX2, miR-9 ve miR-326 ekspresyonunda önemli derecede değişiklikler gözlemlenmiştir. Sülforafanın mide kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemek için insan mide kanseri AGS hücre hattı ile yapılan başka bir çalışmada ise 48 saatlik uygulamada 2,5 µM'dan düşük dozlardaki SFN'nin hücre proliferasyonu üzerinde önemli derecede azalmaya neden olmadığı, bununla birlikte 5-20 µM arasındaki SFN konsantrasyonlarının doza bağımlı olarak AGS hücre proliferasyonu üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 20 µM konsantrasyondaki SFN'nin %60'a kadar inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir (Choi, 2018). Kolon, rektum ve anüsten köken alan kanserler kolorektal kanser olarak sınıflandırılır. Kolorektal kanser dünyadaki en yaygın üçüncü kanser türüdür. Kolon kanserinin görülme oranı rektum ve anüs kanserine oranla daha yüksektir. Avrupa'da her yıl yaklaşık olarak 500 bin yeni kolorektal kanser teşhisi koyulurken bu sayı Asya'da 1 milyon kadardır (The International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2020). HT29 ve RKO insan kolon kanseri hücre hatları ve periferik kan mononükleer hücreleri (PBMCs) ile yapılan bir çalışmada SFN'nin 1,25 ve 2,5 µM konsantrasyonda hücre hatları ve PBMCs üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte 5 µM SFN ilavesinin HT29'u etkilemediği, ancak RKO ve PBMCs üzerinde %21-24 oranında azalma sağladığı gözlemlenmiştir. SFN'nin daha yüksek konsantrasyonlarında ise doza bağımlı olarak PBMCs, HT29 ve RKO hücre proliferasyonunda azalma sağladığı gözlemlenmiştir (Bessler ve Djaldetti, 2018). Gasparello ve ark., (2020) tarafından SFN'nin kolon kanseri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada insan kolon kanseri hücre hattı olan HT29'a üç gün boyunca artan konsantrasyonlarda SFN (7,5, 15, 30 ve 60 µM) uygulanmıştır ve apoptozisin artmasına bağlı olarak hücre proliferasyonunun inhibe olduğu tespit edilmiştir. Ağız kanseri orofarinks, ağız boşluğunun tüm bölgeleri, dudak ve ağzın arka kısmındaki boğaz bölgesindeki kanserleri içerir. En yaygın on altıncı malignitedir ("Oral cancer", 2020; The International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2020). Ağız kanseri teşhisinin gecikmesi, zayıf prognoz, hastalık için spesifik biyobelirteçlerin olmaması ve pahalı terapötik alternatifleriyle dünyadaki en yaygın on kanser türünden biridir (Rivera, 2015). Oral kanser hücre hatları SCC-9 ve SCC-14'e SFN uygulanması sonrasında yaşama kabiliyetini ölçen bir çalışmada hücrelere 24-48 saat boyunca değişik konsantrasyonlarda SFN (0, 2,5, 5, ve 10 µM) uygulanmıştır. 48 saatlik tedavi sonrasında yüksek doz SFN uygulamasının SCC-9 hücrelerinin canlılığında yaklaşık %18 ve SCC-14 hücrelerinin canlılığında yaklaşık %15 oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2018). Bauman ve ark., (2016), SFN'nin kanserojen indüklü ağız kanserine karşı olan kemopreventif etkilerini araştırmak için iki grup C57BL/6J farelerini 24 hafta boyunca gözlemlemiştir. 4NQO ile tedavi edilen farelerin tedavisine SFN eklendiğinde dil tümörlerinin sayısının önemli derecede azaldığını tespit etmişlerdir.

4.4 Sülforafanın Böbrek Kanseri Üzerine Etkileri

2020 yılı verilerine göre kanser hastalarının yaklaşık 430 bini böbrek kanseridir ve vakaların yaklaşık 180 bini ölümlü sonuçlanmıştır. Erkeklerde mortalite oranı kadınlara kıyasla yaklaşık %55 daha fazladır (The International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2020). Everolimus ve sunitinib gibi renal hücre karsinom tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı birçok hasta direnç geliştirmektedir. Bu nedenle çeşitli araştırmalarda ilaçların etkinliğinin artırılmasının mümkün olup olmayacağı değerlendirilmektedir. Renal hücre karsinom hatları olan Caki-1, KTCTL-26 ve A498 üzerinde SFN ve everolimusun hücre döngüsü ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri everolimusa duyarlı ve everolimusa dirençli olan hücre hatlarında incelemiştir. Everolimusa duyarlı Caki-1, KTCTL-26 ve A498 hücre hatlarında, everolimus uygulaması doza bağlı olarak hücre sayısında kayda değer bir azalmaya neden olmuştur. SFN uygulaması ise everolimusa duyarlı her üç hücre hattında hücre büyümesini doza bağlı olarak azaltmıştır. Everolimusa dirençli hücre hatları ile everolimusa duyarlı hücrelerle karşılaştırıldığında SFN uygulaması everolimusa dirençli hücre hatlarında daha düşük bir azalma sağlamıştır. Everolimus ve SFN kombinasyonu uygulandığında kısa dönem (24-72 saat) ve uzun dönem (8 hafta)'de farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte renal hücre karsinoma tedavisindeki başarımın artırılmasında yardımcı olabileceği öngörülmüştür (Juengel ve ark., 2016). Caki-1, KTCTL-26 ve A498 hücre hatları üzerinde SFN'nin bireysel etkileri kısa dönem (24-72 saat) ve uzun dönem (8 hafta) olmak üzere değerlendirildiğinde hem kısa hem de uzun dönem SFN'ye maruz kalan her üç hücre hattında da hücre sayısı ve proliferasyonu kayda değer şekilde azalmıştır. Yapılan incelemede uzun dönem SFN uygulanmasının A498 hücreleri üzerinde daha etkili olduğu ve sürenin Caki-1 ve KTCTL-26 üzerinde kayda değer bir öneme sahip olmadığı görülmüştür (Rutz ve ark., 2018). RCC hücre hatları olan A498, Caki1, KTCTL26 ve 786O sunitinib direnci oluşumundan önce kısa süreli ve ST direnci oluşumu sırasında uzun süreli olarak sunitinib, SFN veya her ikisine beraber maruz bırakıldığında sunitinib ile kısa süreli tedavi A498, Caki1 ve 786O hücre hatlarında SFN ve SFN+sunitinib kullanımı ise tüm hücre hatlarında hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. Sunitinib uzun süreli kullanımda A498, KTCTL26 ve 786O hücre hatlarında büyüme baskılayıcı özelliğini kaybederken SFN tüm hücre hatlarında büyümeyi güçlü bir şekilde baskılamıştır. 786O hücre hattında ise SFN+sunitinib kombinasyonu daha etkili olduğu gözlenmiştir (Tsaur ve ark., 2022). Farklı hücre hatlarında antikanser ajanlara karşı geliştirilen direncin kısa ve uzun süreli etkileri değerlendirildiğinde ilaçlarının etkinliğinin artırılmasında yararlı olabileceği görülmüştür. Bununla birlikte bulguların ileri araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

4.5 Sülforafanın Yumurtalık Kanseri Üzerindeki Etkileri

Yumurtalık kanseri rahim ağzı ve rahim kanserinden sonra en yaygın üçüncü jinekolojik kanser türüdür. 2020 yılı verilerine göre jinekolojik kanserler arasında yaklaşık %66'lık oranı ile en ölümcül kanserdir (Bray ve ark., 2018; The International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2020). Yumurtalık kanseri epitelyal ve epitelyal olmayan olmak üzere iki gruba ayrılabilir. En sık görülen yumurtalık kanseri epitelyal yumurtalık kanseri olup, epitelyal olmayan yumurtalık kanseri yalnızca %10 oranında görülür. Epitelyal yumurtalık kanserinin %97'si müsinöz, %3'ü ise müsinöz olmayan tiptedir (Momenimovahed, Tiznobaik, Taheri ve Salehiniya, 2019). S. C. Kim, Choi ve Kwon, (2017), insan yumurtalık kanseri hücre hatları olan OVCAR3, OVCAR4, OVCAR5, SKOV3 ve insan yumurtalık fibroblastları olan IHFNO-303 ve IHFOT-208 üzerinde SFN'nin artan konsantrasyonlardaki etkileri incelenmişlerdir. Kanser hücre hatları üzerine 0-100 µM dozda SFN uygulanmışlardır. Tüm yumurtalık kanseri hücre hatlarında 72 saatlik uygulama sonrasında hücre büyümesinin etkili olarak azaldığı gözlemlenmiştir. OVCAR3, OVCAR4 ve OVCAR5 hücre hatlarında IC₅₀ oranı 6,2-6,3 µM ve SKOV3 hücre hattında 3,6 µM olarak ölçülmüştür. En etkili doz ise 12,5 µM olarak tespit edilmiştir. SFN'nin kanser olmayan hücreler

üzerindeki etkilerine bakıldığında fibroblastların gelişimini de inhibe ettiği ancak bu hücreler üzerinde daha az etkili olduğu görülmüştür. 5 µM konsantrasyonda bu oran yaklaşık olarak %10 ve 10 µM konsantrasyonda ise bu oran yaklaşık olarak %30'dur. 25 µM konsantrasyonda ise fibroblastlar üzerindeki inhibisyon oranı kayda değer şekilde yüksek olarak bulunmuştur. İnsan yumurtalık kanseri hücre hatları A2780 ve OVCAR'a farklı konsantrasyonlarda (0-20 µM) SFN uygulandığında 48 ve 72. saatlerde A2780 ve OVCAR hücre hatlarında artan SFN konsantrasyonunda yaşayan hücre sayısının önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (Kan, Wang ve Sun, 2018)

4.6 Sülforafanın Akciğer Kanseri Üzerine Etkisi

Akciğer kanseri, kanser vakaları arasında en sık teşhis edilen ikinci (tüm vakaların %11,6'sı) kanser türüdür. Erkek bireyler arasında kanser ilişkili ölümler arasında ilk sırada yer alırken, kadın bireyler arasında ise akciğer kanseri ilişkili meme kanserinden sonra ikinci sırada yer alır (The International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2020). İida ve ark., (2020), insan küçük hücreli akciğer kanser hücre hatları olan NCI-H69 (H69), NCI-H82 (H82), NCI-H69AR (H69AR) ve normal hücre hattı olan 16HBE14o-(16HBE) üzerinde SFN'nin etkilerini incelemişlerdir. H69 hücre hattında 48 saatte 10 µM'ın üzerindeki konsantrasyonlarda hücre büyümesini önemli derecede inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. H69, H69AR ve 16HBE hücre hatlarında 20 µM SFN konsantrasyonunun sitotoksik etkileri olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada sülforafanın küçük hücreli akciğer kanserinde, demire bağlı bir hücre ölümü türü olan ferroptoz yolu ile hücre ölümünü indükleyerek antikanser etkilerini gösterdiğini tespit etmişlerdir. Zuryń ve ark., (2016)'nın küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ile yaptığı çalışmada yaşayan hücre sayısında doza bağımlı bir azalma gözlemlenmiştir. Hücrelere 30, 60, 90 µM konsantrasyonda SFN uygulanmış ve yaşayan hücre oranında sırası ile %98,4, %88 ve %77,4 oranında azalma gözlemlenmiştir.

5. KAYNAKÇA

- Bauman, J. E., Zang, Y., Sen, M., Li, C., Wang, L., Egner, P. A., ... Johnson, D. E. (2016). Prevention of carcinogen-induced oral cancer by sulforaphane. *Cancer Prevention Research*, 9(7), 547–557.
- Bessler, H. ve Djaldetti, M. (2018). Broccoli and human health: immunomodulatory effect of sulforaphane in a model of colon cancer. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 69(8), 946–953.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. ve Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Bricker, G. V., Riedl, K. M., Ralston, R. A., Tober, K. L., Oberyszyn, T. M. ve Schwartz, S. J. (2014). Isothiocyanate Metabolism, Distribution, And Interconversion In Mice Following Consumption Of Thermally Processed Broccoli Sprouts Or Purified Sulforaphane. *Molecular nutrition & food research*, 58(10), 1991–2000.
- Cancer Today. (2020). <https://gco.iarc.fr/today/home> adresinden erişildi.
- Castro, N. P., Rangel, M. C., Merchant, A. S., MacKinnon, G., Cuttitta, F., Salomon, D. S. ve Kim, Y. S. (2019). Sulforaphane Suppresses the Growth of Triple-negative Breast Cancer Stem-like Cells In vitro and In vivo. *Cancer Prevention Research*, 12(3), 147–158.
- Chen, C. T., Hsieh, M. J., Hsieh, Y. H., Hsin, M. C., Chuang, Y. T., Yang, S. F., ... Lin, C. W. (2018). Sulforaphane suppresses oral cancer cell migration by regulating cathepsin S expression. *Oncotarget*, 9(25), 17564–17575.
- Cheng, Y. M., Tsai, C. C. ve Hsu, Y. C. (2016). Sulforaphane, a dietary isothiocyanate, induces G2/M arrest in cervical cancer cells through cyclinB1 downregulation and GADD45β/CDC2 association. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1–13.
- Choi, Y. H. (2018). ROS-mediated activation of AMPK plays a critical role in sulforaphane-induced apoptosis and mitotic arrest in AGS human gastric cancer cells. *Gen Physiol Biophys*, 37(2), 129–140.
- Clarke, J. D., Hsu, A., Riedl, K., Bella, D., Schwartz, S. J., Stevens, J. F. ve Ho, E. (2011). Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacological Research*, 64(5), 456–463.
- Clarke, J. D., Hsu, A., Williams, D. E., Dashwood, R. H., Stevens, J. F., Yamamoto, M. ve Ho, E. (2011). Metabolism and tissue distribution of sulforaphane in Nrf2 knockout and wild-type mice. *Pharmaceutical research*, 23(12), 3171–3179.
- Conaway, C. C., Getahun, S. M., Liebes, L. L., Pusateri, D. J., Topham, D. K. W., Botero-Omary, M. ve Chung, F. L. (2000). Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutrition and Cancer*, 38(2), 168–178.
- Egner, P. A., Chen, J. G., Wang, J. B., Wu, Y., Sun, Y., Lu, J. H., ... Kensler, W. (2011). Bioavailability of Sulforaphane from two broccoli sprout beverages: results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer Prevention Research*, 4(3), 384–395.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. ve Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5–51.
- Fahey, Jed W., Zhang, Y. ve Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10367–10372.
- Fimognari, C. ve Hrelia, P. (2007). Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 635(2–3), 90–104.

- Gasparello, J., Gambari, L., Papi, C., Rozzi, A., Manicardi, A., Corradini, R., ... Finotti, A. (2020). High Levels of Apoptosis Are Induced in the Human Colon Cancer HT-29 Cell Line by Co-Administration of Sulforaphane and a Peptide Nucleic Acid Targeting miR-15b-5p. *Nucleic Acid Therapeutics*, 30(3), 164–174.
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B. ve Senn, H. J. (2011). Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Annals of Oncology*, 22(8), 1736–1747.
- He, C., Huang, L., Lei, P., Liu, X., Li, B. ve Shan, Y. (2018). Sulforaphane Normalizes Intestinal Flora and Enhances Gut Barrier in Mice with BBN-Induced Bladder Cancer. *Molecular nutrition & food research*, 62(24).
- He, C., Li, B., Huang, L., Teng, C., Bao, Y., Ren, M. ve Shan, Y. (2020). Gut microbial composition changes in bladder cancer patients: A case-control study in Harbin, China. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 29(2), 395–403.
- Iida, Y., Okamoto-Katsuyama, M., Maruoka, S., Mizumura, K., Shimizu, T., Shikano, S., ... Gon, Y. (2020). Effective ferroptotic small-cell lung cancer cell death from SLC7A11 inhibition by sulforaphane. *Oncology Letters*, 21(1), 1–9.
- Johnson, G. S., Li, J., Beaver, L. M., Dashwood, W. M., Sun, D., Rajendran, P., ... Medicine, C. (2017). A functional pseudogene, NMRAL2P, is regulated by Nrf2 and serves as a coactivator of NQO1 in sulforaphane-treated colon cancer cells. *Molecular nutrition & food research*, 61(4).
- Juengel, E., Maxeiner, S., Rutz, J., Justin, S., Roos, F., Khoder, W., ... Blaheta, R. A. (2016). Sulforaphane inhibits proliferation and invasive activity of everolimus-resistant kidney cancer cells in vitro. *Oncotarget*, 7(51), 85208–85219.
- Justin, S., Rutz, J., Maxeiner, S., Chun, F. K. H., Juengel, E. ve Blaheta, R. A. (2020). Bladder cancer metastasis induced by chronic everolimus application can be counteracted by sulforaphane in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15).
- Kan, S. F., Wang, J. ve Sun, G. X. (2018). Sulforaphane regulates apoptosis- and proliferation-related signaling pathways and synergizes with cisplatin to suppress human Ovarian cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(5), 2447–2458.
- Kensler, T. W., Egner, P. A., Agyeman, A. S., Visvanathan, K., Groopman, J. D., Chen, J. G., ... Talalay, P. (2013). Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Topics in current chemistry*, 329, 163–177.
- Kiani, S., Akhavan-Niaki, H., Fattahi, S., Kavosian, S., Babaian Jelodar, N., Bagheri, N. ve Najafi Zarrini, H. (2018). Purified sulforaphane from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) leads to alterations of CDX1 and CDX2 expression and changes in miR-9 and miR-326 levels in human gastric cancer cells. *Gene*, 678(August), 115–123.
- Kim, S. C., Choi, B. ve Kwon, Y. (2017). Thiol-reducing agents prevent sulforaphane-induced growth inhibition in ovarian cancer cells. *Food and Nutrition Research*, 61(1).
- Kim, S. H., Park, H. J. ve Moon, D. O. (2017). Sulforaphane sensitizes human breast cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis by downregulating the NF- κ B signaling pathway. *Oncology Letters*.
- Langouët, S., Furge, L. L., Kerriguy, N., Nakamura, K., Guillouzo, A. ve Guengerich, F. P. (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,2-dithiole-3-thione, oltipraz and its derivatives, and sulforaphane. *Chemical Research in Toxicology*, 13(4), 245–252.
- Li, J., Chen, Z., Su, K. ve Zeng, J. (2015). Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7), 8500–

8505.

- Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., Sun, D. (2010). Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(9), 2580–2590.
- Liu, M., Yao, X. D., Li, W., Geng, J., Yan, Y., Che, J. P., ... Zheng, J. H. (2015). Nrf2 sensitizes prostate cancer cells to radiation via decreasing basal ROS levels. *BioFactors*, 41(1), 52–57.
- Matusheski, N. V. ve Jeffery, E. H. (2001). Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5743–5749.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S. ve Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*, 11, 287–299.
- Myzak, M. C., Dashwood, W. M., Orner, G. A., Ho, E. ve Dashwood, R. H. (2006). Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice. *FASEB Journal*, 20(3), 506–508.
- Nakagawa, K., Umeda, T., Higuchi, O., Tsuzuki, T., Suzuki, T. ve Miyazawa, T. (2006). Evaporative light-scattering analysis of sulforaphane in broccoli samples: Quality of broccoli products regarding sulforaphane contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2479–2483.
- Narendhirakannan, R. T. ve Hannah, M. A. C. (2013). Oxidative stress and skin cancer: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28(2), 110–115. doi:10.1007/s12291-012-0278-8
- Oral cancer. (2020). *NIH Publication*.
- Pledgie-Tracy, A., Sobolewski, M. D. ve Davidson, N. E. (2007). Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(3), 1013–1021.
- Posner, G. H., Cho, C. G., Green, J. V., Zhang, Y. ve Talalay, P. (1994). Design and Synthesis of Bifunctional Isothiocyanate Analogs of Sulforaphane: Correlation between Structure and Potency as Inducers of Anticarcinogenic Detoxication Enzymes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(1), 170–176.
- Rivera, C. (2015). Essentials of oral cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11884–11894.
- Rosa, E. A. S., Heaney, R. K., Fenwick, G. R. ve Portas, C. A. M. (2010). *Glucosinolates in Crop Plants. Horticultural Reviews* (C. 19).
- Rutz, J., Juengel, E., Euler, S., Maxeiner, S., Justin, S., Roos, F., ... Blaheta, R. A. (2018). Chronic sulforaphane application does not induce resistance in renal cell carcinoma cells. *Anticancer Research*, 38(11), 6201–6207.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Caetano M Antunes, L. ve Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904.
- Shankar, S., Ganapathy, S. ve Srivastava, R. K. (2008). Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6855–6866.
- Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K. ve Talalay, P. (1998). Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 7(12), 1091–1100.
- The International Agency for Research on Cancer World Health Organization. (2020). The Global Cancer Observatory - All cancers. *International Agency for Research on Cancer - WHO*. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> adresinden erişildi.

- Tian, T., Li, X. ve Zhang, J. (2019). mTOR signaling in cancer and mtor inhibitors in solid tumor targeting therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3).
- Tsaur, I., Thomas, A., Taskiran, E., Rutz, J., Chun, F. K. H., Haferkamp, A., ... Blaheta, R. A. (2022). Concomitant Use of Sulforaphane Enhances Antitumor Efficacy of Sunitinib in Renal Cell Carcinoma In Vitro. *Cancers*, 14(19).
- Vermeulen, M., Klöpping-Ketelaars, I. W. A. A., Van Den Berg, R. ve Vaes, W. H. J. (2008). Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10505–10509.
- Xue, M., Ji, X., Liang, H., Liu, Y., Wang, B., Sun, L. ve Li, W. (2018). The effect of fucoidan on intestinal flora and intestinal barrier function in rats with breast cancer. *Food and Function*, 9(2), 1214–1223.
- Zhang, J., Wang, Y., Yin, Q., Zhang, W., Zhang, T. ve Niu, Y. (2013). An associated classification of triple negative breast cancer: The risk of relapse and the response to chemotherapy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(7), 1380–1391.
- Zhang, Y., Kensler, T. W., Cho, C. G., Posner, G. H. ve Talalay, P. (1994). Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 3147–3150.
- Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. ve Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), 2399–2403.
- Zuryń, A., Litwiniec, A., Safiejko-Mrocza, B., Klimaszewska-Wisniewska, A., Gagat, M., Krajewski, A., ... Grzanka, D. (2016). The effect of sulforaphane on the cell cycle, apoptosis and expression of cyclin D1 and p21 in the A549 non-small cell lung cancer cell line. *International Journal of Oncology*, 48(6), 2521–2533.

BÖLÜM 11

AKT ve KANSER

Veteriner Hekim Bilgehan AKAR

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051766>

¹ Bilgehan AKAR Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Aydın, Türkiye, bilgehanakar@yahoo.com, ORCID ID 0000-0002-2734-6015

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-----------------------|---|
| 4E-BP1 | : 4E-bağlayıcı protein 1 |
| ACL | : ATP sitrat |
| AMP | : Adenozin mono fosfat |
| ADP | : Adenin difosfosfat |
| AKT | : Protein Kinaz B |
| p-AKT | : Fosforile AKT |
| AMPK | : AMP AKTive edici protein kinaz |
| ATP | : Adenozin trifosfat |
| BAD | : Bcl-2 antagonisti öldürücü hücre |
| Bcl-2 | : B hücre lenfoma 2 |
| Bcl-xL | : Ekstra büyük B hücreli lenfoma |
| cAMP | : Siklik adonezin monofosfat |
| CASP9 | : Caspaz-9 |
| CBP | : CREB bağlayıcı protein |
| CDK | : Siklin bağımlı kinaz |
| CREB | : Siklik AMP cevap elamanı bağlayıcı protein |
| DNA | : Deoksiribo nükleik asit |
| ERK1/2 | : Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 |
| JNK | : c-Jun N terminal kinaz |
| EGF | : Epidermal büyüme faktörü |
| eIF4E | : Ökaryotik translasyon başlama faktörü 4E |
| eNOS | : Endotelial nitrik oksit sentaz |
| ERK | : Ekstrasüllüler sinyal düzenlenmiş kinaz |
| FasL | : Fas ligandı |
| FOXO | : Çatal başlı kutu (Forkhead box) transkripsiyon faktörleri |
| GAP | : Guanin trifosfataz aktivasyon protein |
| GLUT | : Glikoz taşıyıcısı |
| GPCR | : G proteini ilişkili reseptör |
| GSK3 | : Glikojen sentaz kinaz 3 |
| GTP | : Guanin trifosfat |
| GTPaz | : Guanin Trifosfataz |
| HER2 | : İnsan epidermal büyüme fAKTörü 2 |
| IKK | : Nükleer faktör kappa-B kinaz inhibitör kinazı |
| IκB | : NF-κB inhibitörü |
| ILK | : İntegrin bağlantılı kinaz |
| INPP4B | : İnositol polifosfat 4 fosfataz tip 2 |
| eNOS | : Endotelial nitrik oksit |
| MAPK | : Mitojenle aktive edilmiş kinaz |
| m⁶A | : N ⁶ -metiladenosin |
| Mdm2 | : Fare çift dakika homologu 2 |
| mTORC | : Memeli hedef rapamisin kompleksi |
| NAD | : Nikotinamid Dinükleotid |
| NRAS | : RAS viral onkogen homologu |
| NF-κB | : Nükleer faktör κB |
| NSCLC | : Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri |

| | |
|---------------------------|---|
| p70S6K | : Ribozomal Protein S6 kinaz β -1 |
| PDK1 | : 3-Fosfoinositid bağımlı kinaz 1 |
| PH | : Plecstrin Homoloji |
| PHLPP | : PH alanı lösince zengin tekrar protein fosfatazları |
| PI3,4P₂ | : Fosfoinositol-3,4-difosfat |
| PI3K | : Fosfoinozitol-3-kinaz |
| PI4,5P₂ | : Fosfotidilinositol-4,5-difosfat |
| PIP₃ | : Fosfoinozitol 3,4,5-trifosfat |
| PRAS40 | : Prolinden zengin 40 kDa AKT substratı |
| PTEN | : Tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homoloğu |
| RCC | :Renal hücreli karsinom |
| Rheb | : Beyin zenginleştirilmiş Ras homoloğu |
| ROS | :Reaktif oksijen türleri |
| RTK | : Reseptör tirozin kinaz |
| Ser | : Serin |
| SHIP | : İnositol 5-fosfataz |
| STAT3 | : Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü |
| SREBP | : Sterol düzenleyici elaman bağlayıcı protein |
| TRAIL | : Tümör nekrozis faktör ilişkili apoptozis indükleyici ligand |
| Thr | : Treonin |

1.GİRİŞ

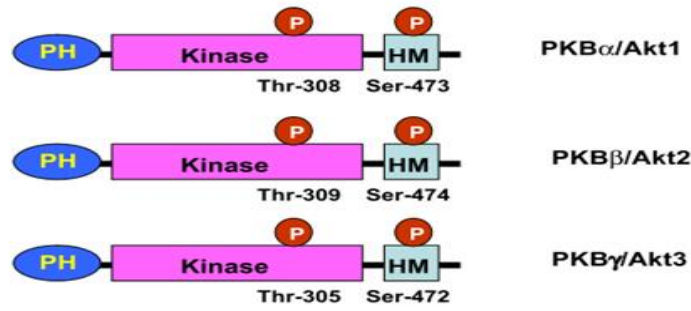
AKT, protein kinaz B olarak da bilinen bir serin/treonin kinazdır ve keşfi 35 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Staal, 1987). Keşfedildiği günden bu yana biyoloji ve tıbbın çeşitli alanlarında binlerce çalışmanın odağı olmuştur. AKT'nin yukarı akım ve aşağı akım sinyal ağları (GSK3, FOXO, mTORC1) dahil olmak üzere işlevsel repertuarını büyük ölçüde genişleten kilit birçok fonksiyona sahip, vücudumuzdaki neredeyse her hücreye yayılan karmaşık sinyal ağı hakkında birçok gelişme yaşanmıştır.¹ Fare ve insan genetik çalışmaları, AKT ağının neredeyse her organ sistemindeki fizyolojik rollerini ortaya koymuştur. AKT'nin düzensiz çalışmasının, gelişim ve aşırı büyüme sendromları, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci ve tip-2 diyabet, otoimmün hastalıklar ve nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarla sonuçlarının olduğu göz önüne alındığında, AKT'nin düzenlenmesi ve işlevlerinin anlaşılması son derece önemlidir (Hers ve ark., 2011). Ayrıca, AKT'yi seçici hedef alan küçük molekül inhibitörlerinin geliştirilmesinde de büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. AKT sinyal ağının moleküler bağlantılarının daha iyi anlaşılması, biyomedikal bilimlerin çoğu disiplinini etkileyen bir etki yapmaya devam etmektedir. AKT kinazlar; AKT1, AKT2 ve AKT3 izoformlarını içeren, hücre büyümesi, çoğalma, hayatta kalma, glukoz metabolizması, genomik stabilite ve anjiyogenezi düzenleyen sinyal yolunun önemli parçalarıdır (Altomare ve Testa 2005). AKT1, AKT2 ve AKT3, yapısal olarak benzer olan ancak dokuya özgü farklı özellikler sergileyebilen kinazlardır. AKT1 ve AKT2, pankreatik doku gibi birçok dokuda yoğun olarak bulunurken, AKT3 özellikle beyinde eksprese edilir ve dokusal dağılımı çok sınırlıdır (Manning ve Cantley 2007).

1.1 AKT Yapısı

Memelilerde, üç AKT geni AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) ve AKT3 (PKB γ) izoformlarını kodlar ve hepsi benzer yapı ve boyuta sahiptirler. AKT izoformları, N-terminusunda pleckstrin homolojisi (PH) alanı,

¹ Yukarı ve aşağı akış, birbiriyle ilişkili olarak olayın nerede gerçekleştiğini ayırt etmek için kullanılır. Örneğin A enziminin akış aşağısında olan bir şey, bu enzimin aktivasyonundan sonra olur.

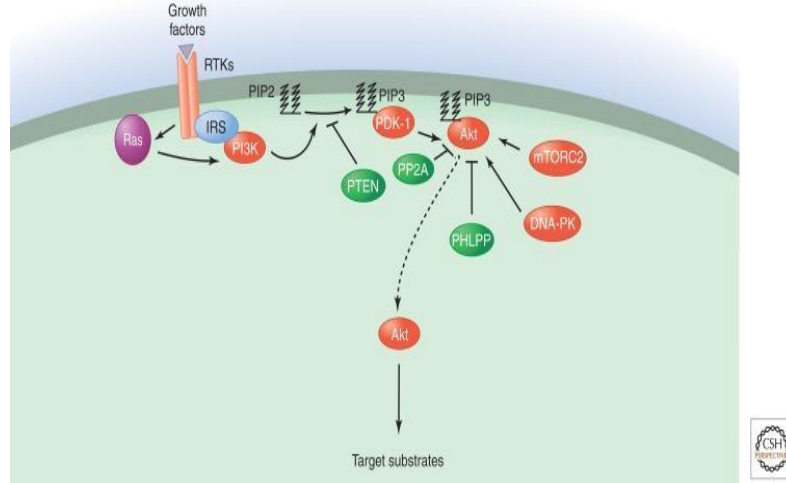
kinaz aktivitesine sahip merkezi bir kinaz alanı ve karboksil ucunda hidrofobik bir düzenleyici alan içerirler (Şekil 1) (Revathidevi ve Munirajan, 2019). PH bölgesi, fosfoinositol 3-kinaz (PI3K) biyokimyasal reaksiyonu sonucu üretilen fosfoinositol-3,4,5-fosfat (PIP₃) gibi membran lipid ürünleri ile etkileşime girer. Kinaz alanı molekülün ortasında bulunur ve diğer AGC kinazları ile yüksek benzerlik gösterir. Kinaz alanı üzerinde bulunan treonin kalıntısının fosforilasyonu enzimatik aktivasyonu için gereklidir. AKT izoformlarının tümü, yaklaşık 40 amino asitlik bir karboksil ucu uzantısına sahiptir ve aktivasyonu için hidrofobik motif içindeki serin kalıntısının fosforilasyonu gereklidir. (Resim 1) (Hanada ve ark., 2004). Bu iki bölgede bulunan treonin ve serin kalıntısı AKT kinazların aktivitesini farklı oranda etkilerler. Örneğin AKT1'in treonin 308 (Thr308)'deki fosforilasyonu en az 100 katlık bir enzimatik aktiviteyi uyarırken, serin 473'teki (Ser473) fosforilasyon AKT aktivitesini 10 kat daha artırır (Kumar ve Maddison, 2005).



Şekil 1. AKT'nin yapısı (Hanada ve ark., 2004).

1.2 AKT Aktivasyonu

AKT aktivasyonuna yol açan reaksiyonlar, reseptör tirozin kinazlarının (RTK) veya G proteinine eşli reseptörlerin (GPCR) uyarılmasıyla başlar. Bu uyarım, Sınıf I PI3K ailesinin bir veya daha fazla izoformunun plazma zarına çekilmesini ve aktive edilmesini sağlar (Vanhaesebroeck ve ark., 2010). PI3K'ler, fosfatidilinositolün inositol halkasının 3' konumundaki hidroksil grubunu fosforile edebilen bir kinazdır. Sınıf IA PI3K, katalitik bir alt birim (p110 α , β veya δ) ile birleşen bir düzenleyici alt birim (p85 α veya p85 β veya daha kısa varyantları) olarak heterodimerler halinde bulunurken, sınıf IB katalitik alt birim p110 γ 'dan düzenleyici alt birim ise p1013'ten oluşur. Sınıf IA PI3K, düzenleyici alt birimler içindeki SH2 alanlarının etkinleştirilmiş reseptörlerdeki fosfo-tirozin kalıntılarına veya adaptör proteinlere bağlanmasıyla etkinleştirilir. Sınıf IB PI3K ise GPCR'ler tarafından etkinleştirilir (Hoxhaj ve Manning, 2020). Büyüme faktörünün RTK'ya bağlanmasının ardından, PI3K'nın düzenleyici alt birimi (p85), aktif RTK'nin fosfotirozin içeren sitoplazmik bölgelerine yönlendirilir. Bu da PI3K'nın katalitik alanının (p110) aktivasyonuna yol açar. Aktive olan PI3K plazma membranında PI4,5P₂'nin 3-OH grubunu fosforilleyerek ikincil haberci olan PIP₃'ü oluşturur. PI3K-AKT yolunda, PIP₃'ün üçüncü konumdaki fosfat grubu hem PDK1 hem de AKT proteinine bağlanabilir. Bu bağlanma, AKT proteinini plazma membranına çeker ve devamında PDK1 AKT'yi Thr308 konumunda fosforile eder. PI3K ve lipid ürünleri genellikle uygun AKT aktivasyonu için zorunlu ve hız sınırlayıcı olarak kabul edilir. PDK1 aracılı aktivasyondan bağımsız olarak, AKT aktivasyonu memeli hedef rapamisin kompleksi 2 (mTORC2) tarafından da düzenlenir (Resim 2). mTORC2 Ser473'te fosforilasyonu sağlar ve AKT aktivasyonunu destekler (P. Liu ve ark., 2014).

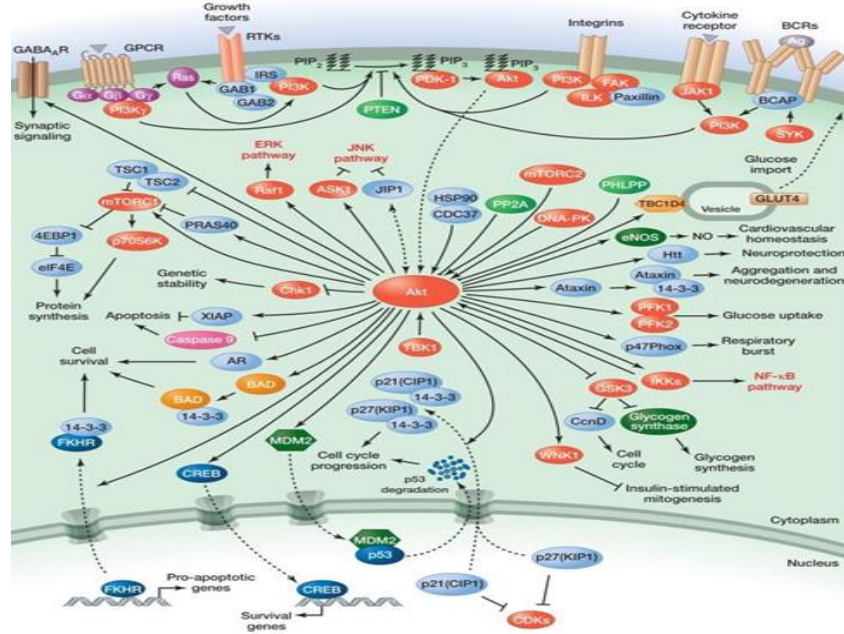


Şekil 2: AKT'nin fosforilasyonu (Hemmings ve Restuccia 2012).

PI3K/PIP3 sinyalinin sonlandırılması başlıca PIP3'ü PI4,5P2'ye geri çeviren fosfataz PTEN tarafından gerçekleştirilir (Manning ve Toker, 2017) Ayrıca, PTEN dışında, PI3K'nın aşağısındaki sinyalin sonlandırılmasında fosfotidilinozitolün parçalanmasına dahil olan diğer fosfatazların da var olduğu bilinmektedir. Örneğin, Src-homoloji 2 (SH2) içeren inositol-5-fosfataz (SHIP), PIP3'ü PI3,4P2'ye defosforile eder. İnositol polifosfat 4-fosfataz tip II (INPP4B) ise PI(3,4)P2'nin 4. pozisyonunu hidrolize eder. Bu enzimlerin AKT aktivitesinin negatif düzenlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Martini ve ark., 2014).

1.3 AKT'nin Aşağı Yönlü Eftörleri ve Fonksiyonları

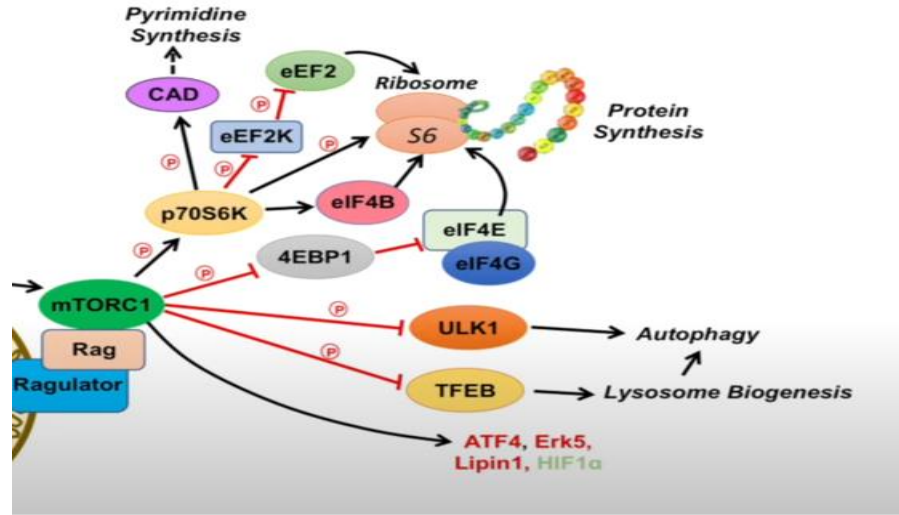
Literatürde bildirilen 100'den fazla AKT substratı bulunmaktadır (Resim 3). Yıllar içinde AKT sinyalizasyonu üzerine yapılan çalışmalar, AKT'nin etkilerinin birden fazla substratı paralel olarak düzenlenmesinden kaynaklandığını göstermektedir. Substrat üzerindeki bölgeye erişilebilirlik, AKT ile ikincil etkileşimler, hücrel bileşenlerin bulunduğu substratlar gibi faktörler de bu düzenlenmeye katkıda bulunabilir. Kanser hücrelerin kontrolsüz çoğalarak vücudun diğer bölgelerine yayılabilen bir hastalıktır. AKT sinyali fizyolojik olarak hücrelerin hayatta kalmasını destekleyen sinyal ağında merkezi role sahiptir. Bu sebeple birçok kanser tipinde AKT'nin aktive edilmesi şaşırtıcı bir durum değildir. AKT izoformları hücre ve dokuya özgü işlevlere sahiptir, ancak AKT aktivasyonu belirgin olarak, sayısız aşağı akış hedefi aracılığıyla hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını, büyümesini ve hücrel metabolizmasının değişmesini sağlayabilir. Bu bölümde, AKT'nin bilinen bazı aşağı akış hedefleri ve fonksiyonlarına dair bilgiler verilecektir.



Şekil 3: Akt'nin efektörleri (Hemmings ve Restuccia, 2012).

Hücre hayatta kalmasının desteklenmesi, AKT yolunun en çok çalışılan işlevlerinden biridir. AKT'nin kendisi apoptoz, transkripsiyon faktörleri ve onkojenik faktörlerin düzenlenmesinde merkezi proteinleri içeren çok çeşitli akış aşağı efektörlerini fosforile edebilen bir fosfoproteindir. AKT tarafından fosforile olduğu bilinen apoptotik mekanizmanın ilk bileşeni, B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi üyesi Bcl-2 antagonisti öldürücü hücre (Bad)'dir. Bad'ın fosforilasyonu, B-cell lymphoma-extra large'a (Bcl-xL) bağlanarak, hücre ölümünü indükleme yeteneğini inaktive eder ve hücre yaşamının sürdürülmesini sağlar (H. Wang ve ark., 1999). Fosforile olan Bad mitokondriyal zar üzerinde bulunan Bcl-2/Bcl-xL kompleksinden salınır ve sitoplazmadaki 14-3-3 proteinleriyle kompleks oluşturur, böylece apoptotik fonksiyon etkisiz hale getirilir (Datta ve ark., 1999). Forkhead (FOXO) proteinleri, heliks DNA bağlama alanı aracılığıyla hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder veya baskılar. FOXO proteinleri hücre döngüsünün durmasını, hücre ölümünü ve hücre oksidatif stresi teşvik etmek için hedef genlerin transkripsiyonunu aktive ederler ve metabolik dengeyi sürdürmede rol oynar. AKT FOXO transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek DNA'ya bağlanmasını önler. Bu da onları çekirdekte uzaklaştırılarak sitoplazmada parçalanmasına yol açar ve böylece hücrenin hayatta kalmasını destekler. Ayrıca FOXO'nun azalan aktivitesi, sitokin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri p27 ve p21'in transkripsiyonunu engelleyerek hücre döngüsü üzerindeki inhibisyon etkisini ortadan kaldırır ve hücrelerin çoğalmasını teşvik eder. Ayrıca, Fas ligandı (FasL) ve tumor nekrozis faktör ilişkili apoptosis indükleyici ligand (TRAIL) gibi pro-apoptotik faktörlerin transkripsiyonunu aracılığıyla ekstrinsik apoptotik yolu inhibe eder (Nitulescu ve ark., 2018). Ek olarak, AKT sinyali, nükleer faktör κ B (NF- κ B) adlı anti-apoptotik hedef genlerin transkriptini teşvik eder. AKT, inhibitör kappa B kinaz (IKK veya κ B kinaz) aktivasyonunu indükler, bu da NF- κ B inhibitörü (I κ B) parçalanmasını tetikler. Serbest kalan NF- κ B, çekirdeğe girer ve hayatta kalımı destekleyen hedef gen öncüllerinin ekspresyonunu artırır (G. Song ve ark., 2005). AKT, Murine double minute 2 (Mdm2) aracılığıyla, p53 aktivasyonunu dolaylı olarak inhibe eder. p53, DNA'da mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan hasarlı genetik bilginin yeni nesil hücrelere aktarılmasını önlemek amacıyla pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu uyarır. AKT'nin Mdm2'yi fosforilleyerek aktive etmesi Mdm2'nin çekirdeğe translokasyonu ve p53'ün degradasyonunu sağlar (Singh ve ark., 2013). Bu nedenle, tümör hücreleri DNA hasarı onarılmadan, PI3K-AKT yolunun aktivasyonu ile hayatta kalma yeteneği

kazanırlar. AKT'nin hücre çoğalmasındaki rolü hem besin maddeleri hem de büyüme faktörü sinyali tarafından düzenlenen mTORC1 yolu ile kontrol edilir (Resim4). mTORC1 aktivasyonu, protein, lipid ve nükleotid sentezi gibi çeşitli anabolik süreçleri teşvik etmeye hizmet ederken, otofaji katabolik sürecini inhibe etmektedir. AKT, mTORC1 sinyal yolunu tuberöz skleroz kompleks 2 (TSC2) ve prolinden zengin 40 kDa AKT substratını (PRAS40) fosforilasyon ile inhibe ederek pozitif olarak düzenlediği görülmüştür (İnoki ve ark., 2002; Manning ve ark., 2002). TSC2'nin fosforilasyonu, guanin trifosfataz aktivasyon protein (GAP) aktivitesi üzerinden küçük G-proteini olan beyinde zenginleştirilmiş Ras homologunu (Rheb) inhibe eder, bu da aktif guanin trifosfata (GTP) bağlı Rheb birikmesine ve mTORC1'in aktive olmasına neden olur (Manning ve Cantley, 2007). mTORC1, sonraki hedefleri olan 4E-bağlayıcı protein 1'i (4E-BP1) ve Ribozomal Protein S6 kinaz β -1'nin (p70S6K) fosforilasyonu ile hücre proliferasyonunu destekler (Manning ve Cantley, 2007). PRAS40, mTORC1 kompleksine doğrudan bağlanarak mTOR aktivitesini azaltır (Harthill ve ark., 2002; Kovacina ve ark., 2003; Vander Haar ve ark., 2007). PRAS40'ın AKT aracılı fosforilasyonu sitozolik çapa proteini 14-3-3'e bağlanmasına yol açarak ayrışmasına ve mTORC1 aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinin azalmasına neden olur (Harthill ve ark., 2002; Kovacina ve ark., 2003; Vander Haar ve ark., 2007).



Şekil 4: mTOR1 sinyali (JJ Medicine, 2017)

AKT, hücre içinde glukoz ve lipid metabolizmasını düzenlemede önemli bir rol oynar. AKT, hücrel glukoz alımını düzenleyerek ve gen ifadesini kontrol ederek glukoz metabolizmasını düzenleyebilir. AKT, hücre zarına glukoz taşıyıcıları olan GLUT1 ve GLUT4'ün translokasyonunu sağlar. Bunun yanında AKT aktivitesi, başlıca heksokinaz, fosfofruktokinaz-1 ve fosfofruktokinaz-2 ve diğer glikolitik enzimleri dolaylı olarak veya doğrudan fosforile ederek uyarır (Revathidevi ve Munirajan, 2019). Ayrıca, AKT, GSK-3'ü fosforilleyip inhibe ederek glikojen sentezini artırabilir (Hers ve ark., 2011). AKT aktivasyonu çoğalan hücrelerde, lipid biyosentezi, yağ asidi oksidasyonu, çok düşük dansiteli lipoprotein yapımı ve sekresyonunda önemli bir rol oynar (M. Liu ve ark., 2016). AKT, glukoneogenezi bloke eden ve lipogenezi uyarıcı lipid metabolizmasının ana transkripsiyonel regülatörü olan olgun sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1'in (SREBP-1) bozulmasını önlemektedir (Amemiya-kudo ve ark., 2002; Krycer ve ark., 2010). SREBP'in SREBP-1a, SREBP-1c ve SREBP-2 olmak üzere üç izoformu vardır. Genel olarak, bu izoformlar, kolesterol biyosentezini ve naklini katalizleyen kolesterol ile ilişkili genlerin ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörünün düzenlenmesinde rol oynar (Horton ve ark., 2003). Yüksek düzeyde glukoz alımının olduğu tümör gibi çoğalan hücrelerde, trikarboksilik asit döngüsünde oluşan mitokondriyal sitratın tamamı oksitlenmez bunun yerine bazıları sitoplazmaya taşınır. AKT bu sitratları asetil koenzim A'ya dönüştüren enzim olan ATP-sitrat liyaz (ACL)'ı uyarır, bu da lipid sentezi için öncül maddedir (Berwick ve ark., 2002).

AKT ayrıca, izoprenoid, kolesterol ve yağ asidi biyosentezine katılan lipojenik genleri indüklemektedir. PI3K/AKT aktivasyonu aracılığıyla sentezlenen bu lipidler, hücre büyümesi ve çoğalma sırasında hücre ve organel membranlarının bileşenleri olarak kritik bir rol oynar (Ward ve Thompson, 2012). Ayrıca, AKT, glikojenin sentezini düzenler. Bunu, GSK-3'ü (GSK-3 α Ser21 ve GSK-3 β Ser9) inhibe ederek gerçekleştirir. AKT aracılığıyla GSK3 aktivitesinin inhibe edilmesi, glikojen sentezinin defosforile edilmesine ve aktif hale gelmesine yol açar bu da glikojen sentezinin artmasına neden olur (Hers ve ark., 2011). AKT'nin üç izoformu arasında AKT1, endotel hücrelerinin normal fizyolojik işlevini düzenleyen ana alt türdür. AKT'nin vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) tarafından uyarımı sonucunda anjiyogenez tetiklenir. Ayrıca PI3K/AKT endotelyal nitrik oksit (eNOS) ve anjiyopöietinler gibi anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunu da düzenler. Bu durum özellikle tümör büyümesi ve metastazı açısından ayrı bir öneme sahiptir. (He ve ark., 2021; Revathidevi ve Munirajan, 2019)

2. Onkojen olarak AKT

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi sonucu oluşan ve vücudun diğer bölgelerine yayılarak istila eden bir hastalıktır. Dünyada en çok ölüme neden olan hastalıklardan biridir. Onkojen terimi bir kanser oluşturma potansiyeline sahip bir geni ifade eder. Tümör hücrelerinde, bu genler sık sık mutasyona uğramıştır veya yüksek düzeyde ifade edilir. AKT'nin tüm aktivatörleri, düzenleyicileri ve akış aşağı efektörlerinin durumu tümör gelişiminde önemli bir rol oynar. Bunun yanında anormal AKT aktivasyonunun kendisi de oldukça onkojeniktir ve çeşitli insan kanserlerinde gözlenmektedir. AKT'nin aşırı ekspresyonu ve aktivasyonu, çeşitli insan kanserlerinde sık gözlenen iki önemli olaydır (Cerami ve ark., 2012). AKT'nin artan değerlerinin az önce bahsedilen fizyolojik rollerine ek olarak tümör gelişimini başlattığı, birçok kanser tipinde kemoterapiye karşı direnç ve metastazı desteklediğine dair birçok kanıt bulunmaktadır. İnsan kanserlerinde sık gözlenen AKT değişikliklerinden bazıları Tablo 1' de gösterilmiştir.

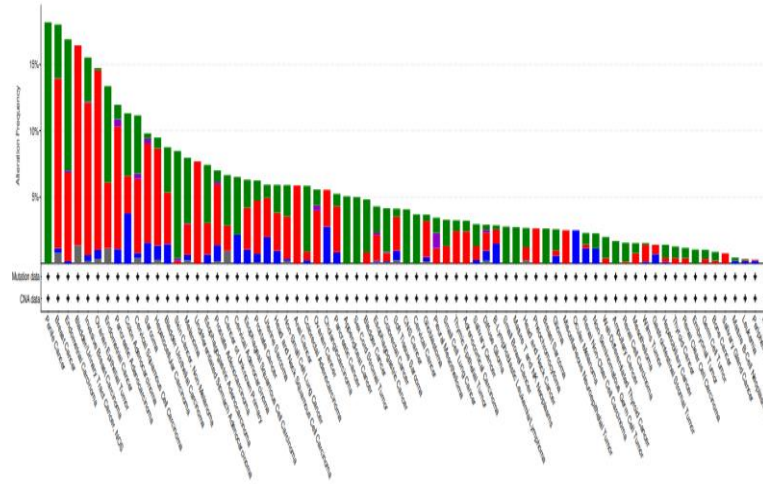
Tablo 1. Çeşitli kanserlerde AKT'deki değişiklikler (Revathidevi ve Munirajan, 2019)

| Kanser | Değişiklik |
|--------------------------------------|---|
| Tiroid Kanseri | AKT aktivasyonu |
| Meme Kanseri | AKT1 mutasyonu AKT1 ve 2'nin aşırı ekspresyonu Fazla ekspresyon |
| Rahim ağzı kanseri | AKT aktivasyonu |
| Yumurtalık kanseri | Fazla ekspresyon Sigara içmeye bağlı olarak yüksek AKT |
| Küçük olmayan hücreli akciğer kanser | aktivasyonu |
| Pankreas kanseri | Hiperaktivasyon ve fazla ekspresyon |
| Böbrek hücre karsinomu | Fazla ekspresyon |
| Beyin kanseri | Fazla ekspresyon |
| Kolon Kanseri | Fazla ekspresyon |

2.1 AKT Amplifikasyonu ve Fazla Ekspresyonu

AKT'nin anormal aktivitesi, AKT'nin yukarı akışında gerçekleşen birçok mekanizma aracılığıyla meydana gelebilir. Kanserde PI3K'de meydana gelen aktivasyon mutasyonları veya amplifikasyonlar, PTEN kaybı ve büyüme faktörü veya sitokin reseptörlerinin ve Ras gibi hücrel onkojenlerin aktivasyon mutasyonları yaygın bulgulardır. Bu durumlar AKT'nin tüm izoformlarının artan ekspresyon ve/veya aktivitesine neden olur. AKT genlerinin (AKT1, AKT2 ve AKT3) amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonunun,

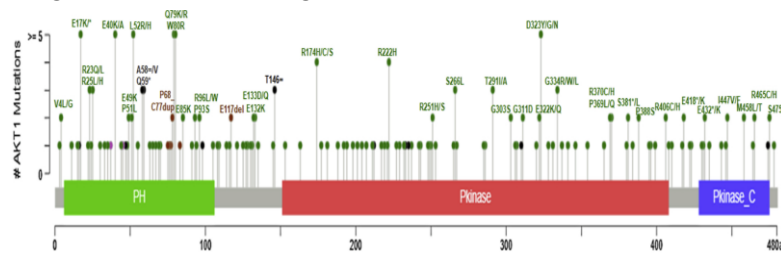
bazı kanser türlerinde yüksek frekansta meydana geldiği görülmüştür (Resim 6). AKT1 gen amplifikasyonu mide, meme, kolon, özofagus, yumurtalık, pankreas, tiroid kanserleri ve glioblastom gibi çeşitli kanserlerde daha yüksek oranda görülmüştür (Staal, 1987; Knobbe ve Reifenger, 2003; Altomare ve Testa, 2005; Manning ve Cantley, 2007). Yumurtalık, meme ve pankreas kanserlerinde AKT2'nin amplifikasyonu bildirilmiştir (Bellacosa ve ark., 1995; Cheng ve ark., 1996). AKT2'nin aşırı ekspresyonu hepatoselüler karsinom tümörlerinin %40'ında ve kolorektal kanserlerin %57'sinde, AKT3'ün aşırı ekspresyonu meme ve prostat kanserlerinde bildirilmiştir (Nakatani ve ark., 1999; Roy ve ark., 2002, Xu ve ark., 2004). AKT2'nin kolorektal tümörlerde amplifikasyonu tümör agresifliği ile ilişkili bulunmuştur (Parsons ve ark., 2005). AKT genlerinin amplifikasyonu, mTOR, MYC, ökaryotik translasyon başlatma faktörü (eIF4E), IKK, siklin D1, siklik adenozin monofosfat yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB), kaspaz 9 ve Bcl-2 antogonisti öldürücü hücre (BAD) dahil olmak üzere çeşitli aşağı akış efektörlerini değiştirir (Slattery ve ark., 2018). AKT ayrıca birçok insan kanserinde hiperaktifleşmiştir, bu da AKT aktivasyonunun kanser oluşumunda kilit rol oynadığı anlamına gelmektedir (Hay, 2005).



Resim 5. Çeşitli kanser tiplerinde AKT'nin genetik varyasyonları. Veri cBioportal web tool kullanılarak alınmıştır. Yeşil renk mutasyon, kırmızı renk amplifikasyon, mavi renk derin delesyonu simgelenmektedir.

2.2. Mutasyon

AKT / PI3K / mTOR ilişkili mutasyonlar tüm tümörlerin yaklaşık %30'unda tanımlanmasına rağmen yalnız AKT genlerinde meydana gelen mutasyonların insan kanserlerinde düşük oranda gerçekleştiği görülmüştür (Resim 6) (Mundi ve ark., 2016; Vandamme ve ark., 2019). AKT hiperaktivasyonu ile ilişkili en sık mutasyonun pH bölgesindeki E17K'de görülmekle birlikte idrar kesesi, meme, yumurtalık, akciğer, pankreas, endometriyal, ürotelyal ve kolorektal kanserlerde gözlenmiştir (Carpten ve ark., 2007; Mohamedali ve ark., 2008; Malanga ve ark., 2008; Shoji ve ark., 2009; Askham ve ark., 2010). Bazı sık AKT1 mutasyonlarının şematik gösterimi Resim 4'te gösterilmiştir.



Resim 6. AKT 1 mutasyonlarının şematik gösterimi. Veri cBioportal web tool kullanılarak alınmıştır. Yeşil renk nokta mutasyon, Siyah renk çerçeve kayması mutasyonu ve anlamsız mutasyon, Kırmızı renk çerçeve içi mutasyonu simgelenmektedir.

2.3. Metilasyon

N⁶-metiladenosin (m⁶A) haberci RNA metilasyonu, hücre proliferasyonunu, gelişim ve kanserde farklılaşmayı etkileyen gen düzenleyici mekanizmadır. m⁶A metilasyonu, AKT sinyallemede düzenleyici bir rol oynamaktadır. Azalan (m⁶A) metilasyon negatif AKT regülatörü PH alanı lösince zengin tekrar protein fosfataz 2 (PHLPP2) ekspresyonunun azalmasına ve pozitif AKT regülatörü mTORC2'nin ekspresyonunun artmasına yol açmaktadır. Bu düzenleyici değişiklikler AKT yolunu aktive ederek endometriyal kanser hücrelerinin çoğalmasına ve tümör oluşumuna yol açar (J. Liu ve ark., 2018). Metilasyonun AKT aktivasyonu üzerindeki doğrudan etkisi rapor edilmiş olmasına rağmen birçok kanserde PTEN dahil olmak üzere yukarı akış düzenleyicileri metilasyonunun AKT'yi aktive ettiği gösterilmiştir (Nakakido ve ark., 2015).

2.4. Posttranslasyonel Modifikasyon

AKT serin ve tirozin fosforilasyonu, O-GlcNAzilasyon, lizin modifikasyonları, sumolasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon dahil olmak üzere birçok translasyonel modifikasyona uğrar; normal PI3K ve PTEN aktivitesinin varlığında bile kanserlerde AKT hiperaktivasyonunu sürdürmede kritik bir rol oynar (Chan ve ark., 2014). Posttranslasyonel değişiklikler arasında ubiquitinasyon, AKT aktivasyonu için önemli bir mekanizmadır (W. Yang ve ark., 2010). Büyüme faktörlerinin etkisiyle AKT, PH alanında E3 ligazlar tarafından ubiquitinlenir ki bu da AKT'nin plazma membranına transformasyonunu destekleyerek tümörögenезis ve glikolize katkıda bulunmaktadır (W. Yang ve ark., 2009; Chan ve ark., 2012). PH alanı yoluyla PIP3 fosfolipid ile etkileşimi, AKT'ın plazma membranına alınımının genel mekanizmasıdır, ancak aktif olmayan AKT, AKT membran çekilmesini kolaylaştırmak için PH alanı ile c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ile etkileşen protein 1 ve T hücreli lösemi-1 gibi kritik adaptörlerle etkileşime girebilir (Bellacosa ve ark., 1998). Buna tümör nekrozis faktör reseptörü ilişkili faktör 6 ile indüklenen PH alanı içinde K8 ve K14'te meydana gelen AKT ubiquitinasyonu aracılık etmektedir, bu nedenle AKT ubiquitinasyonunun genellikle PIP₃ bağlanmasıyla önce meydana gelen membran alımı ve fosforilasyonu için kritik bir olay olduğu görülmüştür (W. Yang ve ark., 2010).

3. AKT İnhibitörleri

İnsan tümörlerinin %50'sinden fazlası AKT hiperaktivasyonu içermektedir (Manning ve Toker 2017). AKT aktivasyonunun kanserde önemli bir özelliği kemoterapiye özellikle tedatrazustuzumab, gefitinib, tamoksifen ve all-trans-retinoik asit gibi direkt olarak hedefe yönelik ilaç tedavilerine karşı direnç oluşturmasıdır (Dong ve ark., 2021). Bu sebeplerden AKT, kanser tedavisi için ilgi çekici bir hedef molekül olarak kabul edilmekte olup, kabul edilebilir farmasötik özelliklere sahip özel inhibitörlerin tanımlanması için birçok çaba gösterilmektedir. AKT inhibitörleri etki mekanizmasına göre dört sınıfa ayrılır. İlk sınıf, kinaz alanındaki ATP bağlama bölgesine karşı rekabetçi inhibitörlerden oluşur. İkinci sınıf, AKT kinaz alanının alosterik inhibitörleridir. Üçüncü sınıf, PI3K tarafından PIP₂'den PIP₃'ün üretilmesini engelleyen lipid tabanlı inhibitörlerdir. Dördüncü sınıf, AKT'yi normalde aktive edilen hücre zarına yerleştirmeyi engelleyen ve böylece AKT'nin aktivitesini engelleyen ilaçlardan oluşur (Mundi ve ark., 2016).

3.1 Sentetik Bileşikler

GSK690693 (aminofurazan sınıfı) bir ATP yarışmalı pan-AKT kinaz inhibitörüdür (IC₅₀, 2 nmol / L (AKT1), 13 nmol / L (AKT2) ve 9 nmol / L (AKT3)) (Rhodes ve ark., 2008)². Akış aşığı AKT hedefi olan GSK3β'yi baskılar ve bir ksenograft fare modelinde BT-474 meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmektedir (Heerding ve ark., 2008). GSK690693'ü test eden klinik deneyler (NCT00493818,

² Pan-AKT inhibitörü, AKT proteinini hedef alan ve tüm AKT izoformlarını inhibe eden bir tür ilaç veya bileşendir.

NCT00666081, faz I) iptal edildi veya ilaç şiddetli hiperglisemiye neden olduğu için sonlandırılmıştır (Crouthamel ve ark., 2009). GSK2141795 (uprosertib), ATP yarışmalı başka bir pan-AKT inhibitörüdür ve hematolojik hücre hatlarında daha etkili olduğu görülmüştür. Bu ilacın in vitro olarak cisplatin kaynaklı apoptozu arttırdığı ve bir SKOV3 yumurtalık kanseri ksenogref fare modelinde prolin açısından zengin AKT substratlarının fosforilasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Pachl ve ark., 2013; Cheraghchi-Bashi ve ark., 2015). GSK2141795, ileri melanomlu hastalarda (n = 48) Mitojenle aktive edilmiş kinaz (MAPK) / Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) inhibitörü trametinib ile kombinasyon halinde bir faz II klinik deneyde test edilmiştir. Sonuçlar, kombinasyonun kabul edilebilir bir toksisite profiline sahip olduğu, ancak vahşi tip nöroblastom RAS viral onkogen homologunu (NRAS) veya mutant NRAS'ı eksprese eden hastalar tedaviye yanıt vermediği görülmüştür (Algazi ve ark., 2015). GSK2110183 (afuresertib) oral olarak kullanılabilen bir ATP-yarışmacı ve pan-AKT kinaz inhibitörüdür. BT-474 meme kanseri ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarının ERBB2ş, PIK3CA, K111N veya PTEN-eksik ifade eden çeşitli AKT substratlarının (örn. GSK3b, PRAS40, FOXO ve kaspaz-9) fosforilasyon seviyelerini azalttığı görülmüştür (Dumble ve ark., 2014). GSK2110183'ün hematolojik ve katı tümör hücrelerine karşı sırasıyla %65 ve %21 etkililik gösterdiğini bildirmiştir (Dumble ve ark., 2014). Başka bir oral ATP yarışmalı pan-AKT inhibitörü (IC50 <10 nmol / L) olan AZD5363 (capivasertib), BT-474c meme kanseri ksenograft fare modelinde uygun bir farmakokinetik ve toksisite profiline sahip olduğu gösterilmiştir (Erlanson ve ark., 2016). AZD5363'ün oral uygulaması, bir BT-474c ksenograft fare modelinde PRAS40, GSK3b ve S6 fosforilasyonunun azalmasıyla sonuçlandığı rapor edilmiştir (Davies ve ark., 2014). AZD5363 ile kronik oral tedavi, bir xenograft modelinde trastuzumab dirençli insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'nin meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca AZD5363'ün meme kanseri ksenogref fare modellerinde dosetaksel, trastuzumab veya lapatinibinin antikanser aktivitesini de önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür (Davies ve ark., 2014). ER-pozitif / üçlü negatif meme, jinekolojik, akciğer, prostat ve kolorektal kanserler dahil olmak üzere AKT mutasyonu (AKT1E17K) içeren katı tümörü olan hastalarda AZD5363 ile bir klinik çalışma (NCT01353781) gerçekleştirilmiştir. AKT1-E17K mutant tümörü ağır şekilde tedavi edilen hastalarda ortalama progresyonsuz sağkalım (Progression-free survival-PFS), ER pozitif meme kanserli hastalarda 5,5 ay, jinekolojik kanserli hastalarda 6,6 ay ve diğer katı tümürlü hastalarda 4,2 ay olduğu görülmüş ve bu sonuçlar AZD5363'ün AKT1-E17K mutasyonunu taşıyan tümörlere karşı etkili olabileceğini düşündürmektedir (Hyman ve ark., 2017). GDC-0068 (ipatasertib), PI3K/AKT yolunu inhibe ederek çeşitli kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif ve anti hayatta kalma etkileri uygulayan ATP-yarışmalı bir pan-AKT inhibitörüdür (Blake ve ark., 2012). AKT aktivitesinin bu bileşik tarafından inhibisyonu, PC-3 (PTEN delesyonu) prostat kanseri hücreleri, BT474M1 (PIK3CAK111N mutant ve HER2-amplifiye edilmiş) meme kanseri hücreleri ve IGROV1 (PTENT319fsX1 / Y155C ve PIK3CA1069W yumurtalık kanseri hücreleri dahil) hücre döngüsü ilerlemesini ve kanser hücre hatlarının canlılığını azalttığı görülmüştür (J. Lin ve ark., 2013). GDC0068'nin kültürlenmiş insan kanseri hücre hatlarında (PC-3, BT474M1, IGROV-1) AKT sinyalini inhibe ettiği, yumurtalık, prostat, meme, glioblastom, kolorektal, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ve melanom ksenograft hücrelerde büyümeyi azalttığı görülmüştür (Lin ve ark., 2013). GDC-0068 ayrıca PTEN kaybı, PI3K'ı kodlayan gen mutasyonları / amplifikasyonları veya HER2 aşırı ekspresyonu dahil genetik değişikliklerle aktive edilen ve AKT eksprese eden tümörlerde in vivo büyümeyi etkili bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Lin ve ark., 2013). Ayrıca, GDC0068 ve dosetaksel veya karboplatin kombinasyonu, farelerde PC-3 (prostat), MCF7 neo / HER2 (meme), OVCAR3 (yumurtalık) kanser hücrelerinin ksenograft büyümesini hafifletmiştir. Ipatasertib (ilk insanda faz I) çalışması, katı tümürlü hastalarda AKT'nin sağlam ve güvenli bir şekilde hedeflendiğini göstermiş ve bu ilacın eşleştirilmiş tedavi biyopsilerinde iyi tolere edildiğini ve PRAS40, GSK3b ve mTOR'un inhibe edildiği gösterilmiştir (Saura ve

ark., 2017). İpatasertib şimdi faz II çalışmalarda daha fazla değerlendirilmektedir. CCT128930, ATP-yarışmalı ve seçici bir AKT2 inhibitörüdür (IC₅₀ ¼ 6 nmol / L) ve yakından ilişkili PKA kinaz ile karşılaştırıldığında AKT2 için 28 kat seçiciliğe sahiptir. CCT128930, farelerde PTEN-null U87MG glioblastoma ve HER2-pozitif, PIK3CA-mutant BT474 meme kanseri ksenogreflerine karşı antitümör aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. (Yap ve ark., 2011). MK-2206, ağızdan temin edilebilen bir allosterik AKT1 / 2 inhibitörü ve AKT1, 2 ve 3'e karşı sırasıyla 8, 12 ve 65 nmol / L'lik IC₅₀ değerleri sergilediği görülmüştür (Hirai ve ark., 2010). Allosterik AKT inhibitörleri, ATP rekabetçi inhibitörlerinin aksine, Ser473 / Thr308'de AKT'nin hiperfosforilasyonu ile sonuçlanmadığı rapor edilmiştir (Okuzumi ve ark., 2009). MK-2206, PI3KCA mutasyonları, PTEN kaybı, yukarı yönlü RTK gen amplifikasyonu veya aşırı aktifleşmesi ve AKT'nin mutasyonunu barındıran çeşitli kanser hücre tiplerine karşı güçlü antiproliferatif aktivite sergilemiştir. Bir faz II çalışması (NCT01333475), MK2206'nın bir MAPK kinaz 1/2 (MEK1 / 2, MAP2K1 / 2) inhibitörü olan selumetinib ile kombinasyonunu araştırıldı (Do ve ark., 2015). Araştırmada ne yazık ki, nesnel bir yanıt gözlenmemiştir. Bununla birlikte, yanıt eksikliğinin bir yetersiz doz ve programdan mı yoksa AKT / MEK'den bağımsız ERK aktivasyonundan mı kaynaklandığını belirlemedi. Yakın zamanda yapılan bir klinik çalışmada, MK-2206'nın nükseden veya geri tepen kronik lenfositik lösemide bendamustin ve rituksimab ile birleştirilmesinin etkinliğini incelenmiştir. Genel cevap oranı ümit verici şekilde %92 olarak ve ortalama PFS ve tedavi gerektirmeyen sağkalım sırasıyla 16 ve 24 ay olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar kemo-immünoterapiyle birlikte AKT inhibisyonunun umut verici bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir (Larsen ve ark., 2017). BAY 1125976, AKT1 ve AKT2'nin kinaz ve PH alanları tarafından oluşturulan bir allosterik bağlama cebine bağlanan başka bir AKT1 / 2 inhibitörüdür (Politz ve ark., 2017). BAY 1125976, in vivo olarak iyi tolere edildi ve AKT (E17K) mutant veya PTEN kaybına bağlı tümörler dahil olmak üzere aktif PI3K / AKT / mTOR yolağı olan çoklu tümör modellerinde doza bağlı antitümör etkinliği gösterdiği rapor edilmiştir (Politz ve ark., 2017). BAY 1125976, AKT aracılı tümör oluşumunda, fosforile AKT (p-AKT) ve aşağı akım hedefi, ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4E-BP1'i inhibe ederek AKT sinyalini etkili bir şekilde bloke ettiği görülmüştür (She ve ark., 2010). AKT1 ve AKT2-IN-1, AKT inhibisyonu için PH alanına bağlanır ve AKT3 (IC₅₀ = 1.9 nmol / L) veya AGC kinaz ailesinin diğer üyeleri (> 50 nmol / L) yerine AKT1 / 2 için seçici olduğu görülmüştür. AKT1 ve AKT2-IN-1, farelerde iyi tolere edildi ve kan örneklerinde AKT seviyelerinin zayıfladığı görülmüştür. Bir A2780 yumurtalık karsinoma hücreli ksenograft modelinde AKT1 ve AKT2 IN-1 tedavisi, AKT1 ve AKT2'nin sırasıyla %80 ve %75 inhibisyonunu göstermiştir (Bilodeau ve ark., 2008). Perifosin, AKT'nin plazma membranına translokasyonunu ve devamında fosforilasyonunu bloke eden, böylece insan tümör hücre hatlarına karşı belirgin bir sitotoksik etki uygulayan oral bir alkil fosfolipid AKT inhibitörüdür (Momota ve ark., 2005). Bir in vivo çalışma, temozolomid ile birleştirilen perifosinin, farelerde trombosit kaynaklı büyüme faktörü B ile yönlendirilen glioma karşı tek başına temozolomid tedavisinden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Patel ve arkadaşları (2002) perifosinin (20 nmol / L) hem G1 hem de G2 – M fazlarında hücre döngüsü durmasına neden olduğunu ve hem tümör baskılayıcı p53 vahşi tip hem de nakavt hücrelerinde p21WAF1 ekspresyonunu arttırdığını bildirdiler. Aksine, perifosinin baş ve boyun skuamöz karsinom hücrelerinde eksprese edilen p21 nakavt varyantlarında sikline bağlı kinaz inhibitörü 1A (p21WAF1) veya hücre döngüsü üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı, ek olarak, perifosin 10 dakikadan başlayıp 24 saate kadar süren fosforile akt (p-AKT) seviyesini önemli ölçüde azalttı ve sıçanlarda pS6 seviyesini 1. Saatten başlamak üzere 24 saat içerisinde düşürdüğü belirtilmiştir (L. Chen ve ark., 2012). Bu bileşiğin tekrarlayan refrakter pediatrik merkezi sinir sistemi ve solid tümör hastalarında bir faz I klinik çalışmasında (NCT00776867) 25 ila 125 mg / m² / gün arasında yönetilebilir veya hiç toksisitesi olmadığı gösterilmiştir (Becher ve ark., 2017). Sorafenib ile birleştirilmiş perifosin, faz I klinik çalışmada Hodgkin lenfomaya karşı umut verici aktivite göstermiştir (Guidetti ve ark., 2014). Bu bileşik ayrıca metastatik kolorektal kanserli

kapesitabin kullanan hastalarla kombinasyon halinde ikinci veya üçüncü basamak tedavi olarak incelenmiştir (NCT00398879; Bendell ve ark., 2011). Ek olarak faz I ve faz II b klinik çalışmaları, perifosin monoterapisinin yüksek riskli nöroblastomlu çocuklarda güvenli ve iyi tolere edilen bir tedavi olduğunu doğrulamaktadır (HR-NB; Kushner ve ark., 2017). Perifosin ve mTOR inhibitörü (temsirolimus) kombinasyonunun tekrarlayan refrakter pediatrik ve katı tümöre sahip hastalarda oral yoldan 25-75 mg / m² / gün dozunda ve haftada 25-75 mg / m² intravenöz doz düzeyinde güvenli ve makul olduğu bulunmuştur (Becher ve ark., 2017; Kushner ve ark., 2017). Perifosin birçok çalışmada incelenmiş olsada, diğer birinci veya ikinci basamak kanser tedavilerinden daha üstün bulunmamıştır. Cho ve arkadaşları (2012) VEGF hedefli tedavinin başarısız olmasından sonra perifosinin iyi tolere edildiğini ve ileri renal hücreli karsinomlu (RCC) hastalarda aktivite gösterdiğini rapor ettiler. Bununla birlikte, aktivitesi şu anda mevcut olan ikinci basamak ajanlardan (NCT00448721) daha üstün olmadığı görülmüştür. Bunun dışında, biyokimyasal olarak tekrarlayan, hormona duyarlı prostat kanseri olan hastalarda perifosinin (NCT00058214) faz II çalışması (2007), tek bir ajan olarak perifosine cevabın önceden belirlenmiş prostat spesifik antijen kriterlerini geçmediğini de gösterdi. Bununla birlikte, hastaların %20'si NCT00058214 çalışmasında bir azalma göstermiştir (Chee ve ark., 2007), bu da perifosinin tek ajanlı klinik aktiviteye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak, perifosinin çeşitli klinik çalışmalarda tek bir ajan olarak veya kombinasyon terapisinde önemli aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, etkili bir terapötik maddeye dönüşmesi için daha mekanik bir araştırmaya ihtiyaç vardır. AKT inhibitörü VIII, 3 AKT izoformunun tümünü inhibe edebilen bileşikler tanımlamak için yüksek verimli bir tarama çabasıyla keşfedilen 2,3-difenilkinoksaline dayanarak geliştirilmiştir (Lindsey ve ark., 2005; Z. Zhao ve ark., 2005). HT29 (kolon), MCF-7 (meme), A2780 (yumurtalık) ve LNCaP (prostat) dahil olmak üzere birçok tümör hücre hattının VIII'e karşı oldukça duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Lindsey ve ark., 2005). Bu inhibitör, fosfatidilserin translokasyonu, bölünmüş kaspaz-9, kaspaz-3 ve poli-adenozin difosfat riboz polimerazmerazın indüksiyonu ile hücre proliferasyonunu ve apoptozu etkili bir şekilde azalttığı görülmüştür (Romorini ve ark., 2016). SR13668, doğal olarak meydana gelen indol-3-karbinole dayalı olarak tasarlanmış bir AKT aktivasyon inhibitörü olarak geliştirilmiştir. Ön klinik güvenlik testlerinde, sıçanlarda tek bir oral dozda 1.000 mg/kg veya 14 gün boyunca 25 ila 600 mg/kg/gün arasında çoklu dozlarda hiçbir toksik etki gözlenmemiştir. Farelerde, 500 mg/kg'ye kadar olan dozlar açlık glukoz seviyeleri ve vücut ağırlığı üzerinde herhangi bir etki yapmamıştır. İlacın çok düşük bir çözünürlüğü vardır, bu da ilacın kullanımını olumsuz etkileyeceğini düşündürmektedir (Reid ve ark., 2011; Kapetanovic ve ark., 2010). Triciribine (API-2, TCN, NSC 154020), hücre içinde adenozin kinaz tarafından metabolik olarak aktive edilen bir trisiklik nükleozittir. Hücre içerisinde aktifleşerek triciribin fosfatı (TCN-P) oluşturur. AKT üzerinde PH alanına bağlanabilir ve bu da PDK1 fosforilasyonunu engeller. TCN, AKT üzerinde oldukça seçicidir ve diğer kinazlar üzerinde önemli bir etki yapmaz (L. Yang ve ark., 2004; Berndt ve ark., 2010). TCN-P'nin antitümör etkileri, AKT inaktivasyonunun keşfinden önce biliniyordu ve birkaç klinik denemede test edilmişti. TCN-P ile ilişkilendirilen doza bağlı toksisiteler, geri dönüşümlü hiperglisemi, hepatik toksisite, trombositopeni, hipokalsemi ve yüksek trigliserit seviyelerini içerir (Hoffman ve ark., 1996; Feun ve ark., 1984). TCN-P ile ilişkilendirilen toksisiteleri aşmak için klinik geliştirme, yüksek p-AKT seviyelerini ifade eden tümörler üzerine odaklanmıştır (Sampath ve ark., 2013). Miransertib (ARQ 092), aktif olmayan AKT'ye bağlanarak nanomolar konsantrasyonlarda tüm üç izoformu yarışmasız inhibe eder (K. Kim ve ark., 2017). Miransertib, ilerlemiş katı tümörlerin ve tekrarlayan malign lenfomanın tek başına veya kombinasyonlarıyla tedavisi için birkaç klinik denemede incelenmiştir. Miransertib, AKT1 E17K mutasyonları taşıyan hücrelerde ve dokularda pozitif sonuçlar elde edilmiş ve PI3K/AKT yolunun genetik değişiklikler tarafından oluşturulan aşırı büyüme hastalıkları ve/veya vasküler anormalliklere sahip hastalar için araştırılmaktadır (Ranieri ve ark., 2018). Miransertib, Proteus sendromu için potansiyel bir tedavi olarak incelenmektedir (Lindhurst ve ark., 2015).

3.2. Doğal Bileşikler

AKT'nin yapısı çözüldüğünden, birçok işlevi yavaş yavaş ortaya çıkmıştır. Birçok ilaç şirketi ve akademik laboratuvar aktif olarak doğrudan AKT'leri hedefleyen doğal bileşikler geliştirmektedir. Çok sayıda klinik öncesi araştırma, bazı bitkilerin ve doğal fitokimyasalların AKT aktivitesini doğrudan inhibe edebileceğini göstermiştir. Zencefil kökünden 6-Shogaol, doğrudan AKT1 ve AKT2'yi hedefleyerek PI3K / AKT / mTOR sinyal yolunu inhibe etmiştir. İnhibitör aktivitesi, kinaz alanının Nand C-lobları arasındaki alt arayüzde bir allosterik AKT bölgesine bağlanmasından kaynaklanmıştır. Bu bileşiğin NSCLC, hepatokarsinom, deri ve yumurtalık kanseri hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (J. Kim ve ark., 2008; Wu ve ark., 2010; Weng ve ark., 2012, M. Kim ve ark; 2014). Başka bir bileşik, oridonin (rabdosia rubescens), ATP ile yarışmalı AKT'yi doğrudan hedefleyerek in vitro hücre proliferasyonunu ve in vivo hasta kaynaklı ksenograft büyümesini azalttığı bildirilmiştir (M. Song ve ark., 2018). Keten tohumu içinde bulunan herbacetin, AKT1 / 2 ve ornitin dekarboksilazın (ODC) kinaz aktivitelerini doğrudan inhibe eder, ancak MEK veya ERK'ları inhibe etmez. Bu, in vitro ve in vivo modellerde 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene veya güneş UV'si ile indüklenen deri karsinogenezi ve melanomunda tümör büyümesinin baskılanmasına neden olmuştur (Struijs ve ark., 2009; D. Kim ve ark., 2017). Deguelin (Mundulea Sericea), PI3K / AKT sinyal yolunu aşağı regüle ederek tütün kaynaklı akciğer tümör oluşumunu ve premalign insan bronşiyal epitel hücre büyümesini azaltmıştır (Chun ve ark., 2003, Lee ve ark., 2005). Turpgillerden elde edilen sebzelerden elde edilen sülforafan, G2 – M faz durmasını ve osteosarkom hücrelerinin apoptozunu indüklemekte ve 2 Gray radyasyonu ile birlikte AKT ve ERK ekspresyonunu baskılayarak apoptozu indüklediği görülmüştür (Sawai ve ark., 2013; Fahey ve ark., 2015; Angulo ve ark., 2017). Sülforafanın, tümör hücresi büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir çünkü izotiyosiyanat kısmındaki elektrofilik karbon, amino asitler üzerindeki nükleofilik grup ile reaksiyona girer ve bunları kovalent olarak değiştirir ve böylece PI3K, AKT ve NF- κ B'nin kinaz aktivitesini düşürür (Tarozzi ve ark., 2016). Tahranolid (Artemisia diffusa), reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve p-AKT'nin aşağı regülasyonu yoluyla farelerde MCF-7 meme kanseri hücre ksenograftlarındaki büyümeyi azaltmıştır (Noori ve ark., 2012). Meyan kökünden elde edilen izoliquiritigenin proliferasyon ve anjiyogenezin inhibisyonu, hücre döngüsü durması, apoptozunun indüksiyonu ve metastazın engellenmesi gibi antikanser aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (F. Peng ve ark., 2015; L. Chen ve ark 2012). İzoliquiritigenin hem MCF-7 hem de MDA MB-231 meme kanseri hücrelerinde büyümeyi bastırması, apoptozu indüklemiş, araşidonik asit metabolik ağını bastırdığı ve AKT yolunu in vivo inaktive ettiği görülmüştür (Li ve ark., 2013). İzoliquiritigenin, miR-374a ekspresyonunu azaltarak PTEN ekspresyonunu artırır, böylece meme kanseri terapilerinde AKT sinyalini inhibe etmektedir (Li ve ark., 2013; K. Wang ve ark., 2013; F. Peng ve ark., 2017). Scutellarin, aktif bir flavonoiddir ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) / gordon / AKT eksenini inhibe ederek HepG2 hücrelerinin göçünü ve istilasını bloke etmektedir (Ke ve ark., 2017). Resveratrol üzüm, çilek ve yer fıstığında bulunur ve PI3K / AKT yolu da dahil olmak üzere çoklu hayatta kalma yollarının aktivasyonunu inhibe eder, böylece kanser hücresi apoptozunu indüklemektedir (Hussain ve ark., 2011; M. Liu ve ark., 2016). Resveratrolün, sirtuin 1 aracılı posttranslasyonel modifikasyonu değiştirerek ve kemik morfogenetik proteini yükselterek hepatoselüler karsinom ve kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve migrasyonunu PI3K / AKT yolunun aşağı regülasyonu yoluyla inhibe ettiği bildirilmiştir (Chai ve ark., 2017; Zeng ve ark., 2017). Resveratrol, H460 akciğer kanseri hücrelerinde p-AKT ve apoptozis araçlarını hedef alarak apoptozise neden olduğu rapor edilmiştir. (Wright ve ark., 2017). Ayrıca adenosin monofosfat (AMP) ile aktifleştirilmiş protein kinaz (AMPK) ve AKT / mTOR sinyali yoluyla aracılık edilen ilaca dirençli oral kanser hücrelerinde otofajik / apoptotik ölümü de etkilemiştir (Chang ve ark., 2017). Resveratrol, PTEN / PI3K / AKT sinyal yolunun ekspresyonunu düzenleyerek insan mide kanseri MGC803 hücrelerinde hücre döngüsü durmasını indüklemiştir (Jing ve ark., 2016). Platycodon grandiflorum kökünden Platycodin-D, PI3K

/ AKT / mTOR sinyalini inhibe ederek JNK / p38 MAPK sinyal yollarını aktive ederek NSCLC hücrelerinin otofajisini indüklediği bildirilmiştir (R. Zhao ve ark., 2015). Platycodin-D ve sentetik AKT inhibitörü MK-2206 kombinasyonu, AKT yolunun geri besleme aktivasyonunu zayıflatmış ve AKT / 4E-BP1 fonksiyonunun bloke olmasına yol açmıştır. Böylece NSCLC'nin proliferasyonunu ve apoptozunu indüklemiştir (Li ve ark., 2016). Honokiol (*Magnolia officinalis*), U87MG insan glioma veya fare nöroblastom hücrelerinde PI3K / AKT / mTOR sinyalini aşağı regüle ederek otofajik hücre ölümüne neden olmuştur (Yeh ve ark., 2016, C. Lin ve ark., 2016).

4.SONUÇ

AKT, hücrenin metabolizma, büyüme ve çoğalma, hayatta kalma ve apoptozdaki önemli rolü nedeniyle en yoğun şekilde araştırılan moleküllerden biridir. AKT'nin kanserdeki rolü göz önüne alındığında, birçok küçük moleküllü inhibitör keşfedilmiş ve deneme çalışmalarında ilerleme kaydedilmiştir. Ancak bugüne kadar AKT inhibitörlerinin hiçbiri klinik kullanım için onaylanmamıştır. AKT hedefli araştırmalar onkolojik çalışmaların önemli bir alanı olmaya devam etmektedir.

5. KAYNAKÇA

- Algazi A.P., Muthukumar A.H., O'Brien K., Lencioni A., Tsai K.K., Kadafour M., Chapman, P.B., Daud, A. (2015). Phase II trial of trametinib in combination with the AKT inhibitor GSK 2141795 in BRAF wild-type melanoma. *J Clin Oncol* 33:15s, (suppl; abstr 9068).
- Altomare, D. A., & Testa, J. R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24(50), 7455–7464.
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A. H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Kimura, S., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *Journal of lipid research*, 43(8), 1220–1235.
- Angulo, P., Kaushik, G., Subramaniam, D., Dandawate, P., Neville, K., Chastain, K., & Anant, S. (2017). Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 10.
- Askham, J. M., Platt, F., Chambers, P. A., Snowden, H., Taylor, C. F., & Knowles, M. A. (2010). AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K. *Oncogene*, 29(1), 150–155.
- Balendran, A., Casamayor, A., Deak, M., Paterson, A., Gaffney, P., Currie, R., Downes, C. P., & Alessi, D. R. (1999). PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Current biology: CB*, 9(8), 393–404.
- Becher, O. J., Gilheeneey, S. W., Khakoo, Y., Lyden, D. C., Haque, S., De Braganca, K. C., Kolesar, J. M., Huse, J. T., Modak, S., Wexler, L. H., Kramer, K., Spasojevic, I., & Dunkel, I. J. (2017). A phase I study of perifosine with temsirolimus for recurrent pediatric solid tumors. *Pediatric blood & cancer*, 64(7), 10.1002/pbc.26409.
- Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W., Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Benedetti Panici, P., Mancuso, S., Neri, G., & Testa, J. R. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International journal of cancer*, 64(4), 280–285.
- Bellacosa, A., Chan, T. O., Ahmed, N. N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., & Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*, 17(3), 313–325.
- Bendell, J. C., Nemunaitis, J., Vukelja, S. J., Hagenstad, C., Campos, L. T., Hermann, R. C., Sportelli, P., Gardner, L., & Richards, D. A. (2011). Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(33), 4394–4400.
- Berndt, N., Yang, H., Trinczek, B., Betzi, S., Zhang, Z., Wu, B., Lawrence, N. J., Pellecchia, M., Schönbrunn, E., Cheng, J. Q., & Sebt, S. M. (2010). The Akt activation inhibitor TCN-P inhibits Akt phosphorylation by binding to the PH domain of Akt and blocking its recruitment to the plasma membrane. *Cell death and differentiation*, 17(11), 1795–1804.
- Berwick, D. C., Hers, I., Heesom, K. J., Moule, S. K., & Tavare, J. M. (2002). The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 277(37), 33895–33900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204681200>
- Bilodeau, M. T., Balitza, A. E., Hoffman, J. M., Manley, P. J., Barnett, S. F., Defeo-Jones, D., Haskell, K., Jones, R. E., Leander, K., Robinson, R. G., Smith, A. M., Huber, H. E., & Hartman, G. D. (2008).

- Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: a naphthyridinone with efficacy in an A2780 tumor xenograft model. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(11), 3178–3182.
- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y. W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., ... Thomas, J. E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448(7152), 439–444.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, 2(5), 401–404.
- Chai, R., Fu, H., Zheng, Z., Liu, T., Ji, S., & Li, G. (2017). Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular medicine reports*, 16(6), 8037–8044.
- Chan, C. H., Jo, U., Kohrman, A., Rezaeian, A. H., Chou, P. C., Logothetis, C., & Lin, H. K. (2014). Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell & bioscience*, 4(1), 59.
- Chan, C. H., Li, C. F., Yang, W. L., Gao, Y., Lee, S. W., Feng, Z., Huang, H. Y., Tsai, K. K., Flores, L. G., Shao, Y., Hazle, J. D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M. C., Nakayama, K. I., & Lin, H. K. (2012). The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis. *Cell*, 149(5), 1098–1111.
- Chang, C. H., Lee, C. Y., Lu, C. C., Tsai, F. J., Hsu, Y. M., Tsao, J. W., Juan, Y. N., Chiu, H. Y., Yang, J. S., & Wang, C. C. (2017). Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling. *International journal of oncology*, 50(3), 873–882.
- Chee, K. G., Longmate, J., Quinn, D. I., Chatta, G., Pinski, J., Twardowski, P., Pan, C. X., Cambio, A., Evans, C. P., Gandara, D. R., & Lara, P. N., Jr (2007). The AKT inhibitor perifosine in biochemically recurrent prostate cancer: a phase II California/Pittsburgh cancer consortium trial. *Clinical genitourinary cancer*, 5(7), 433–437.
- Chen, G., Hu, X., Zhang, W., Xu, N., Wang, F. Q., Jia, J., Zhang, W. F., Sun, Z. J., & Zhao, Y. F. (2012). Mammalian target of rapamycin regulates isoliquiritigenin-induced autophagic and apoptotic cell death in adenoid cystic carcinoma cells. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 17(1), 90–101.
- Chen, L., Hu, L., Dong, J. Y., Ye, Q., Hua, N., Wong, M., & Zeng, L. H. (2012). Rapamycin has paradoxical effects on S6 phosphorylation in rats with and without seizures. *Epilepsia*, 53(11), 2026–2033.
- Cheng, J. Q., Ruggeri, B., Klein, W. M., Sonoda, G., Altomare, D. A., Watson, D. K., & Testa, J. R. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), 3636–3641.
- Cheraghchi-Bashi, A., Parker, C. A., Curry, E., Salazar, J. F., Gungor, H., Saleem, A., Cunnea, P., Rama, N., Salinas, C., Mills, G. B., Morris, S. R., Kumar, R., Gabra, H., & Stronach, E. A. (2015). A putative biomarker signature for clinically effective AKT inhibition: correlation of in vitro, in vivo and clinical data identifies the importance of modulation of the mTORC1 pathway. *Oncotarget*, 6(39), 41736–41749.
- Cho, D. C., Hutson, T. E., Samlowski, W., Sportelli, P., Somer, B., Richards, P., Sosman, J. A., Puzanov, I., Michaelson, M. D., Flaherty, K. T., Figlin, R. A., & Vogelzang, N. J. (2012). Two phase 2 trials of the

- novel Akt inhibitor perifosine in patients with advanced renal cell carcinoma after progression on vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Cancer*, 118(24), 6055–6062.
- Chun, K. H., Kosmeder, J. W., 2nd, Sun, S., Pezzuto, J. M., Lotan, R., Hong, W. K., & Lee, H. Y. (2003). Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(4), 291–302.
- Crouthamel, M.C., Kahana, J.A., Korenchuk, S., Zhang S.Y., Sundaresan, G., Eberwein, D.J., Brown, K. K., Kumar, R. (2009). Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia. *Clin Cancer Res*;15: 217–25.
- Datta, K., Franke, T. F., Chan, T. O., Makris, A., Yang, S. I., Kaplan, D. R., Morrison, D. K., Golemis, E. A., & Tsichlis, P. N. (1995). AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Molecular and cellular biology*, 15(4), 2304–2310.
- Davies, B. R., Greenwood, H., Dudley, P., Crafter, C., Yu, D. H., Zhang, J., Li, J., Gao, B., Ji, Q., Maynard, J., Ricketts, S. A., Cross, D., Cosulich, S., Chresta, C. C., Page, K., Yates, J., Lane, C., Watson, R., Luke, R., Ogilvie, D., Pass, M. (2012). Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. *Molecular cancer therapeutics*, 11(4), 873–887.
- Do, K., Speranza, G., Bishop, R., Khin, S., Rubinstein, L., Kinders, R. J., Datiles, M., Eugeni, M., Lam, M. H., Doyle, L. A., Doroshov, J. H., & Kummar, S. (2015). Biomarker-driven phase 2 study of MK-2206 and selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with colorectal cancer. *Investigational new drugs*, 33(3), 720–728.
- Dong, C., Wu, J., Chen, Y., Nie, J., & Chen, C. (2021). Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in pharmacology*, 12, 628690.
- Dumble, M., Crouthamel, M. C., Zhang, S. Y., Schaber, M., Levy, D., Robell, K., Liu, Q., Figueroa, D. J., Minthorn, E. A., Seefeld, M. A., Rouse, M. B., Rabindran, S. K., Heerding, D. A., & Kumar, R. (2014). Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PloS one*, 9(6), e100880.
- Erlanson, D. A., Fesik, S. W., Hubbard, R. E., Jahnke, W., & Jhoti, H. (2016). Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 15(9), 605–619.
- Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Wehage, S. L., Wade, K. L., Stephenson, K. K., & Talalay, P. (2015). Sulforaphane Bioavailability from Glucoraphanin-Rich Broccoli: Control by Active Endogenous Myrosinase. *PloS one*, 10(11), e0140963.
- Feun, L. G., Savaraj, N., Bodey, G. P., Lu, K., Yap, B. S., Ajani, J. A., Burgess, M. A., Benjamin, R. S., McKelvey, E., & Krakoff, I. (1984). Phase I study of tricyclic nucleoside phosphate using a five-day continuous infusion schedule. *Cancer research*, 44(8), 3608–3612.
- Guidetti, A., Carlo-Stella, C., Locatelli, S. L., Malorni, W., Mortarini, R., Viviani, S., Russo, D., Marchianò, A., Sorasio, R., Doderò, A., Farina, L., Giordano, L., Di Nicola, M., Anichini, A., Corradini, P., & Gianni, A. M. (2014). Phase II study of perifosine and sorafenib dual-targeted therapy in patients with relapsed or refractory lymphoproliferative diseases. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(22), 5641–5651.
- Hanada, M., Feng, J., & Hemmings, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochimica et biophysica acta*, 1697(1-2), 3–16.
- Harthill, J. E., Pozuelo Rubio, M., Milne, F. C., & MacKintosh, C. (2002). Regulation of the 14-3-3-binding protein p39 by growth factors and nutrients in rat PC12 pheochromocytoma cells. *The Biochemical journal*, 368(Pt 2), 565–572.

- Hay N. (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer cell*, 8(3), 179–183.
- He, Y., Sun, M. M., Zhang, G. G., Yang, J., Chen, K. S., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 425.
- Heerding, D. A., Rhodes, N., Leber, J. D., Clark, T. J., Keenan, R. M., Lafrance, L. V., Li, M., Safonov, I. G., Takata, D. T., Venslavsky, J. W., Yamashita, D. S., Choudhry, A. E., Copeland, R. A., Lai, Z., Schaber, M. D., Tummino, P. J., Strum, S. L., Wood, E. R., Duckett, D. R., Eberwein, D., ... Kumar, R. (2008). Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-[[[(3S)-3-piperidinylmethyl]oxy]-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl]-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase. *Journal of medicinal chemistry*, 51(18), 5663–5679.
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a011189.
- Hers, I., Vincent, E. E., & Tavaré, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*, 23(10), 1515–1527.
- Hoffman K, Holmes FA, Frascini G, Esparza L, Frye D, Raber MN, Newman RA, Hortobagyi GN. Phase I–II study: Triciribine (tricyclic nucleoside phosphate) for metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;37:254–258.
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12027–12032.
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature reviews. Cancer*, 20(2), 74–88.
- Hussain, A. R., Uddin, S., Bu, R., Khan, O. S., Ahmed, S. O., Ahmed, M., & Al-Kuraya, K. S. (2011). Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. *PloS one*, 6(9), e24703.
- Hyman, D. M., Smyth, L. M., Donoghue, M. T. A., Westin, S. N., Bedard, P. L., Dean, E. J., Bando, H., El-Khoueiry, A. B., Pérez-Fidalgo, J. A., Mita, A., Schellens, J. H. M., Chang, M. T., Reichel, J. B., Bouvier, N., Selcuklu, S. D., Soumerai, T. E., Torrisi, J., Erinjeri, J. P., Ambrose, H., Barrett, J. C., ... Taylor, B. S. (2017). AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(20), 2251–2259.
- Jing, X., Cheng, W., Wang, S., Li, P., & He, L. (2016). Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway. *Oncology reports*, 35(1), 472–478.
- Kapetanovic, I. M., Muzzio, M., Hu, S. C., Crowell, J. A., Rajewski, R. A., Haslam, J. L., Jong, L., & McCormick, D. L. (2010). Pharmacokinetics and enhanced bioavailability of candidate cancer preventative agent, SR13668 in dogs and monkeys. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 65(6), 1109–1116. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1116-4>
- Ke, Y., Bao, T., Wu, X., Tang, H., Wang, Y., Ge, J., Fu, B., Meng, X., Chen, L., Zhang, C., Tan, Y., Chen, H., Guo, Z., Ni, F., Lei, X., Shi, Z., Wei, D., & Wang, L. (2017). Scutellarin suppresses migration and invasion of human hepatocellular carcinoma by inhibiting the STAT3/Girdin/Akt activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), 509–515.
- Kim, D. J., Lee, M. H., Liu, K., Lim, D. Y., Roh, E., Chen, H., Kim, S. H., Shim, J. H., Kim, M. O., Li, W., Ma, F., Fredimoses, M., Bode, A. M., & Dong, Z. (2017). Herbacetin suppresses cutaneous squamous

- cell carcinoma and melanoma cell growth by targeting AKT and ODC. *Carcinogenesis*, 38(11), 1136–1146.
- Kim, J. S., Lee, S. I., Park, H. W., Yang, J. H., Shin, T. Y., Kim, Y. C., Baek, N. I., Kim, S. H., Choi, S. U., Kwon, B. M., Leem, K. H., Jung, M. Y., & Kim, D. K. (2008). Cytotoxic components from the dried rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe. *Archives of pharmacal research*, 31(4), 415–418.
- Kim, K., Li, J., Barazia, A., Tseng, A., Youn, S. W., Abbadessa, G., Yu, Y., Schwartz, B., Andrews, R. K., Gordeuk, V. R., & Cho, J. (2017). ARQ 092, an orally-available, selective AKT inhibitor, attenuates neutrophil-platelet interactions in sickle cell disease. *Haematologica*, 102(2), 246–259.
- Kim, M. O., Lee, M. H., Oi, N., Kim, S. H., Bae, K. B., Huang, Z., Kim, D. J., Reddy, K., Lee, S. Y., Park, S. J., Kim, J. Y., Xie, H., Kundu, J. K., Ryoo, Z. Y., Bode, A. M., Surh, Y. J., & Dong, Z. (2014). [6]-shogaol inhibits growth and induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells by directly regulating Akt1/2. *Carcinogenesis*, 35(3), 683–691.
- Knobbe, C. B., & Reifenberger, G. (2003). Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 13(4), 507–518.
- Kovacina, K. S., Park, G. Y., Bae, S. S., Guzzetta, A. W., Schaefer, E., Birnbaum, M. J., & Roth, R. A. (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *The Journal of biological chemistry*, 278(12), 10189–10194.
- Kumar, C. C., & Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*, 24(50), 7493–7501.
- Kushner, B. H., Cheung, N. V., Modak, S., Becher, O. J., Basu, E. M., Roberts, S. S., Kramer, K., & Dunkel, I. J. (2017). A phase I/II trial targeting the PI3K/Akt pathway using perifosine: Long-term progression-free survival of patients with resistant neuroblastoma. *International journal of cancer*, 140(2), 480–484.
- Larsen, J. T., Shanafelt, T. D., Leis, J. F., LaPlant, B., Call, T., Pettinger, A., Hanson, C., Erlichman, C., Habermann, T. M., Reeder, C., Nikcevich, D., Bowen, D., Conte, M., Boysen, J., Secreto, C., Lesnick, C., Tschumper, R., Jelinek, D., Kay, N. E., & Ding, W. (2017). Akt inhibitor MK-2206 in combination with bendamustine and rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: Results from the N1087 alliance study. *American journal of hematology*, 92(8), 759–763.
- Lee, H. Y., Oh, S. H., Woo, J. K., Kim, W. Y., Van Pelt, C. S., Price, R. E., Cody, D., Tran, H., Pezzuto, J. M., Moriarty, R. M., & Hong, W. K. (2005). Chemopreventive effects of deguelin, a novel Akt inhibitor, on tobacco-induced lung tumorigenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22), 1695–1699.
- Li, Y., Zhao, H., Wang, Y., Zheng, H., Yu, W., Chai, H., Zhang, J., Falck, J. R., Guo, A. M., Yue, J., Peng, R., & Yang, J. (2013). Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(1), 37–48.
- Lin, C. J., Chen, T. L., Tseng, Y. Y., Wu, G. J., Hsieh, M. H., Lin, Y. W., & Chen, R. M. (2016). Honokiol induces autophagic cell death in malignant glioma through reactive oxygen species-mediated regulation of the p53/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Toxicology and applied pharmacology*, 304, 59–69.
- Lin, J., Sampath, D., Nannini, M. A., Lee, B. B., Degtyarev, M., Oeh, J., Savage, H., Guan, Z., Hong, R., Kassees, R., Lee, L. B., Risom, T., Gross, S., Liederer, B. M., Koeppen, H., Skelton, N. J., Wallin, J. J., Belvin, M., Punnoose, E., Friedman, L. S., ... Lin, K. (2013). Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(7), 1760–1772.

- Lindhurst, M. J., Yourick, M. R., Yu, Y., Savage, R. E., Ferrari, D., & Biesecker, L. G. (2015). Repression of AKT signaling by ARQ 092 in cells and tissues from patients with Proteus syndrome. *Scientific reports*, 5, 17162.
- Lindsley, C. W., Zhao, Z., Leister, W. H., Robinson, R. G., Barnett, S. F., Defeo-Jones, D., Jones, R. E., Hartman, G. D., Huff, J. R., Huber, H. E., & Duggan, M. E. (2005). Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(3), 761–764.
- Liu, J., Eckert, M. A., Harada, B. T., Liu, S. M., Lu, Z., Yu, K., Tienda, S. M., Chryplewicz, A., Zhu, A. C., Yang, Y., Huang, J. T., Chen, S. M., Xu, Z. G., Leng, X. H., Yu, X. C., Cao, J., Zhang, Z., Liu, J., Lengyel, E., & He, C. (2018). m⁶A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer. *Nature cell biology*, 20(9), 1074–1083.
- Liu, M. H., Lin, X. L., Li, J., He, J., Tan, T. P., Wu, S. J., Yu, S., Chen, L., Liu, J., Tian, W., Chen, Y. D., Fu, H. Y., Yuan, C., & Zhang, Y. (2016). Resveratrol induces apoptosis through modulation of the Akt/FoxO3a/Bim pathway in HepG2 cells. *Molecular medicine reports*, 13(2), 1689–1694.
- Liu, P., Begley, M., Michowski, W., Inuzuka, H., Ginzberg, M., Gao, D., Tsou, P., Gan, W., Papa, A., Kim, B. M., Wan, L., Singh, A., Zhai, B., Yuan, M., Wang, Z., Gygi, S. P., Lee, T. H., Lu, K. P., Toker, A., Pandolfi, P. P., ... Wei, W. (2014). Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature*, 508(7497), 541–545.
- Malanga, D., Scrima, M., De Marco, C., Fabiani, F., De Rosa, N., De Gisi, S., Malara, N., Savino, R., Rocco, G., Chiappetta, G., Franco, R., Tirino, V., Pirozzi, G., & Viglietto, G. (2008). Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(5), 665–669.
- Manning, B. D., Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405.
- Manning, B. D., Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274.
- Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., & Cantley, L. C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell*, 10(1), 151–162.
- Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F., & Hirsch, E. (2014). PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of medicine*, 46(6), 372–383.
- Mohamedali, A., Lea, N. C., Feakins, R. M., Raj, K., Mufti, G. J., & Kocher, H. M. (2008). AKT1 (E17K) mutation in pancreatic cancer. *Technology in cancer research & treatment*, 7(5), 407–408.
- Momota, H., Nerio, E., & Holland, E. C. (2005). Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer research*, 65(16), 7429–7435.
- Mundi, P. S., Sachdev, J., McCourt, C., & Kalinsky, K. (2016). AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British journal of clinical pharmacology*, 82(4), 943–956.
- Nakakido, M., Deng, Z., Suzuki, T., Dohmae, N., Nakamura, Y., & Hamamoto, R. (2015). Dysregulation of AKT Pathway by SMYD2-Mediated Lysine Methylation on PTEN. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 17(4), 367–373.
- Nakatani, K., Thompson, D. A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R. J., & Roth, R. A. (1999). Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *The Journal of biological chemistry*, 274(31), 21528–21532.

- Nitulescu, G. M., Van De Venter, M., Nitulescu, G., Ungurianu, A., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O. T., Grădinaru, D., Tsatsakis, A., Tsoukalas, D., Spandidos, D. A., & Margina, D. (2018). The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *International journal of oncology*, 53(6), 2319–2331.
- Okuzumi, T., Fiedler, D., Zhang, C., Gray, D. C., Aizenstein, B., Hoffman, R., & Shokat, K. M. (2009). Inhibitor hijacking of Akt activation. *Nature chemical biology*, 5(7), 484–493.
- Pachl, F., Plattner, P., Ruprecht, B., Médard, G., Sewald, N., & Kuster, B. (2013). Characterization of a chemical affinity probe targeting Akt kinases. *Journal of proteome research*, 12(8), 3792–3800.
- Parsons, D. W., Wang, T. L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J. M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Lengauer, C., & Velculescu, V. E. (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature*, 436(7052), 792.
- Patel, V., Lahusen, T., Sy, T., Sausville, E. A., Gutkind, J. S., & Senderowicz, A. M. (2002). Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest. *Cancer research*, 62(5), 1401–1409.
- Peng, F., Du, Q., Peng, C., Wang, N., Tang, H., Xie, X., Shen, J., & Chen, J. (2015). A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. *Phytotherapy research: PTR*, 29(7), 969–977.
- Peng, F., Tang, H., Liu, P., Shen, J., Guan, X., Xie, X., Gao, J., Xiong, L., Jia, L., Chen, J., Peng, C. (2017). Isoliquiritigenin modulates miR-374a/PTEN/Akt axis to suppress breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep* 7, 9022
- Politz, O., Siegel, F., Bärfacker, L., Bömer, U., Hägebarth, A., Scott, W. J., Michels, M., Ince, S., Neuhaus, R., Meyer, K., Fernández-Montalván, A. E., Liu, N., von Nussbaum, F., Mumberg, D., & Ziegelbauer, K. (2017). BAY 1125976, a selective allosteric AKT1/2 inhibitor, exhibits high efficacy on AKT signaling-dependent tumor growth in mouse models. *International journal of cancer*, 140(2), 449–459.
- Ranieri, C., Di Tommaso, S., Loconte, D. C., Grossi, V., Sanese, P., Bagnulo, R., Susca, F. C., Forte, G., Peserico, A., De Luisi, A., Bartuli, A., Selicorni, A., Melis, D., Lerone, M., Praticò, A. D., Abbadessa, G., Yu, Y., Schwartz, B., Ruggieri, M., Simone, C., Resta, N. (2018). In vitro efficacy of ARQ 092, an allosteric AKT inhibitor, on primary fibroblast cells derived from patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Neurogenetics*, 19(2), 77–91.
- Reid, J. M., Walden, C.A., Qin, R., Ziegler, K. L., Haslam, J. L., Rajewski, R. A., Warndahl, R., Fitting, C. L., Boring, D., Szabo, E., Crowell, J., Perloff M., Jong, L., Bauer B. A., Ames M. M., Limburg, P. J. (2011). Cancer Prevention Network: Phase 0 clinical chemoprevention trial of the Akt inhibitor SR13668. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:347–353.
- Revathidevi, S., Munirajan, A. K. (2019). Akt in cancer: Mediator and more. *Seminars in cancer biology*, 59, 80–91.
- Rhodes, N., Heerding, D. A., Duckett, D. R., Eberwein, D. J., Knick, V. B., Lansing, T. J., McConnell, R. T., Gilmer, T. M., Zhang, S. Y., Robell, K., Kahana, J. A., Geske, R. S., Kleymenova, E. V., Choudhry, A. E., Lai, Z., Leber, J. D., Minthorn, E. A., Strum, S. L., Wood, E. R., Huang, P. S., Copeland, R. A., Kumar, R. (2008). Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer research*, 68(7), 2366–2374.
- Romorini, L., Garate, X., Neiman, G., Luzzani, C., Furmento, V. A., Guberman, A. S., Sevlever, G. E., Scassa, M. E., & Miriuka, S. G. (2016). AKT/GSK3 β signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival. *Scientific reports*, 6, 35660.

- Roy, H. K., Olusola, B. F., Clemens, D. L., Karolski, W. J., Ratashak, A., Lynch, H. T., & Smyrk, T. C. (2002). AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 23(1), 201–205.
- Sampath, D., Malik, A., Plunkett, W., Nowak, B., Williams, B., Burton, M., Verstovsek, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., List, A. F., Sebt, S., Kantarjian, H. M., Ravandi, F., & Lancet, J. E. (2013). Phase I clinical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the Akt-inhibitor triciribine phosphate monohydrate in patients with advanced hematologic malignancies. *Leukemia research*, 37(11), 1461–1467.
- Saura, C., Roda, D., Roselló, S., Oliveira, M., Macarulla, T., Pérez-Fidalgo, J. A., Morales-Barrera, R., Sanchis-García, J. M., Musib, L., Budha, N., Zhu, J., Nannini, M., Chan, W. Y., Sanabria Bohórquez, S. M., Meng, R. D., Lin, K., Yan, Y., Patel, P., Baselga, J., Tabernero, J., ... Cervantes, A. (2017). A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors. *Cancer discovery*, 7(1), 102–113.
- Sawai, Y., Murata, H., Horii, M., Koto, K., Matsui, T., Horie, N., Tsuji, Y., Ashihara, E., Maekawa, T., Kubo, T., & Fushiki, S. (2013). Effectiveness of sulforaphane as a radiosensitizer for murine osteosarcoma cells. *Oncology reports*, 29(3), 941–945.
- She, Q. B., Halilovic, E., Ye, Q., Zhen, W., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Solit, D. B., & Rosen, N. (2010). 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer cell*, 18(1), 39–51.
- Shoji, K., Oda, K., Nakagawa, S., Hosokawa, S., Nagae, G., Uehara, Y., Sone, K., Miyamoto, Y., Hiraike, H., Hiraike-Wada, O., Nei, T., Kawana, K., Kuramoto, H., Aburatani, H., Yano, T., & Taketani, Y. (2009). The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *British journal of cancer*, 101(1), 145–148.
- Singh, S., Ramamoorthy, M., Vaughan, C., Yeudall, W. A., Deb, S., & Palit Deb, S. (2013). Human oncoprotein MDM2 activates the Akt signaling pathway through an interaction with the repressor element-1 silencing transcription factor conferring a survival advantage to cancer cells. *Cell death and differentiation*, 20(4), 558–566.
- Slattery, M. L., Mullany, L. E., Sakoda, L. C., Wolff, R. K., Stevens, J. R., Samowitz, W. S., & Herrick, J. S. (2018). The PI3K/AKT signaling pathway: Associations of miRNAs with dysregulated gene expression in colorectal cancer. *Molecular carcinogenesis*, 57(2), 243–261.
- Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(1), 59–71.
- Song, M., Liu, X., Liu, K., Zhao, R., Huang, H., Shi, Y., Zhang, M., Zhou, S., Xie, H., Chen, H., Li, Y., Zheng, Y., Wu, Q., Liu, F., Li, E., Bode, A. M., Dong, Z., & Lee, M. H. (2018). Targeting AKT with Oridonin Inhibits Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma *In Vitro* and Patient-Derived Xenografts *In Vivo*. *Molecular cancer therapeutics*, 17(7), 1540–1553.
- Staal S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(14), 5034–5037.
- Struijs, K., Vincken, J. P., Doeswijk, T. G., Voragen, A. G., & Gruppen, H. (2009). The chain length of lignan macromolecule from flaxseed hulls is determined by the incorporation of coumaric acid glucosides and ferulic acid glucosides. *Phytochemistry*, 70(2), 262–269.
- Tarozzi, A., Marchetti, C., Nicolini, B., D'Amico, M., Ticchi, N., Pruccoli, L., Tumiatti, V., Simoni, E., Lodola, A., Mor, M., Milelli, A., & Minarini, A. (2016). Combined inhibition of the EGFR/AKT pathways by a

- novel conjugate of quinazoline with isothiocyanate. *European journal of medicinal chemistry*, 117, 283–291.
- Vandamme, T., Beyens, M., Boons, G., Schepers, A., Kamp, K., Biermann, K., Pauwels, P., De Herder, W. W., Hofland, L. J., Peeters, M., Van Camp, G., & Op de Beeck, K. (2019). Hotspot DAXX, PTCH2 and CYFIP2 mutations in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocrine-related cancer*, 26(1), 1–12.
- Vander Haar, E., Lee, S. I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J., & Kim, D. H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology*, 9(3), 316–323.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(5), 329–341.
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., & Reed, J. C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5412), 339–343.
- Wang, K. L., Hsia, S. M., Chan, C. J., Chang, F. Y., Huang, C. Y., Bau, D. T., & Wang, P. S. (2013). Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(4), 337–349.
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Signaling in control of cell growth and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(7), a006783.
- Weng, C. J., Chou, C. P., Ho, C. T., & Yen, G. C. (2012). Molecular mechanism inhibiting human hepatocarcinoma cell invasion by 6-shogaol and 6-gingerol. *Molecular nutrition & food research*, 56(8), 1304–1314.
- Wright, C., Iyer, A. K. V., Yakisich, J. S., & Azad, N. (2017). Anti-Tumorigenic Effects of Resveratrol in Lung Cancer Cells Through Modulation of c-FLIP. *Current cancer drug targets*, 17(7), 669–680.
- Wu, H., Hsieh, M. C., Lo, C. Y., Liu, C. B., Sang, S., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2010). 6-Shogaol is more effective than 6-gingerol and curcumin in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion in mice. *Molecular nutrition & food research*, 54(9), 1296–1306.
- Xu, X., Sakon, M., Nagano, H., Hiraoka, N., Yamamoto, H., Hayashi, N., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K., Ito, Y., Matsuura, N., Monden, M. (2004). Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 11, 25–32.
- Yang, L., Dan, H. C., Sun, M., Liu, Q., Sun, X. M., Feldman, R. I., Hamilton, A. D., Polokoff, M., Nicosia, S. V., Herlyn, M., Sebt, S. M., & Cheng, J. Q. (2004). Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer research*, 64(13), 4394–4399.
- Yang, W. L., Wang, J., Chan, C. H., Lee, S. W., Campos, A. D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B. C., Lin, X., Darnay, B. G., & Lin, H. K. (2009). The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5944), 1134–1138.
- Yang, W. L., Wu, C. Y., Wu, J., & Lin, H. K. (2010). Regulation of Akt signaling activation by ubiquitination. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(3), 487–497.
- Yap, T. A., Walton, M. I., Hunter, L. J., Valenti, M., de Haven Brandon, A., Eve, P. D., Ruddle, R., Heaton, S. P., Henley, A., Pickard, L., Vijayaraghavan, G., Caldwell, J. J., Thompson, N. T., Aherne, W., Raynaud, F. I., Eccles, S. A., Workman, P., Collins, I., & Garrett, M. D. (2011). Preclinical pharmacology, antitumor activity, and development of pharmacodynamic markers for the novel, potent AKT inhibitor CCT128930. *Molecular cancer therapeutics*, 10(2), 360–371.

- Yeh, P. S., Wang, W., Chang, Y. A., Lin, C. J., Wang, J. J., & Chen, R. M. (2016). Honokiol induces autophagy of neuroblastoma cells through activating the PI3K/Akt/mTOR and endoplasmic reticular stress/ERK1/2 signaling pathways and suppressing cell migration. *Cancer letters*, 370(1), 66–77.
- Zeng, Y. H., Zhou, L. Y., Chen, Q. Z., Li, Y., Shao, Y., Ren, W. Y., Liao, Y. P., Wang, H., Zhu, J. H., Huang, M., He, F., Wang, J., Wu, K., & He, B. C. (2017). Resveratrol inactivates PI3K/Akt signaling through upregulating BMP7 in human colon cancer cells. *Oncology reports*, 38(1), 456–464.
- Zhao, R., Chen, M., Jiang, Z., Zhao, F., Xi, B., Zhang, X., Fu, H., Zhou, K. (2015). Platycodin-D Induced Autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer Cells via PI3K/Akt/mTOR and MAPK Signaling Pathways. *Journal of Cancer*, 6(7), 623–631.
- Zhao, Z., Leister, W. H., Robinson, R. G., Barnett, S. F., Defeo-Jones, D., Jones, R. E., Hartman, G. D., Huff, J. R., Huber, H. E., Duggan, M. E., & Lindsley, C. W. (2005). Discovery of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(4), 905–909.

BÖLÜM 12

PARAZİTER HASTALIKLARDA KULLANILAN İLAÇLARDAKİ DİRENÇ SORUNU

Bilim Uzmanı Leyla GÜNDÜZ

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051770>

1.GİRİŞ

Dünya üzerinde yaygın olarak görülen birçok paraziter enfeksiyona karşı geliştirilmiş en önemli iki etken, ilaçlar ve korunma olarak bilinmektedir. Parazitin hücre içinde çoğalmasını engellemek için ilaçların konak hücre içindeki parazite ve bu parazit için hedefine ulaşması gerekmektedir. İlaç hedefini vurduktan sonra parazitin savunması pek mümkün olmamaktadır. Parazitler, ilaçlarla etkileşime girdiği zaman "ilaç direnci" oluşmaktadır. Antiparaziter ilaçlara karşı direnç, parazitlerin önerilen dozda veya daha fazla, fakat tolerans limitinde ilaç verildiği zaman, parazitlerin yaşamlarına ve çoğalmaya devam etmeleri olarak tanımlanabilmektedir. İlaçların hücre içi hedeflerinin bulunması ilaç analoglarının geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Antiparaziter ilaçlarla ilgili en sık görülen sorun, tüm paraziter insan ve hayvan enfeksiyonu ve infestasyonu etkenlerindeki antiparaziter ilaçlara direnç gelişiminin uluslararası düzeyde araştırılmamasından kaynaklanmaktadır. Çünkü direnç araştırma yöntemleri zordur ve halen standardize edilememiştir (Alker ve ark., 2004).Parazit hastalıklarından korunmada esas olan aşı geliştirme çalışmaları hızlanmalı ve antiparaziter ilaçların geliştirilmesine önem verilmelidir.

1.1.İlaç Direncindeki Potansiyel Mekanizmalar

Parazit hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan olumsuzluklardaki en önemli etmenler şu şekilde sıralanabilir;

- ✓ Parazitin ilacın oluşturduğu tahribatı tamir etme de etkili olması,
- ✓ İlacın hedeflerinde oluşan değişikliklerle, hedefin ilaca daha az duyarlı duruma gelmesi,
- ✓ İlacın aktivasyon mekanizmalarının süpresyonu ve kaybı gibi durumlar,
- ✓ Parazit tarafından ilaçların bazı taşıyıcı proteinlerle dışarı atılması, parazit içinde ilaç birikiminin azalması,

1.2. Leishmaniosis de İlaça Karşı Direnç

Leishmania türleri arasında moleküler ve biyokimyasal farklılıkların oluşu, türlerin intrinsik ilaç duyarlılığında değişimlere yol açmaktadır, Pentavalan antimon bileşikleri (sodium stibogluconate ve meglumine antimoniate) tedavide tercih edilen ilk ilaçlardır. Endemik bölgelerde tedavide başarısızlık olduğu bildirilmiştir. Özellikle HIV-1 koinfeksiyonu tedaviyi baskılamaktadır. Etki mekanizmaları tam anlamıyla tanımlanamamıştır. Parazitin metabolik fonksiyonunun parazitik ATP'nin esas kaynağı olan glikolizis enzimlerinin inhibisyonu yoluyla bozulduğu ileri sürülmüştür. Dirençli parazitlerde hücre içi ilaç birikiminde bir azalma saptanmıştır. Leishmaniosiste antifolat direnci, taşıyıcıdaki değişikliklere bağlı olarak ilacın alımındaki azalma, inhibe edilen DHFR enzim sentezinde artış, antifolatlara afinitesi azalmış değişmiş DFIFR yapımı gibi faktörlere bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir.

1.3. Sıtma'da İlaça Karşı Direnç

Bu hastalık özellikle; Afrika, Hindistan, Güney ve Orta Amerika, Orta Doğu, Güney Doğu Asya ve Okyanusya gibi çoğu tropikal bölgelerde endemiktir. İlaç direnci genelde rastgele mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı ilaçlarda tek bir nokta mutasyonu, bazılarında ise çoklu mutasyonlar oluşabilmektedir. İlaç baskısıyla dirençli parazitler yaşamakta ve baskı kalktıktan sonra da direnç uzun süre daha devam edebilmektedir. Çoklu ilaç direnci gösteren Plasmodium falciparum ve klorokin veya primakin dirençli Plasmodium vivax suşları son yıllarda çok fazla önem kazanmıştır. Bazı bulgulara göre, bazı vektör türleri de ilaç direncinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin Güneydoğu Asya' da "Anopheles stephensi" ve "Anopheles dirus" türü vektörlerin ilaca dirençli parazitlere daha duyarlı oldukları bildirilmiştir. Klorokin parazitin besin vakuolünde birikerek, parazitin gelişmesini inhibe eden bir ilaç olarak bilinmektedir. İlacın olmadığı ortamlarda parazitler, hemoglobini parçalayarak toksik ürünler oluşumuna yol açmaktadırlar. Bu

ürünler besin vakuolünde polimerize edilerek toksik olmayan hemozoin (malaria pigmenti) oluşmaktadır. *P. falciparum*'da direnç olduğu durumlarda klorokinin hücre dışına atılım kapasitesi (efflux) artmakta ve ilacın hemoglobin polimerizasyonunu inhibe edecek orana erişmesi engellenmektedir. Klorokin direncinin multifaktöriyel ve multigenik bir görüngü olduğu düşünülmektedir. *P. falciparum*'da Klorokin direnciyle ilgili 5 gen saptanmıştır (Fidock ve ark., 2001).

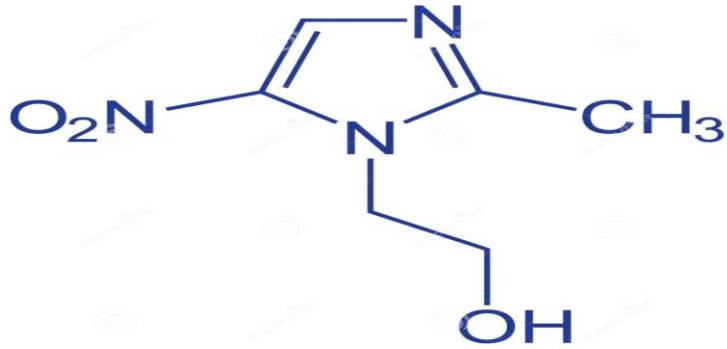
1.4. Toxoplasmosis'te İlaç Karşı Direnç

Hastalık durumunda insanlarda bazen uzun süreli bir tedaviye ihtiyaç duyulabilmektedir. Bu açıdan teorik olarak direnç göstermesi beklenmektedir, fakat dirençli suşların kişiler arasında geçiş göstermediği için büyük problem yaratmayacağı düşünülmektedir. İlaç hedefinin belirlenmesi açısından direnç çalışmaları oldukça önem arz etmiştir. Direnç durumunun klinik önemi tam anlamıyla bilinmemektedir. Toxoplasmosiste pyrimetamine direnci bildirilmiştir. Parazitin kronik bradizoit dönemine etkili, mitokondriyal elektron transportunu inhibe eden Atovaguone direncinin mutasyonlara bağlı olduğu düşünülmektedir. Linkozamid, makrolidler ve kloramfenikol gibi ilaçlarda "apikoplast" adı verilen plastid benzeri organel hedeftir. Apikoplast rRNA'sındaki mutasyonlar dirençle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2004; McFadden ve ark., 2001).

1.5. *Giardiasis Intestinalis*'te İlaç Karşı Direnç

Giardia intestinalis enfeksiyonu semptomatik olmayan seyirden, akut diyare veya kronik seyre kadar değişkenlik gösterir. *G. intestinalis* için klinik direnç prevalans düzeyi %20, hastalığın tekrar etme düzeyi ise %90 olarak bildirilmiştir. Metronidazol ve furazolidon tedavisi uygulanan hastalardan bu ilaçlara dirençli suşlar izole edilmiş, metronidazole dirençli *G. intestinalis* suşlarında ise tinidazole de çapraz direnç saptanmıştır. In vitro olarak geliştirilen furazolidona dirençli *G. intestinalis* suşlarının kinakrin direncine daha kolay adapte olduğu gözlenmiştir. Benzimidazoller mikrotübüllere yüksek afinite gösteren selektif antiprotozoal ilaçlar olarak bilinmektedir. Benzimidazoller *G. intestinalis* üzerindeki toksik etkisini, parazitin tubulin mikrotübüllerine bağlanarak göstermektedirler. Bunun sonucu olarak mikrotübül polimerizasyonu inhibe edilmekte ve glikoz alımı kısıtlanmaktadır. Ayrıca *G. intestinalis*'in B-tubulinlerindeki nokta mutasyonları da bu ajanların farmakolojik etkisine direnç oluşturarak kullanımlarını sınırlandırmaktadır. *G. intestinalis* suşlarından saflaştırılan piruvat: Ferredoksin oksidoredüktaz (PFOR) ve ferredoksinin in vitro olarak metronidazolü aktive ettiği bildirilmiştir.

Metronidazole



Şeki 1. 1. Metronidazol iskelet vektör formülü /ilaç kimyasal molekül (Anonim 1, 2023)

Metronidazole dirençli *G. intestinalis* suşlarında PFOR düzeyinin beş kat daha azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgu dirençli suşlarda aktivite gösteren ikinci bir enzimin kontrol mekanizmasının varlığını

göstermektedir. Bu enzim 2- oksaloasetat oksidoredüktaz enzimi olup azalan PFOR enziminin yerine geçer. Bu enzimin substratı Z-ketobütirat ferredoksinlere her zaman elektron vermemekte ve yüksek redoks potansiyelleri nedeni ile metronidazolün aktivasyonunu bloke etmektedir. Arttırılmış metronidazol dışa atım mekanizması da dirençte önemli rol oynamaktadır. PFORın furazolidona dirençli Giardia suşlarında azalmadığı ve bu suşların aynı zamanda kinakrine de dirençli olduğu bildirilmiştir (Upcroft ve Cambell, 1996). Albendazole direnç metronidazole dirençli Giardia suşlarında deneysel olarak kolayca oluşturulmuş ve bu yolla çoğul ilaç dirençli fenotip elde edilmiştir.

1.6. *Trichomoniosis Vaginalis*'te İlaça Karşı Direnç

T.vaginalis tedavisinde kullanılan metronidazol, bu protozoona özgül olan hidrogenazomda, hidrogenaz aktivitesine bağlı olarak aktif hale gelmektedir. Metronidazol direnci *T. vaginalis*'te iki şekilde görülmektedir. Oksijen varlığında oksijen, elektron alıcısı olarak metronidazolla rekabete girmektedir ve bu nedenle öncü ilaç olarak protozoona giren metronidazol indirgenemeyerek aktivite kazanamamaktadır. Anaerob ortamda ise, metabolik yolla piruvat ferredoksin oksidoredüktaz aktivitesi azalarak piruvattan asetil CoA oluşumunun azalmasına neden olmaktadır, *T.vaginalis*'in asıl inhibisyonunu ferredoksin enzimine yaptığı bu enziminde metronidazol indirgenmesinde etkin olduğu ve direncin özellikle bu inhibisyon sonrasında olduğu saptanmıştır (Wassmann ve ark., 1999).

1.7. Helment Hastalıklarında İlaça Karşı Direnç

Helmentlerde direnç gelişimine neden olan başlıca dört faktör bildirilmiştir (Barnes ve ark. 1995, Bartley ve ark.,2003).

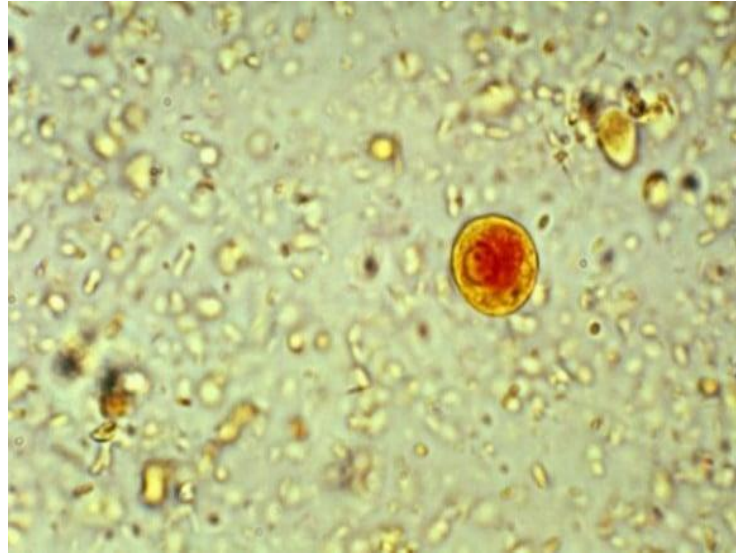
- I. Helmintlerin konaktaki sayısı: Nematodlarda veya diğer parazitlerde direnç gelişmesindeki en çok karşılaşılan sorun, bu parazitlerin tedaviden kurtularak yeni jenerasyonlar üretebilmeleridir. Bu sebeple tedavi sonrası, canlı kalan parazitlerin oranını arttıran her türlü davranışın (antihelmintiklerin sık kullanılması gibi) direnç gelişimini arttırabileceği ihtimali bildirilmektedir.
- II. Benzimidazol hariç olmak üzere çok kullanılan antihelmintiklere duyarlılığı saptayan deneylerin henüz tam anlamıyla standardize edilememesi sebebiyle direnç genlerinin dağılımı hakkındaki bilgilerimiz sınırlı kalmıştır, ,ama yine de, parazitlerin ilaçlara duyarlılığı ve direnç genleri sıklığının bölgesel farklılıklar göstermektedir.
- III. Nematodların bir türüne ait populasyonda birbirinin aynı gibi görünmüş olsa da aslında aralarında genetik farklılıklar bulunmaktadır. Genetik farklılıklar antihelmintiklerin işlev görmesini sağlayan reseptör bölgeler ile ilgili genlerdeki mutasyonlar sonucunda, enzimlerin ve antihelmintiklerin transportunu ve metabolizmasını etkileyen değişiklikler olarak bilinmektedir. Nematodlar antihelmintiklerle düzenli bir şekilde karşı karşıya kaldığında genomlarında değişiklik oluşturma avantajı yakalamaktadır.
- IV. Genin resesif veya dominant olma durumu: Helmintlerde direnç genleri dominant olduğunda direnç daha hızlı bir şekilde gelişmektedir. Direnç gelişimindeki hız, dirençli helmintlerin duyarlılardan daha fazla olması veya daha dayanıksız olmasından etkilenmektedir, bu anlamda dayanıklılık ise yumurtlama oranı, konakta ve doğada canlı kalma yeteneği, sindirildiğindeki infektivitesi ve doğada göç etme yeteneği ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda dirençli helmintlerin farklı biyolojik formlarının, duyarlı olanlarla karşılaşmasının da direnç gelişiminde büyük bir rol oynadığı bildirilmiştir (Barnes ve ark., 1995).

Microsporidia türleri, *G.intestinalis*, nematodlar ve cestodların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde genellikle benzimidazol kullanılmaktadır. Albendazol ve mebendazolün antiparazitik aktivitesi, asıl olarak parazitin B-tubulin adı verilen sitoskeletal proteinine bağlanma yetenekleri sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda mikrotübüller içindeki tubulinin polimerizasyonu inhibe edilmektedir, parazitin intestinal hücreleri içindeki mikrotübül sentezinin engellenmesi sonucunda, absorpsiyon işlevi

azalmaktadır. Ayrıca bunlara ek olarak mebendazol ve albendazol parazitin glikoz absorpsiyonunu doğrudan inhibe ederek parazitin glikojen depolarının azalmasına neden olmaktadır. Parazitler bu nedenle ATP üretimi için yeterli enerji kaynağına sahip olamayıp canlılıklarını kaybetmektedirler. Tubulin memeli konaklarda da bulunmasına rağmen benzimidazol parazit tubulinlerine yüz kat daha fazla afinite ile bağlanmaktadır. Benzimidazolere dirençte son yıllarda hücre membran dışı atım pompası işlevi gören P-glikoproteininin de (Pgp) önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Geerts ve ark., 2000; Ross ve ark., 1995). İvermektin, eski dönemlerde sıklıkla yalnızca hayvanlarda kullanılırken günümüzde insanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş spektrumlu antihelmintik aktiviteye sahip olan bu ilaç, Mikrofilaryalar, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius uermicularis*, deri larva migransı enfeksiyonları ile aynı zamanda bit ve uyuz gibi parazit infestasyonlarında kullanılmaktadır. Etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle beraber sinir ve kas hücreleri zarlarındaki glutamat girişli klorür kanalları boyunca klorür iyonlarının emilimine neden olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak bu durumdan etkilenen hücreler hiperpolarizasyona uğramakta ve bu da parazitin paralyze olması ve ölmesiyle sonuçlanmaktadır. Memelilerin beyin dokusunda da özel ivermektin bağlanma bölgeleri saptanmasına karşın, ivermektinin parazitlere bağlanma afinitesi yüz kat daha fazla bulunmuştur.

1.8. Amoebiosis'te İlaça Karşı Direnç

Hastalık, *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu ve tüm dünyada yaygın olarak görülen bir parazit enfeksiyonudur. Gelişmiş veya gelişmekte olan ülkeler için halen çok önemli bir halk sağlığı sorunu olan amebiyazisin kısa sürede ayırıcı tanısının yapılması tedavi açısından önem arz etmektedir. Tanıda en sık kullanılan yöntem direkt mikroskopi olmakla birlikte, patojen olmayan *Entamoeba dispar* ile ayırımının yapılamaması, etkenin saptanmasına yönelik daha güvenilir yöntemlerin kullanımını gündeme getirmiştir. Bu hastalığa sebep olan parazitin trofozoit formu ve bulaşıcı olan kist formunda oluşmakta ve iki dönemden oluşan bir yaşam döngüsü bulunmaktadır.



Şekil.2. *Entamoeba histolytica* kisti mikroskopik görüntüsü (Anonim,2)

Amoebiosisin tedavisinde; Amip replikasyonunun bağırsakların değişik bölgelerinde (bağırsak lümeni, bağırsak submukozası ve ekstraintestinal bölgeler) çeşitli şekiller oluşturması, ilacın etkisini değiştirmektedir. Farklı ülkelerde farklı ilaçların bulunabilmesi, yeni ilaçların gelişmesi, etki ve yan etkiler açısından farklı görüşlerin varlığı, Amoebiosis tedavisinde dikkate alınması gereken sorunlar olmaktadır. Emetin'e olan direnç, çoklu ilaç direnci (Multidrug resistance; MDR) olan *E.histolytica* suşlarında saptanabilmektedir. MDR ilk olarak memeli hücrelerinde saptanmış ve daha sonra protozoonlarda gösterilmiştir. MDR, I70-kDa membran

molekülünün fazla ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu molekül P-glikoprotein (PcP) olarak adlandırılmakla beraber bu ilaçları hücreden dışarı atan enerji bağımlı bir pompa olarak çalışmaktadır. *E. histolytica*'da dört EhPgp geni (EhPgp1, EhPgp2, EhPgp5, EhPgp6) klonlanıp dizi analizi yapılmıştır, Emetin dirençli C2 klonunda bu genlerin ekspresyonun farklı olduğu saptanmıştır (Orozco ve ark., 2002; Banuelos ve ark., 2000). Metronidazol, 1960 ortalarında amebisid etkisi fark edilince etkin olarak kullanılmaya başlanmış ve diğer bir ilaç olarak sunulmuştur. Metronidazol hücreye pasif difüzyon ile girmekte ve nitro grubu indirgenmiş ferrodoksin veya flavodoksin tarafından reaktif sitotoksik nitroradikallere indirgenmektedir, Anaerobik mikroorganizmalarda enerji oluşturan yollardan biri olan piruvatın asetil CoA'ya dekarboksilasyonudur. Bu reaksiyonda ferrodoksin oksidoredüktaz (PFOR) enzimi önemli bir rol oynamaktadır. Metronidazol'e dirençli *Giardia* ve *Trichomonas* suşlarında azalmış PFOR aktivitesi saptanmıştır.

1.9.İlaç Direncinde Hangi Testler Kullanılır?

İlaç direncinin tanımlanmasında in vivo ve in vitro testler, hayvan modelleri ve aynı zamanda moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır.

A) İn Vivo Testler: Semptomatik ve parazit hastalığı olan kişiler bilinen dozlarda tedavi edilerek, parazitolojik veya klinik cevap izlenmektedir. Bu testler 28 gün gibi uzun bir periyodu kapsamaktadır. Bu testlerin yorumu kısıtlı olup, immünite, ilaç absorpsiyon ve metabolizmasındaki değişimler, çevresel faktörler olabildiği için İn vivo testler ilaç direncinin seviyesini tam anlamıyla yansıtmamaktadır.

B) İn Vitro Testler: Epidemiyolojik çalışmalar için gerekli görüldüğü bildirilmiştir. Bu testler WHO tarafından sahaya adapte edilmiştir. Bu alanda en çok mikrotest kullanılmaktadır. Bu teknikte özellikle Plasmodium türlerinde, antimalarial ilacın şizont döneminde parazitin gelişmesini inhibe etme kapasitesi ölçülmektedir. Fakat İn vitro cevap klinik cevapla her zaman ilgileşim göstermeyebilmektedir. Test edilen popülasyonun immünitesi de önemlidir. Son yıllarda malarial laktat dehidrogenaz'ın (LDH) varlığını belirleyen enzimatik reaksiyon temeline dayalı testler geliştirilmiştir (Ringwald ve ark., 2001).

C) Moleküler Teknikler: Özellikle dirence yol açan mutasyonların tanımlanabildiği çeşitli PCR yöntemleri son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Sangster ve ark., 2002).

2.KAYNAKLAR

- Alker, A.P., Wwapasa, V., Meshnic, S.R.(2004). Rapid real-time PCR genotyping of mutations associated with sulfaoxine-pyrimethamine resistance in *P. falciparum*, *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 2924-2929.
- Anonim 1.(2023). Erişim adresi: dreamstime.com
- Anonim 2(2023). Erişim adresi: net/amip-nedir-amipler-hakkinda-detayli-bilgiler
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Barger, I.A.(1995). Worm control and antihelminthic resistance:adventures with a model. *Parasitol Today*, 11,56-63.
- Fidock, D.A., Sidhu, A.B., Wellems, E.T.(2001). The molecular basis of *P.falciparum* chloroquine resistance. *Drugs against parasitic disease: R&D methodologies and issues*. 155-164.
- Geerts, s., Gryseels, B.(2000). Drug resistance in human helminths: Current situation and lessons from livestock *Clin Microbiol Rev* 13,207-222.
- Kim, K., Weiss, L.I.t.(2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*, 34: 423-432.
- McFadden, D.C., Camps, M., Eothroy, J.C.(2001). Resistance as a tool in the study of old and new drug targets in *Toxoplasma* *Drug Resistance Updates*, 4,1-6.
- Ringwald, P., Basco, L(2001). in vitro and in vivo drug sensitivity tests for malaria. *Drugs against parasitic disease, R&D methodologies and issues*. 185-192.
- Sangster, N., Batterham, P., Chapman, H.D.(2002). Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int J Parasitol*. 32: 657-653,2002.
- Uproft, J.A., Campbell, R.W., Uproft, P.(1996). Quinacrine resistant *Giardia duodenalis*, *Parasitology*, 112, 309- 313.
- Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E., Bruchhaus, I.(1999).Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferrodoxin 1 and flavin reductase, *J Bio Chem*, 274: 26051-26056.

BÖLÜM 13

KEDİLERİN DAVRANIŞ VE PSİKOLOJİSİ

Serra Nur ÖNDER

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.10051774>

1.GİRİŞ

Canlıların birçoğu zamanlarının önemli bir bölümünü iletişim halinde geçirir. Kişi, hayatı boyunca bir iletişim ağının içerisinde ve bu durum ölüncüye dek sürer.(Çetinkaya N,2011). İnsan-Hayvan birlikteliği, ilk başlangıçtan günümüze değin boyut ve nitelik değiştirmek suretiyle varlığını sürdürme gelmiştir. Başlangıçta, yaşamın devamlılığını sürdürmek için avlanmak ve kendileri için hayati tehlike arz eden yırtıcı hayvanlardan sakınmak şeklindeki basit yaklaşım, ehlileştirme(evcilleştirme) ile beraber maddi kazançlara ve sosyalleşmeye bırakmıştır (Özgür A, 2010). Kedilerde anormal davranışlar, hayvana, insana ve çevre koşullarının uygunsuzluğu sebebiyle olabilmektedir. Bu çalışmada kediler hakkında genel bilgi vermeyi, kedilerin tarihsel gelişimini incelemeyi, ayrıca davranış ve psikolojilerini anlamada dikkat edilecek unsurları irdelemeyi amaçladık.

2.Kediler Hakkında Genel Bilgi

Diğer kedigiller gibi kedilerde; güçlü anatomik yapıları, bedenlerinin esnekliği, reflekslerinin hızı, keskin ve geri çekilebilme kabiliyetinde pençeleri ile küçük boyutlu avlarını öldürmek üzere tasarlanmış diş yapısına sahiptirler. Aynı zamanda kediler, insan kulaklarına kıyasla hem yüksek hem de alçak frekansları kapsayacak şekilde daha geniş frekans aralığındaki sesleri işitebilirler. İnsanlara nazaran görme yetileri için daha az ışığa ihtiyaç duyarlar (Demirsoy A 1992, Demirsoy A 1996, Kuru M 1987, Şenler N 1986).Kediler, yalnız başlarına veya topluluk halinde avlanabilirler. İletişim için; koku salma ve kendilerine münhasır beden dilinin yanında farklı seslenmeleri de (miyavlama, mırıltı, titreşim ses, tıslama, hırlama vb.) içerir. Antik Mısır'da tapılan kedilerin, bu coğrafyada evcilleştirildikleri düşünülmektedir. Gerçekte yabani olan kedilerin evcilleştirilmeleri günümüzden yaklaşık olarak 9.500 yıl önce, Orta Doğu'da tarımsal üretimin başlangıç zamanına tekabül eder. Her ne kadar evcilleştirilmişlerse de bazı davranışları açısından yabani kedilere benzer özellikler gösterebilirler. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kedi#Kaynak%C3%A7a>). Kedi gözü günümüzde özdeyişlere konu olacak ve teşbihlerde esas unsur olan benzetilen sıfatına yakıştırılacak derecede hayranlık vericidir. Kediler, gözlerinin rengi veya renkleri ve görme kabiliyetleri ile tasnif edilir. Bu gözlerin geniş ve büyük olması daha rahat avlanabilmeye olanak tanır. Uzaklık duyarlılığı yüksek ve keskin olan gözleri, aynı zamanda yüksek üç boyutlu görme kabiliyetindedir. Bu sayede avlarıyla aralarındaki mesafeyi kolaylıkla algılayabilirler. Kediler avlarının hızlı hareketlerini algılamada başarılıdırlar (Demirsoy A 1992, Demirsoy A 1996).

3.Tarihsel Açından Günümüze Kadar Hayvan Haklarının Gelişimi

Genel tanımıyla hayvan hakları; hayvanların hayatlarını sağlıklı bir biçimde idame ettirebilmesine yönelik şartların sağlanması olarak tanımlanır. İnsanlar gibi hayvanların da yaşam hakkı mevcuttur. Bu yaşam hakkı kutsal ve dokunulmazdır. Bu yaşam hakkının dokunulmazlığının caydırıcı gücü de doğadaki en gelişmiş varlık olan insan olmalıdır ve insanlar hayvanların yaşam hakkının korunmasında savunucu konumunda bulunmalıdır (Aksulu M, 2013).Modern anlamda ilk göze çarpan hayvan hakları hareketi, 19. yüzyılda İngiltere'de felsefeci Jeremy Bentham tarafından kraliçe Victoria himayesinde yapılan hukuki düzenlemelerdir (Gül R.T.B, 2012). 15.10.1978'de Paris' te UNESCO tarafından Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ile günümüzdeki hayvan hakları güvence altına alınmıştır (https://tr.wikipedia.org/wiki/Evrensel_Hayvan_Refah%C4%B1_Bildirgesi).

4.Türkiye' de Hayvan Hakları

Ülkemizde hayvan hakları ile ilgili ilk resmi dernek İstanbul'da 1912 yılında "Himaye-i Hayvanat Cemiyeti" adıyla kurulmuştur. Mustafa Kemal Atatürk'ün tavsiye ve emirleri doğrultusunda 1923 yılında "Türkiye Hayvanları Koruma Demeği" olarak faaliyetlerine devam etmiştir (Anonim 2004a, Yaşar A ve

Yerlikaya H, 2004). Türk Ceza Kanununun 521 ve 577'nci Maddeleri hayvanlara kötü muameleye ilişkin cezai düzenlemeler getirmiştir. 1 Temmuz 2004 tarihli 5199 numaralı Hayvanları Koruma Kanunu ile günümüzdeki hayvan hakları koruma altın alınmıştır. Buna göre tüm hayvanlar eşittir ve kanunen yaşam hakkına sahiptirler (T.C Resmi Gazete, 2004).

5.Kedi Davranışlarını Anlamak Mümkün Mü?

Kediler farklı kişiliklere sahip olabilirler. Utangaç, özgüvenli, cana yakın, cesur, gergin olabilirler. Kedi psikolojisinde çoğumuzun merak ettiği kedilerin ne düşündüğü ve neye göre hareket ettiğidir. Hayvan severler, kediler konuşmadıkları için (miyavlamamanın dışında), belli davranışları sayesinde kedinin psikolojik durumu hakkında fikir sahibi olabilirler. Korkmuş veya kızmış bir kedi kuyruğunu kabartır. Tıslama davranışı, genellikle etraftaki bölgeye saldırma cesaretini gösteren dış tehditlere karşı olabilir. Uluma, sıklıkla acıyı ya da çiftleşme evresindeki bir kediyi işaret eder. Titrek ve gıcırdayan sesler, kedinin oturup dışarıdaki kuşları seyrettiği zaman çıkarılabilir. Kedideki hafif bir göz kırpmış, insanlardaki bir göz kırpmaya veya bir "öpücük" olarak değerlendirilebilir. Kedinin kulakları geriye doğru yatmış gibi duruyorsa, bir tehlikeye karşı teyakkuz halinde olduğuna işaret eder. Bu durumda kedi saldırıya geçebilir. Mutlu, sakin olduğunun göstergesi, bıyıklarının yana eğik olmasıdır. Kedinin uzattığı kuyruk insanların tokalaşması gibidir. Kuyruğu dikken kedi mutludur(Sargırlı Y ve Atasoy F, 2013; Seksel K, 2014; Anonim1, 2020, Anonim3, 2021).Kedinin mırıltılar çıkarması çoğunlukla kedinin halinden memnun olduğunu gösterir ve bu memnuniyet kulaklarının arkasının okşanması suretiyle işitilebilir. Tam aksine bazen mırlama, hasta veya tedirgin bir kedinin kendisini sakinleştirmeye çalıştığı manasına da gelebilir. Geriye veya yana çevrilmiş kulaklar ile beraberinde alçak bir kuyruk sıklıkla kaygıyı gösterir. Çenesini ve vücudunu bir insana veya nesneye sürtmek suretiyle bölge işaretleyen kedi bu davranışıyla, aslında sahiplenmiş ve sevgi bildirisinde bulunmaktadır. Gerçekten mutlu olan kedi, patileriyle yoğurma hareketi yapar (Dr.J.C Wright & J.W. Lashnits,1996, Sargırlı Y ve Atasoy F, 2013; Seksel K, 2014).

5.1.Davranış Bozuklukları

Evcil hayvanlar, insanlar gibi ruhi ve fiziki gelişimler gösterir. Kedilerin de bazen sosyal bir ortamı izlemesi, insanlara karşı sempatik olması ve hislerini ifade etmesi olağan bir durumdur. Fakat dış etken ve insan davranışlarının etkisi ile kedilerde farklı duygu-durumlar ve davranış bozuklukları gelişebilir. Bu durumlar farklı şekillerde kendini açığa vurabilir ve altta yatan sebepler değişkenlik gösterebilir. Kedilerdeki psikolojisini anlama açısından, kedilerde en fazla görülen davranış bozukluklarından bazıları şunlardır:

5.2.Agresyon

Normal yaşamda, kedilerin saldırgan davranışlar göstermesini agresyon olarak tanımlayabiliriz. Stres ve baskı neticesinde baş gösteren saldırgan hareketler bazı belirli davranışlarla ortaya çıkabilir. Bu duruma sebep olabilecek etmenler arasında saldırıya maruz kalma, bireysel üstünlük sağlama gayreti, avlanma, yavru kedilerin varlığı ya da ağrı sayılabilir. Agresif hareketler hem cinslerinin bulunduğu bir ortamda öbür kedilere zarar vermeye teşebbüs veya sırtındaki tüyleri dikleştirme, miksiyon ile kendine ait bölgeleri işaretleme, nesnelere fazlaca sahiplenme ve patileriyle tırmalama şeklinde olabileceği gibi öteki kedilerden tırsma, kendini boyut olarak iyice küçülterek kuytu köşelere gizlenme şeklinde de kendini belli edebilir (Poyraz Ö,2001, Tepeli C,2007). Kedinin saldırganlık durumunda, başka bir uyarı materyali ile kedinin ilgisi başka yerlere yönlendirilip, davranışlarını başka kanallara yansıtması sağlanabilir. İnsana karşı saldırısı oyun amacı taşıyorsa bu durum, kedinin başka oyuncaklara refere edilmesi yoluyla önlenir (Tepeli C,2007. Şen Y, Atasoy F 2014).



Şekil 1. Agresyon halindeki kedinin yüz ifadesi

5.3.Kızgınlığa Bağlı Davranış Problemleri

Kedilerde kızgınlığa bağlı davranış sorunları genellikle görülür. Kedilerde karşı cins isteği, yakınındaki nesnelere, sahibinin bacağına yönelme veya karşı cinse koku bırakma amaçlı değişik yerlere idrar bırakma ve rahatsız edici tonlarda sesle miyavlama çoğunlukla izlenen davranışlardır. Çiftleşmeden kaçınma, karşı cinse isteksizlik, bağımsız ve asosyal bir yaşam şekli de izlenebilir ki bu durum da genellikle anksiyete ile bağlantılıdır (Tepeli C, 2007). Kızgınlık meydana getiren şartların ortadan kaldırılması ve gerekirse bir veteriner hekimin yardımına başvurulabilir (Tepeli C, 2007. Şen Y, Atasoy F, 2014).



Şekil 2.Kızgınlığa bağlı yüz ifadesi (www.chip.com.tr)

5.4.Stres Kaynaklı Durumlar

Kedilerde strese girme bazen davranış değişikliğine sebep olabilir, bazen de beslenme ve uyku alışkanlıklarında bozulma olarak kendini gösterebilir. Sahiplenenin değişmesi veya kaybı, evdeki ziyaretçilerce rahatsız edici derecede ilgi görmesi, özel olarak çocuklar tarafından farkında olunmadan rahatsız edici hareketlere maruz kalması, ev-yer değişikliği, tuvalete ulaşmasının zorlaştırılması kedilerde strese sebep olan başlıca etmenler arasında sayılabilir (Dr. J.C Wright & J.W. Lashnits,1996, Saldırgı Y, Atasoy F,2013). Stres oluşturan durumlarda stresin kaynağının ortadan kaldırılması olumlu sonuçlar verebilmektedir (Tepeli C, 2007).



Şekil 3.Stres halinde bir kedi(www. petlebi.com)

6.TARTIŞMA

İnsanlar, kedilerin hal ve hareketlerini, hislerini, düşüncelerini, acı ve sevinçlerini, kaygı ve korkularını kısaca psikolojilerini özümlediklerinde onları anlayacak ve onlarla doğru ve sağlıklı iletişim kurabileceklerdir. Bir canlıyı anlamanın ve onunla sağlıklı diyalogun yollarından en önemlisi empati kurmaktır. Dolayısıyla kedilerle empati kurmamız halinde daha etkili iletişim sağlanabilir (Dökmen Ü,2013,Çalışkan N ve ark,2014).Doğal dengenin korunması ve hayvanları anlama hususlarında, çevremizdeki insanları bilgilendirici çalışmaların yapılması, kamu spotları ve farkındalık oluşturma çabaları son derece kıymetlidir. Günümüzün evcil hayvanlarından olan kedilerin, iç içe yaşadıkları insanların hayatına birçok olumlu katkı sağladığı gibi, olumsuz yönlerinin de varlığı bilinmektedir. Fakat bu olumsuzlukların önemli bir bölümünün insanların ve çevredeki diğer canlıların anormal davranışları sonucu oluştuğu da bir gerçektir. Örneğin, hayvanlara şiddet uygulanan bir toplumda yetişen çocukların şiddete ve suç işlemeye daha meyilli oldukları saptanmıştır (Yiğit A, Türkmenoğlu E, 2010). İnsan sosyal bir varlık olması sebebiyle çevreden, çevredeki canlılara karşı olan tutumdan, olumlu veya olumsuz manada etkilenebilmektedir. Buna karşın yapılan çok çalışmada ise, kedi sahibi olan bireylerde zihinsel fonksiyonları ve sosyalleşme faaliyetlerinin, kedi sahibi olmayanlara kıyasla daha iyi olduğu gözlenmiştir (Taniguchi Y ve ark,2018). Hatta psikiyatri kliniğinde kediler ile yapılan terapinin hastalara olumlu etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Özdemir N ve Süslü F,1995). Başka çalışmalarda da, bu uygulamanın genel olarak tüm hastalıklar üzerine iyileştirici etkilerin görüldüğü belirtilmiştir (Akyıl R.Ç ve Şengül, B. N. 2022). (Demiralay Ş ve ark,2020).

7.SONUÇ

Kedilerin vücut dilini doğru anlamak ve yorumlamak, onların yaşam alanlarına uyum sağlamalarını kolaylaştıracak, kedilerin buldukları ortamda doğal davranışlarını rahatça sergileyebileceği mekanların da hazırlanmasına yardımcı olacaktır. Kedilerde normalden farklı davranışlar, doğru tanı ve tedavi ile çözülebilir. Bunun için uzman bir veteriner hekime başvurmak faydalı olacaktır.

8.KAYNAKLAR

- Aksulu, M. (2013). “Yeni Toplumsal Hareketler: Türkiye’de Hayvan Hakları Savunuculuğu ve Sosyal Medya”, Yüksek Lisans Tezi, Maltepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul.
- Akyıl R.Ç ve Şengül, B. N. (2022). Kronik Hastalıklarda Hayvan Destekli Terapi . Hemşirelik Bilimi Dergisi, 5(2), 101-108 . DOI: 10.54189/hbd.1065987
- Anonim (2004a) Türkiye Hayvanları Koruma Derneği, [http:// www.kedimveben.com/sivil11.htm](http://www.kedimveben.com/sivil11.htm) Erişim tarihi: 28 Ekim 2004
- Anonim1. ‘How to Understand Your Pet’s Body Language. <https://www.thejournalnj.com/columns/howto-understand-your-pets-body-language>; Erişim Tarihi: 11.12.2020.
- Anonim 3.Cat language. [https:// log.doggiedrawings.net/post/120512597686](https://log.doggiedrawings.net/post/120512597686); Erişim Tarihi: 16.03.2021.
- Çalışkan N, Aydın M. Aslandere M. (2014) Empati ve Hayvanlarla İletişim Yıl 2014, Cilt: 1 Sayı: 1, 29 - 42, 31.12.2014
- Çetinkaya, Z. (2011). “Türkçe öğretmen adaylarının iletişim becerilerine ilişkin görüşlerinin belirlenmesi”, Kastamonu Eğitim Dergisi, 567- 576.
- Demiralay Ş, Keser İ, Çaynak S. (2020) Hemşirelik girişimi olarak hayvan destekli uygulamaların kullanımı: Sistematik derleme. J Psychiatric Nurs;11(3):239-250 DOI: 10.14744/phd.2020.82474
- Demirsoy A (1992) Yaşamın temel kuralları- Omurgalılar/Amniyota, Meteksan A.S. Yayın Evi, Ankara.
- Demirsoy A (1996) Türkiye omurgalıları, Meteksan A.S. Yayın Evi, Ankara.
- Dökmen Ü. (2013). Sanatta ve Günlük Yaşamda _iletişim Çatışmaları ve Empati,Remzi Kitabevi, _İstanbul
- Gül, R. T. B. (2012). “Hayvan Haklarının Düşünsel Evrimi ve Günümüzde Olması Gerekli Durum”, Türkiye Biyoetik Derneği, 128-130.
- Kuru M (1987) Omurgalı Hayvanlar, Atatürk Üniversitesi Basimevi, Erzurum.
- Özdemir N, Süslü F (1995) Psikiyatri Kliniğindeki Kedilerin Hastalara Etkileri , Cilt: 3 Sayı: 1, 65 - 67, 01.03.1995 https://doi.org/10.1501/Kriz_0000000121
- Özgür A. (2010). “Hayvanlarla Yaşamı Paylaşmak”, Vet. Hekim Derg, 9-13.
- Poyraz Ö (2001): Evcil Hayvanlarda Davranış Bilgisi, Yüksek Lisans ders notları, ANKARA
- Saldırgı Y (2013): Hayvanlarda Davranış Bozuklukları (Ünite 5) s: 88-106. Hayvan Davranışları ve Refahı Kitabı. Ed: Salmanlıgil V, Ünal N. 2. Baskı, ISBN 978- 975-06-1006-6, Anadolu Üniversitesi Web-Ofset Tesisleri, Eskişehir, Türkiye.
- Salgırlı Y, Atasoy F.(2013) Hayvan Davranışları ve Refahı. Anadolu Üniversitesi Açık öğretim Fakültesi Yayını, s.76-93-123.
- Seksel K. (2014) Fear, aggression, communication, body language and social relationships in cats. Eur J Companion Anim Pract 24(3): 20-27.
- Şenler N (1986) Van kedisinin biyolojisi ve davranış özellikleri, Yüksek Lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Şen Y, Atasoy F.(2014) Köpek ve kedilerde bazı anormal davranışlar. Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg, 54 (2) 91-99
- Tepeli, C (2007): Pet Hayvanlarında Görülen Davranış Bozukluklarının Giderilmesi. Ev ve Süs Hayvanları Satan İş Yeri Sahipleri ve Yerel Hayvan Koruma Görevlileri Eğitim Semineri. Konya Büyükşehir Belediyesi, Konya, 26-44. 2007
- Taniguchi Y, Seino S, Nishi M, et al. (2018) Physical, social, and psychological characteristics of community-dwelling elderly Japanese dog and cat owners. PLoS ONE 13(11): e0206399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206399>

- T.C. Resmi Gazete (2004). “Hayvanları Koruma Kanunu (5199)”, 02.07.2014 tarihinde,<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/07/20040701>.
- Yaşar, A. ve Yerlikaya, H. (2004). “Dünya'da ve Türkiye'de Hayvan Haklarının Tarihsel Gelişimi”, *Vet. Bil. Derg.*, 39-46.
- Yiğit A, Türkmenoğlu E. (2010). Türkiye’de Pet Hayvanların Saldırgan Davranışları Üzerine Bir Değerlendirme. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* .16 (4): 647-649, 2010 DOI:10.9775/kvfd.2009.1421
<https://tr.wikipedia.org/wiki/Kedi#Kaynak%C3%A7a>
https://tr.wikipedia.org/wiki/Evrensel_Hayvan_Refah%C4%B1_Bildirgesi
- Wright J.C & Lashnits J.W. (Kedi psikolojisi. 1. Baskı, Güncel yayıncılık, 1996. Çevirisi M. Harmancı).



ISBN: 978-625-367-359-8